



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Departamento de Química

T E S I S

Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, níquel y zinc: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular

Lic. Oscar Esteban Gerbino

Directora: Dra. Andrea Gómez-Zavaglia  
LA PLATA, 2013



C I D C A



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CIDCA

## TESIS DOCTORAL

# **Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, zinc y níquel: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular**

**Lic. OSCAR ESTEBAN GERBINO**

Directora: Dra. Andrea Gómez-Zavaglia

LA PLATA, AÑO 2013

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET



Los resultados del presente trabajo de tesis han sido publicados en:

### Artículos

**Gerbino, E.**, Mobili, P., Tymczyszyn, E., Fausto, R., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987(1), 186-192.

**Gerbino, E.**, Mobili, P., Tymczyszyn, E. E., Frausto-Reyes, C., Araujo-Andrade, C., and Gómez-Zavaglia, A. (2012). Use of Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of metal ions attached to *Lactobacillus kefir*. *Journal of applied microbiology*.

### Capítulos de libro

P. Mobili, **E. Gerbino**, E. Tymczyszyn, A. Gómez-Zavaglia. (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria", en "*Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*" (Ed. Editor: A. Méndez-Vilas). Editorial Formatex. Badajoz. Spain. ISBN-13: 978-84-611-9423-0.

C. Araujo-Andrade, C. Frausto-Reyes, **E. Gerbino**, P. Mobili, E. Tymczyszyn, E. Esparza-Ibarra, R. Ivanov-Tsonchev and A. Gómez-Zavaglia (2012). Application of Principal Component Analysis to Elucidate Experimental and Theoretical Information, *Principal Component Analysis, Dr. Parinya Sanguansat* (Ed.), ISBN: 978-953-51-0195-6, InTech Publisher. Croacia (por invitación) Capítulo 2, pag 23-48.

### Actas de Congresos (con referato)

C. Araujo-Andrade, P. Mobili, C. Frausto-Reyes, **E. Gerbino**, G.L. De Antoni, R. Ivanov-Tsonchev, A. Gómez-Zavaglia. Chemometric analysis of Raman spectra of lactobacilli isolated from kefir. International Conference on Raman Spectroscopy (2010) *AIP Conference Proceedings* 1267: 326-327. ISBN: 978-0-7354-0818-0.

Además se participó en ensayos experimentales de los siguientes trabajos:

-Effect of Physical Properties on the Stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a Freeze-Dried Galacto-oligosaccharides Matrix. E. Tymczyszyn, N. Sosa, **E. Gerbino**, A. Hugo, A. Gómez-Zavaglia, C. Schebor. *International Journal of Food Microbiology* (2012); 155, 217-221.

-Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tymczyszyn, E.; **E. Gerbino**, A. Illanes, A. Gomez-Zavaglia. *Cryobiology*. (2011); 62 (2), 123-129.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por haberme permitido realizar mis estudios de postgrado.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (AGENCIA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

Al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT) por aportar los medios económicos que permitieron realizar mis estadías en el exterior.

A mi directora de tesis Dra. Andrea Gómez-Zavaglia, porque desde el principio confió en mí transmitiéndome su experiencia, generosidad, calidad humana y sobre todo porque es un ejemplo como jefa de tenacidad en el trabajo. Además porque siempre estuvo presente guiándome, a través de las más variadas vías tecnológicas de comunicación.

A la Dra. Elizabeth Tymczyszyn, quien desde que llego al laboratorio me guio desinteresadamente en todo momento, en cada diseño de experimentos. También por su calidad profesional y humana y por ayudarme siempre con soluciones prácticas, ingeniosas y buen humor a cada "adversidad" que se presentaba.

A la Dra Graciela De Antoni, por su calidad humana y por saber transmitir, desde sus comienzos, que la horizontalidad, el trabajo en equipo, y la extensión son la base de un buen grupo de trabajo.

A la Dra. Silvia Racedo, por hacerme el contacto con Andrea, recibirme en su ahora "ex casa" y ser siempre tan generosa. Gracias "coca just married".

Al Dr. Rui Fasto, la Dra. Susana Jarmelo y el Dr. Igor Reva de la Universidade de Coimbra, por recibirme en su laboratorio, transmitirme sus conocimientos y la amabilidad brindada desde el primer día de estadía a pesar de la barrera idiomática.

Al Dr. Pablo Mobili, por ayudarme en mis inicios con la espectroscopia infrarroja de proteínas, y por ser como un "GPS" en cada viaje al exterior que compartimos.

Al Dr. Cuauhtemoc Araujo-Andrade de la Universidad Autónoma de Zacatecas, por su calidad humana, transmisión inigualable de conocimientos de "temotización" cada vez que lo necesite y ser tan buen anfitrión en cada estadía Mexicana.

A la Dra Chiara Baldacchini de Università della Tuscia, por todos los conocimientos que me aporto sobre microscopia de fuerza atómica.

A todos mi compañeros del sector Microbiología CIDCA: Jessi, Aye, Fer, Marina, Mica, Judith, Fernanda, Ale, Caro, Lucia, Luciana, Pablo, Patricio, Grace y Analía que con cada uno, oportunamente, compartí algún momento relacionado a esta tesis.

A la Lic. Paula Carasi, "mi hermana de la ciencia" con quien empezamos juntos a transitar el camino de tesis doctoral. Gracias por todos los momentos compartidos (risas y peleítas) y por ayudarme siempre tan desinteresadamente (all your body).

A mis compañeros del laboratorio de la cátedra de microbiología con los que conviví el mayor tiempo en estos años de tesis:

A las chicas: Pato (your body 2), María (bizcochitos), Ángela (grupo Ángela), Sampa (your body 3), e Ivanna (suspiros), por "aguantarme" diariamente (que no es algo menor) y por compartir tantas charlas desde las más insólitas y graciosas y saber que aunque son siempre mayoría los agudos, a veces somos unos pocos los del genero contrario los que les hacemos frente.

A los muchachos: Mauri (reciente hermanito), Robert, Nicus (El Lic.), Raulo (お元気ですか。 ) porque aunque somos minoría, siempre o a veces defendemos nuestra postura y resistimos los embates con suma pachorra.

A todos mis amigos de Santiago, Tucumán y La Plata. Especialmente a los que me acompañaron siempre en todo este proceso y son de fierro, Toto, Matias, Ramiro y Nayla. Gracias por estar y saber que estoy un poco "cu cu" pero no tanto.

A mis padres, Oscar y Cristina y hermanos, Alejandra y Diego, por "estar" incondicionalmente aun a la distancia.

Por último, la tesis comienza y durante el transcurso se van eligiendo y trazando nuevos rumbos porque como dice El Principito (de Antoine de Saint-Exupéry):

**"Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos"**

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
Metales pesados: concentración en agua y sus efectos sobre la salud humana	2
Mecanismos de resistencia a metales	7
Interacción metal-microorganismo	9
Bacterias lácticas	14
<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO I – Efecto del plomo, cadmio, zinc y níquel sobre <i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818 en condiciones de crecimiento (tolerancia) y no-crecimiento (biosorción).</b>	
<b>Introducción</b>	<b>21</b>
Tolerancia a metales pesados	22
Unión de metales pesados a bacterias lácticas en condiciones de no crecimiento	24
Interacción hospedador con metales	30
Biosorción del metal en el cuerpo humano	30
Los metales y la microbiota intestinal	33
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>35</b>
Microorganismos utilizados	35
Medios de cultivo, soluciones buffer y soluciones de metales	36
Condiciones de cultivo y crecimiento de las bacterias	38
Tolerancia de <i>L. kefir</i> a distintas concentraciones de metales	38
Cálculo de la dosis-respuesta (EC50)	39
Observación microscópica de las bacterias crecidas en presencia de metales	40
Ensayos de unión a iones metálicos (Biosorción)	40
Cálculo de los parámetros de la isoterma de biosorción	41
Cuantificación de metales utilizando kits colorimétricos	41
Microscopía Electrónica de transmisión (MET)	42
Análisis estadístico	42
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>43</b>
Tolerancia	43
Tolerancia de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 y <i>L. kefir</i> JCM 5818 a distintas concentraciones $Pb^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Zn^{2+}$ y $Ni^{2+}$	43
Alteraciones morfológicas inducidas por los metales presentes en el medio de cultivo	54
Biosorción	56
Capacidad de biosorción de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818	56

Isotermas de biosorción	58
<b>Conclusiones</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO II – Implementación de Espectroscopía Raman y Análisis Multivariante para el estudio de la interacción de plomo, cadmio, zinc y níquel a las cepas de <i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818.</b>	
<b>Introducción</b>	<b>65</b>
Espectroscopía Raman	66
Métodos de análisis multivariante (métodos quimiométricos)	71
Análisis de componentes principales (PCA)	72
Mínimos cuadrados parciales (PLS)	76
Métodos de validación	78
Validación cruzada (LOOCV)	78
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>80</b>
Espectroscopía Raman	80
Espectros Raman	80
Análisis de datos	81
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>83</b>
Análisis estructural	83
Análisis de componentes principales (PCA)	84
Mínimos cuadrados parciales (PLS)	89
<b>Conclusiones</b>	<b>94</b>
<b>CAPÍTULO III – Análisis estructural de la interacción de proteínas de capa-S de <i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818 con plomo, cadmio, zinc y níquel</b>	
<b>Introducción</b>	<b>95</b>
Microscopía de fuerza atómica	99
Espectroscopía de infrarrojo por Transformadas de Fourier	101
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>108</b>
Extracción y preparación de proteínas de capa-S de las células bacterianas	108
Determinación de la concentración de proteínas	
Método de Bradford	
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	109
Preparación de la muestra para AFM	109
Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	110
Obtención de los espectros FTIR	110
Análisis de los espectros de FTIR	111

<b>Resultados y Discusión</b>	<b>112</b>
Microscopía de fuerza atómica	112
Análisis espectral FTIR de proteínas de capa S <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818 con Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> y Ni <sup>2+</sup>	118
Coordinación de iones metálicos a proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818	120
Efecto de la unión de metal sobre la estructura secundaria de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 y JCM 5818	126
<b>Conclusiones</b>	<b>129</b>
<b>DISCUSION GENERAL</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>135</b>

# Introducción General



## INTRODUCCIÓN GENERAL

El acceso a los alimentos y el agua potable seguros son esenciales para la vida humana y animal, y contribuyen a la seguridad alimentaria. Sin embargo, existen diversos contaminantes, entre los que se encuentran los metales pesados. Los metales pesados son elementos químicos con una densidad mayor que  $5 \text{ g/cm}^3$  y una toxicidad elevada. Dicha toxicidad depende principalmente de tres factores (Kiely, 1999):

- 1) **La concentración en la que se encuentran:** aunque algunos metales son necesarios para procesos biológicos, todos ellos son tóxicos en altas concentraciones. Otros metales, no son esenciales y se acumulan en diferentes organismos, siendo tóxicos aún en bajas concentraciones.
- 2) **El tipo de especie que forman en un medio específico:** sólo ciertas especies de metales con determinadas cargas son tóxicas, es decir, presentan características físicas o químicas que los hace estar biodisponibles.
- 3) **La persistencia del contaminante:** los metales no pueden ser degradados o descompuestos, es decir únicamente se distribuyen en el entorno de distintas maneras.

El desarrollo tecnológico, el consumo masivo e indiscriminado y la producción de desechos principalmente urbanos, ha provocado la presencia de diferentes metales en cantidades importantes en el ambiente, generando diversos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas. Los metales se incorporan en el organismo a través de los alimentos, el agua, o como partículas en el aire que se respira, acumulándose hasta llegar a límites de toxicidad. Si la incorporación es lenta se producen intoxicaciones crónicas, mientras que si el tiempo de exposición es corto y la dosis de metal alta la intoxicación puede ser aguda.

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) el plomo, cadmio, níquel y zinc entre otros, son algunos de los metales pesados más tóxicos.

## **METALES PESADOS: CONCENTRACIÓN EN AGUA Y SUS EFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA**

### **Plomo**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1995 como límite legal 50 µg/L para la concentración de plomo en el agua potable, luego este límite decreció hasta 10 µg/L en 2006 (OMS, 2006).

La contaminación antropogénica, es decir resultante de actividades humanas, incrementa sustancialmente las concentraciones de plomo, especialmente en los alrededores de las minas y fundiciones de metal (Miller *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Se puede decir que aproximadamente el 40 % del plomo se utiliza en forma metálica, 35 % en compuestos químicos y 25 % en aleaciones. La descarga al ambiente proviene además de la manufactura de pigmentos, pinturas y químicos. El plomo en el agua se distribuye en tres fracciones diferentes: disuelto, unido a las partículas de materia en suspensión (PMS) y sedimentado. El plomo tiene una fuerte afinidad a las partículas de materia, y por lo tanto, está presente principalmente en PMS y en fracciones de sedimento mientras que la cantidad disuelta es baja (Balls, 1988; Zarazua *et al.*, 2006). Sin embargo, la unión de plomo PMS y sedimentos es parcialmente reversible y éste puede ser liberado al agua en condiciones adecuadas (Chrastný *et al.*, 2006). La cantidad de plomo disuelto es incrementada por varios factores, entre ellos elevadas cantidades de materia orgánica disuelta y bajos pHs (Linnik, 2003).

La toxicidad aguda provoca anorexia, vómitos, malestar general y convulsiones (debido a que aumenta la presión intracraneal), estas últimas más frecuentes en niños. Las fuentes de exposición infantil están generalmente

relacionadas con el medio ambiente, como por ejemplo fichas para pintar, cerámica, agua potable y el polvo. En adultos, puede causar efectos gastrointestinales, dolores en brazos y piernas e hipertensión. La exposición a muy altos niveles puede causar temblores, pérdida de memoria, confusión, estupor, insuficiencia renal, convulsiones y coma.

Los efectos adversos crónicos asociados a la exposición al plomo son función de la dosis, independientemente de la vía de exposición. El plomo es absorbido y acumulado por vía percutánea, respiratoria y digestiva, y luego distribuido en sangre, tejidos blandos (riñón, médula ósea, hígado y cerebro) y tejido mineralizado (huesos y dientes). Aproximadamente el 90 % de la carga corporal de plomo en adultos se concentra en los huesos y dientes. En los niños, el porcentaje de plomo almacenado es de 70 %, produciendo además trastornos en la capacidad de aprendizaje, disminución del coeficiente intelectual y perturbación en el comportamiento. Debido al continuo crecimiento y resorción ósea los niños son más susceptibles a los efectos adversos del plomo.

El plomo afecta varios procesos enzimáticos involucrados en la síntesis del grupo prostético hemo. En este sentido, concentraciones elevadas de plomo en sangre han sido asociadas a una síntesis disminuida de hemoglobina y bajo número de glóbulos rojos, lo cual conduce en última instancia a la anemia. Asimismo, concentraciones elevadas de plomo en sangre han sido asociadas a disfunción renal, evidenciada por la excreción urinaria de pequeñas proteínas moleculares (ATSDR, 2007).

## **Cadmio**

La OMS fijó como valor de referencia 3 µg/L para el cadmio en el agua de consumo (OMS, 2006) siendo las principales fuentes de contaminación las antropogénicas. Las concentraciones promedio de cadmio en el agua potable y las aguas naturales en diferentes partes del mundo como Argentina, Egipto, Estados Unidos, Alemania, Australia, Suecia, Polonia, Turquía, China, varían de

0 a 2.6 µg/L (Andrade *et al.*, 2000, Mohamed *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2000; Seifert *et al.*, 2000; Aremu *et al.*, 2002; Rajaratnam *et al.*, 2002; Rosborg *et al.*, 2003; Barton, 2005; Tuzen *et al.*, 2005; Virkutyte y Sillanpää, 2006).

El cadmio se utiliza comercialmente en depósitos, electrolitos, aleaciones, soldaduras, estabilizadores de plásticos, baterías, etc. La contaminación ambiental por cadmio proviene de la combustión de combustibles fósiles, incineración de basura, fundición y de la extracción de zinc. En los suelos se absorbe a través de la materia orgánica y en medio ácido se absorbe a través de las plantas. También puede acumularse en organismos de agua dulce.

Al igual que el plomo, el cadmio en aguas naturales se distribuye en tres fracciones: disuelto, unido a las partículas de materia en suspensión (PMS) y sedimentado. Tiene una fuerte afinidad por las partículas de materia y los sedimentos pueden contener concentraciones superiores a 100 mg/kg (Woo y Choi, 2001). Como resultado de esto, la concentración de cadmio soluble en agua es generalmente baja, aunque la cantidad de cadmio disuelto puede incrementarse cuando existen elevadas concentraciones de materia orgánica disuelta (principalmente ácidos húmicos y fúlvicos) y bajos pHs (Linnik, 2003).

La toxicidad aguda puede resultar de la ingestión de concentraciones elevadas de cadmio en alimentos o bebidas contaminados. En estos casos, el cadmio exhibe efectos locales irritantes sobre el tracto gastrointestinal, como náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y una sensación de ahogo, evidentes de forma inmediata.

La exposición crónica al cadmio a través de cualquier vía tiene efectos adversos sobre el corazón, los pulmones, los huesos, las gónadas, y sobre todo, los riñones. El principal efecto a largo plazo, está generalmente relacionado con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema y enfermedad tubular renal.

Los síntomas iniciales de exposición a la inhalación crónica son los relacionados con la fiebre de los humos metálicos (fiebre, dolor de cabeza, dolor en el pecho, dolor de garganta, tos, y rinitis).

La toxicidad crónica del cadmio a nivel de huesos se debe a su efecto sobre la pérdida de calcio, que puede ser influenciado por la dieta y el estado hormonal y que lleva a la osteomalacia (pérdida de minerales de los huesos) y pseudofracturas. En Japón han sido descritas alteraciones óseas en personas que consumieron pescado contaminado con cadmio. La enfermedad fue denominada "Itai-Itai" ("ay-ay"), en referencia a los gritos manifestados por los pacientes debidos al dolor.

La exposición prolongada al cadmio puede interferir en la absorción de hierro, lo que conduce a la anemia ferropénica. Sin embargo, el depósito principal de cadmio en el organismo es el riñón. El cadmio interfiere con la función de reabsorción del túbulo proximal lo que conduce a la calciuria (calcio en la orina), aminoaciduria (aminoácidos en la orina), glucosuria (glucosa en la orina) o proteinuria (proteína en la orina) [ATSDR, 2008].

## **Zinc**

La Organización Mundial para la Salud, estableció como límite legal: 5 mg/L. No obstante, concentraciones de zinc mayores que 3 mg/L en el agua de consumo pueden afectar a la aceptabilidad del agua por parte de los consumidores.

El zinc es un oligoelemento esencial que se encuentra prácticamente en todos los alimentos y en el agua potable en forma de sales o complejos orgánicos. La principal fuente de zinc son los alimentos como cereales, frutos secos, legumbres, carnes, aves, y la mayoría de los mariscos. La Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés Food and Drug Administration) estimó que el consumo promedio de zinc a partir de los alimentos (incluyendo el agua) para un adulto es de 0.23 mg/kg por día. Aunque las concentraciones de zinc en aguas superficiales y subterráneas no suelen sobrepasar los 0.01 y 0.05 mg/L, respectivamente, en el agua corriente puede haber concentraciones mayores como consecuencia de la disolución del zinc de las tuberías.

El zinc se utiliza en aleaciones de latón y bronce, así como también en cubiertas anticorrosivas. Este metal ingresa al ambiente durante la producción del acero, a través de la minería y de la combustión del petróleo (ATSDR, 2005a). En suelo, permanece formando compuestos insolubles, y se moviliza a pH neutro o ácido (Volke *et al.*, 2005).

Si bien es un elemento traza esencial, la exposición aguda al zinc produce irritación de la piel. La ingestión de elevadas concentraciones de zinc a partir de alimentos es difícil. Sin embargo, el consumo de bebidas almacenadas en recipientes galvanizados o tuberías, el uso de utensilios de zinc, o la ingestión de demasiados suplementos de zinc conducen a la intoxicación aguda, que se manifiesta a través de náuseas, calambres, vómitos y diarrea. En este sentido, el fosforo de zinc (plaguicida) y el cloruro de zinc (cuyo límite de exposición es de 2 mg/m<sup>3</sup>), son las sales más peligrosas y provocan la muerte por intoxicación.

Debido a la importancia de la relación de zinc y cobre en la ingesta, un elevado consumo de zinc puede conducir a síntomas de deficiencia crónica de cobre. Por otra parte, la inhalación crónica de compuestos de zinc puede dar lugar a daños en el hígado, que pueden ser fatales (ATSDR, 2005a).

## **Níquel**

La concentración de níquel en el agua de consumo es normalmente menor que 0.02 mg/L y la Organización Mundial de la Salud (2006) estableció como valor de referencia 0.07 mg/L. El níquel es comúnmente ingerido en los alimentos, y es encontrado en bajos niveles en el agua. El níquel elemental y el óxido de níquel pueden producirse como partículas o adsorberse sobre otras partículas en el aire ambiental.

El níquel es utilizado en aleaciones de acero inoxidable, joyería, monedas válvulas, baterías y también como catalizador. Las descargas de níquel al ambiente son originadas a partir de la incineración de basura y plantas de fundición, así como a través de las aguas residuales. El níquel se deposita en el

suelo y se moviliza en medio ácido hasta alcanzar el agua subterránea, adhiriéndose a sedimentos que contienen hierro y manganeso.

Al igual que el zinc, el níquel es un elemento traza esencial. Sin embargo, los polvos de refinación de níquel y el bisulfito de níquel son considerados carcinogénicos, siendo la piel y el tracto respiratorio los principales órganos blanco. El tetracarbonilníquel es muy reactivo, y altamente tóxico. Es muy irritante para las vías respiratorias y la exposición aguda accidental puede conducir a un edema pulmonar, neumonía y hasta la muerte. Además, ha sido demostrado que la ingestión de altas dosis de níquel y ciertos compuestos de níquel causa dolor de estómago, aumenta el número de glóbulos rojos e induce daño renal.

Por otra parte, los compuestos de níquel son sensibilizadores de la piel, dando lugar a irritación, eczema y alergias de contacto (dermatitis). La dermatitis alérgica de contacto es el efecto crónico más frecuente de la exposición al níquel en la población general (ATSDR, 2005b).

## **MECANISMOS DE RESISTENCIA A METALES**

Los microorganismos en su amplia diversidad pueden ser resistentes o tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal en cuestión (Silver y Misra, 1988). En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como secuestrantes de metales en sitios contaminados, debido a que ambos tipos de microorganismos pueden extraer contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos.

La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustrato diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen a la defensa elemental de la célula frente a metales

potencialmente dañinos, así como frente a las especies que estos producen al interactuar con los componentes celulares. Otros, están muy especializados y se encuentran sólo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la resistencia a metales pesados (Nies, 2003). Los sistemas desarrollados por las bacterias para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos son diversos (Silver y Phung, 2005; Nies, 1999). Entre ellos, se encuentran principalmente los que involucran:

- i) transportadores ubicados en la membrana que expulsan las especies nocivas desde el citoplasma celular.
- ii) enzimas que modifican el estado redox de los metales o no metales, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y
- iii) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad (Cervantes, *et al.*, 2006)

### **i) Sistema de expulsión de cationes**

La mayoría de los sistemas de resistencia a metales se basan en el eflujo activo de iones tóxicos tales como los que expulsan iones derivados del cadmio, cobalto, cobre, níquel, plomo y zinc. En este proceso intervienen fundamentalmente tres sistemas diferentes: a) las ATPasas tipo P, b) los transportadores compuestos por miembros de la familia de resistencia, nodulación, división celular (RND, por sus siglas en inglés: *resistance, nodulation, cell division*), y c) los facilitadores de difusión de cationes (CDF, por sus siglas en inglés: *Cation diffusion facilitator*). Estos aparecen en una gran variedad de bacterias resistentes a metales pesados, donde conforman una red muy eficiente que asegura la homeostasis celular y garantiza la supervivencia en ecosistemas con elevadas concentraciones de metales (Nies, 2003).

### **ii) Transformaciones mediadas por enzimas**

Entre las transformaciones enzimáticas de los metales se incluyen la oxidación, reducción, metilación y demetilación, (Silver y Phung, 2005) y estas

pueden dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles.

La detoxificación por reducción requiere que el potencial redox del metal pesado se encuentre entre el potencial redox  $H_2/H^+$  ( $-421$  mV) y el potencial redox  $O_2/H_2$  ( $+808$  mV) [calculado a partir de Weast (1984) a  $30$  °C y pH 7.0], que constituye el intervalo redox fisiológico para muchas bacterias aerobias. De esta manera, por ejemplo, el Hg(II) ( $+430$  mV), el arseniato [As(V)] ( $+139$  mV) y el Cu(II) ( $+268$  mV), pueden ser reducidos por la célula bacteriana, pero no así el Zn(II) ( $-1.18$  V), el Cd(II) ( $-824$  mV), el Co(II) ( $-701$  mV) y el Ni(II) ( $-678$  mV). Si un metal pesado no puede ser reducido por las vías celulares o su reducción no es conveniente, entonces el metal puede ser complejado o transportado al exterior celular, o pueden suceder ambos eventos (Nies, 1999).

### **iii) Captura de iones por componentes celulares**

La acumulación y compartimentación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático y el interior celular. En ella pueden intervenir polímeros estructurales y extracelulares que interactúan con los metales atrapándolos dentro de su estructura o proteínas que se unen a los iones metálicos por los que poseen una gran afinidad, evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para el microorganismo (Kasan, 1993).

## **INTERACCIÓN METAL-MICROORGANISMO**

Las interacciones metal–microorganismos han sido estudiadas en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objetivo de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionucleídos.

Ciertos métodos como la precipitación química, floculación, adsorción, intercambio iónico y la filtración de membrana son convencionalmente usados para remover metales de las aguas. A pesar de su amplio uso, estos métodos tienen varias desventajas como la incompleta remoción del metal, sistemas de

equipamiento y monitoreo caros, elevados requerimientos de energía o reactivos y generación de lodos tóxicos u otros productos de desecho que requieren ser eliminados (Zouboulis *et al.*, 2004).

Los microorganismos pueden realizar dos transformaciones dependiendo del estado de oxidación del metal y de la especie que éste esté conformando. La primera transformación corresponde a la movilización del metal, es decir el pasaje de un estado insoluble inicial correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa (biolixiviación). El otro proceso corresponde a la inmovilización del metal, es decir el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida (Vullo *et al.*, 2003). Dentro de la inmovilización de metales por microorganismos se incluyen los procesos de:

**Bioacumulación**, el metal se transporta al interior de la célula mediante un gasto de energía y puede ser secuestrado por proteínas o almacenado en organelas;

**Biomíneralización**, se refiere a la precipitación del metal como carbonato, hidróxido, sulfuro o fosfato;

**Biotransformación**, involucra un cambio de tipo químico como por ejemplo en el estado de oxidación, metilación, etc;

**Quimiosorción** mediada por microorganismos, en este caso primero se lleva a cabo una biomíneralización formándose un depósito primario el cual funciona como núcleo de cristalización para capturar el metal de interés;

y por último el proceso al que nos referiremos, la **BIOSORCIÓN**.

La **BIOSORCIÓN** es un término usado para describir generalmente la adsorción pasiva, energía-independiente de moléculas sobre la superficie de un adsorbente. Un aspecto de la biosorción es la unión de metales sobre biomasa microbiana. La idea del uso de una biomasa microbiana como adsorbente de metales pesados surgió hace 20-30 años cuando eran examinadas alternativas más económicas y efectivas a los métodos convencionales de purificación de agua. Durante las últimas décadas, se ha estudiado la biosorción de un gran

número de metales (por ejemplo, aluminio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, mercurio, níquel, plomo, thorio, uranio, zinc) por una variedad de biomásas que incluyen bacterias, hongos y las algas (Volesky y Holan, 1995; Davis *et al.*, 2003; Mehta y Gaur, 2005; Romera *et al.*, 2006).

La remoción de plomo, cadmio, zinc y níquel por una biomasa de algas (Plaza Cazón *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2006; Pavasant *et al.*, 2006), hongos (Yan y Viraraghavan, 2003; Arica *et al.*, 2004; Akar y Tunali, 2005 y 2006) y bacterias (Pardo *et al.*, 2003; Chojnacka *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006) es un proceso rápido en el que el grueso de la eliminación ocurre durante los primeros minutos de contacto entre el metal y la solución de biomasa.

La remoción es influenciada por el **pH**. Así, la biosorción de metales a pH menores de 2-3 es muy baja, observándose la mayor eficiencia en medios ligeramente ácidos (pH entre 4 y 6). El efecto del pH es el resultado de la competencia de los cationes metálicos con los protones por sitios de unión cargados negativamente (grupo carboxilo y otros grupos funcionales ácidos) a través de diversos mecanismos. A pHs altos, la formación de hidróxidos de metal y otros complejos metal-ligando reduce significativamente la cantidad de iones metálicos adsorbidos (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

Otro parámetro importante en la biosorción es la **fuerza iónica**, que influye en la adsorción del soluto a la biomasa superficial (Daughney y Fein, 1998; Borrok y Fein, 2005). El efecto de la fuerza iónica puede ser atribuido a la competencia entre los iones, los cambios en la actividad de metal, o en las propiedades de la doble capa eléctrica. Cuando dos fases, por ejemplo, la superficie de la biomasa y el soluto en solución acuosa están en contacto, están obligados a estar rodeados por una doble capa eléctrica, debido a la interacción electrostática. Por lo tanto, la adsorción de cationes metálicos disminuye con el aumento de la fuerza iónica (Dönmez y Aksu, 2002). Algunos iones inorgánicos, tales como cloruro, pueden formar complejos con algunos iones metálicos y, por lo tanto, afectar el proceso de biosorción (Borowitzka, 1988).

La **dosis** de un biosorbente influye en gran medida en el grado de biosorción. En muchos casos, dosis más bajas de biosorbente producen

mayores captaciones y bajas eficiencias de remoción porcentuales (Aksu & Cagatay, 2006; Vijayaraghavan *et al.*, 2006). Un aumento en la concentración de biomasa en general, aumenta la cantidad de soluto biosorbido, debido a la mayor área superficial del biosorbente, que a su vez aumenta el número de sitios de unión (Esposito *et al.*, 2001). A la inversa, la cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso de biosorbente decrece con el incremento de la dosis de biosorbente, lo cual puede ser el resultado de la compleja interacción de varios factores. Un factor importante a altas dosis de adsorbente es que el soluto disponible sea insuficiente para cubrir completamente los sitios intercambiables en el biosorbente, lo que usualmente resulta en la baja captación de solutos (Tangaromsuk *et al.*, 2002). También, como sugirió Gadd *et al.* (1988), la interferencia entre sitios de unión debido a un aumento de dosis biosorbente no puede ser descartada, ya que esto dará lugar a una adsorción específica baja.

La **temperatura** no parece afectar en gran medida la biosorción dentro del intervalo de 20 a 35 °C (Vegliò y Beolchini, 1997). Las temperaturas más altas generalmente mejoran la adsorción debido al aumento de la actividad superficial y la energía cinética del soluto (Sağ *et al.*, 2000; Vijayaraghavan & Yun, 2007). Sin embargo, puede esperarse daño físico del biosorbente a altas temperaturas. Debido a la naturaleza exotérmica de algunos procesos de adsorción, se ha encontrado que un aumento en la temperatura reduce la capacidad de biosorción de la biomasa (Mameri *et al.*, 1999.; Suhasini *et al.*, 1999).

La **concentración inicial de soluto** tiene un efecto importante en la biosorción. Una concentración inicial alta resulta en una adsorción alta de soluto por unidad de peso de biosorbente, a pesar de que la eficiencia de remoción decrece. Esto es debido a que a una concentración inicial baja de soluto, la relación de los moles iniciales de soluto y el área de superficie disponible es baja; posteriormente, la fracción de adsorción se hace independiente de la concentración inicial. Sin embargo, a concentraciones más altas, los sitios disponibles para adsorción son cada vez menores en comparación con los moles

de soluto presente. De ahí que la eliminación de soluto es fuertemente dependiente de la concentración de soluto inicial (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

El **tamaño del biosorbente** también juega un papel vital en la biosorción. Las partículas de tamaño más pequeñas tienen un área de superficie mayor, que a su vez favorece biosorción y resulta en un tiempo de equilibrado más corto (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

### **Biosorción de plomo, cadmio, zinc y níquel por microorganismos**

Las capacidades máximas de unión de plomo, cadmio, níquel y zinc varían entre los diferentes géneros y especies de algas, hongos y bacterias, con valores que van desde unos pocos miligramos hasta unos cientos de miligramos por gramo de biomasa seca. Las diferencias entre biomasas pueden explicarse a partir de diferencias estructurales en la pared celular de las diferentes biomasas. La superficie de las algas usadas en biosorción está mayormente cubierta de alginato y polisacáridos sulfatados (Davis *et al.*, 2003). La pared celular externa de los hongos se compone principalmente de beta-(1→3)-glucano y las glicoproteínas (Bowman y Free, 2006), mientras que los lipopolisacáridos y peptidoglicano con ácidos (lipo)teicoicos son característicos de bacterias gram-negativas y positivas, respectivamente (Beveridge, 1999; Delcour *et al.*, 1999.). Las concentraciones de grupos funcionales responsables de la unión a los iones metálicos varían entre biomasas. En resumen, diferentes grupos funcionales tienen diferentes afinidades por un determinado metal, lo que lleva a la variación de la capacidad de remoción de las diferentes biomasas.

Es importante tener en cuenta que muchas de las especies de microorganismos utilizados en la remediación ambiental (por ejemplo, bacterias quimiolitotróficas que utilizan fuentes inorgánicas de energía, tales como metales, para donación de electrones y producción de ATP) no son aplicables a la eliminación de metales en el ser humano o en alimentos. Una de las razones es que las formas libres de ciertos metales, especialmente el hierro, son raras en el cuerpo humano y por lo tanto constituyen un nutriente limitante para el

crecimiento de estos microorganismos (Schryvers *et al.*, 1999). En segundo lugar, muchas bacterias del suelo pueden ser oportunistas o patógenos obligados dentro del cuerpo humano (Colwell *et al.*, 1985). En tercer lugar, muchas de las especies más eficaces para la biorremediación están modificadas genéticamente para mejorar su capacidad de biosorción innata (Batista, *et al.*, 2009) y en estas condiciones pueden no ser adecuadas para el uso humano. Esto hace necesario encontrar y evaluar la capacidad biosorbente de otras cepas, que sean seguras para el ser humano.

## **BACTERIAS LÁCTICAS**

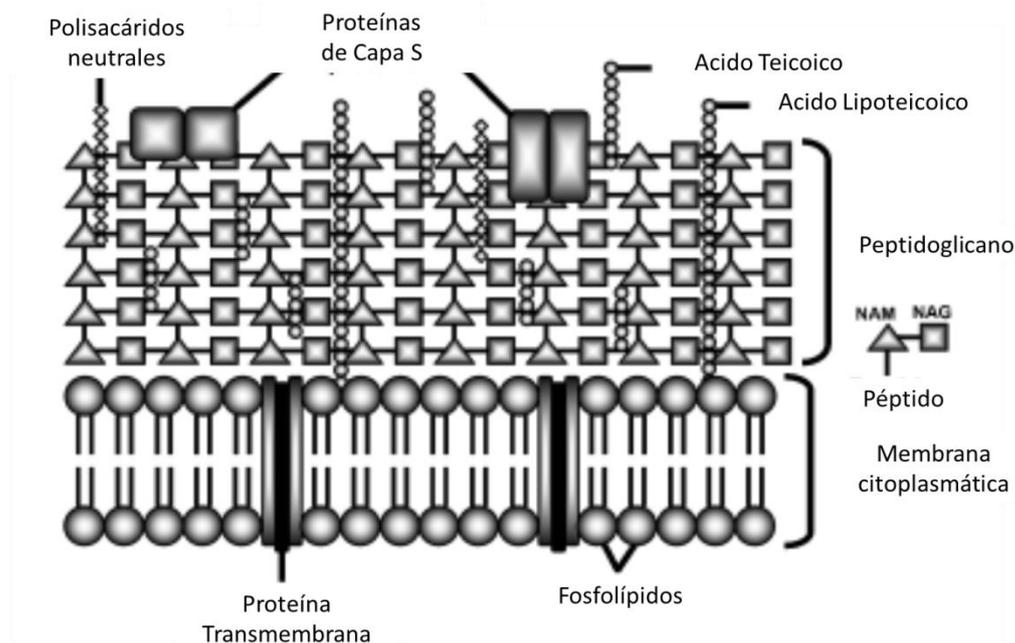
Las bacterias lácticas tienen estatus GRAS (del inglés Generally Recognized as Safe) y son cocos o bacilos gram-positivos, no esporulados, catalasa negativos, que producen ácido láctico como el principal producto final de la fermentación de carbohidratos. Las bacterias ácido lácticas comprenden especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sterptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Axelsson, 2004). Las bacterias lácticas son habitantes naturales de los seres humanos y otros animales. Viven en simbiosis con el huésped y se encuentran en todo el sistema digestivo, en las membranas de mucosas y la piel.

Algunos géneros de bacterias lácticas como por ejemplo los lactobacilos son de importancia tecnológica significativa, ya que están implicados en la fabricación de varios alimentos fermentados y no fermentados, y se han utilizado como probióticos debido a sus efectos positivos sobre la salud humana. Los lactobacilos probióticos se han asociado con la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como diarrea por rotavirus, diarrea asociada a antibióticos, y la diarrea del viajero, y también han sido sugeridos como potenciales agentes terapéuticos contra el síndrome del intestino irritable y la enfermedad inflamatoria intestinal (Lomax y Calder, 2009; Parkes *et al.*, 2009; Ruemmele *et al.*, 2009).

A continuación se describen las estructuras superficiales de bacterias lácticas, que permitirán explicar su eficiencia potencial en la biosorción de metales pesados.

## Pared celular

La pared celular de bacterias Gram-positivas, entre los que se encuentran los lactobacilos, es una rígida estructura exterior de la membrana plasmática que los protege de la lisis osmótica y sustancias tóxicas. Los mayores componentes de la pared celular son: una gruesa capa de peptidoglicano (mureina), ácidos teicoicos y lipoteicoicos, proteínas, polisacáridos y en algunas especies proteínas de capa S unidas a la capa de peptidoglicano (Schar-Zammaretti y Ubbink, 2003). Una representación esquemática de la pared celular se muestra en la **Figura 1**.



**Figura 1:** Pared celular de una bacteria Gram-positiva (Velez *et al.*, 2007).

El **peptidoglicano** de bacterias lácticas es una red que tiene un espesor de aproximadamente 20-80 nm y se compone de cadenas de polisacáridos lineales

de alternancia N- acetilglucosamina y ácido N-acetil-murámico, extensamente entrecruzados por dos péptidos cortos (Delcour *et al.*, 1999). Debido a esto, su estructura a modo de red es bastante dura y rígida y puede soportar las significativas fuerzas de estiramiento resultantes de las presiones altas de turgencia bacteriana, que pueden ser superiores a 20 atm (Jordan *et al.*, 2008).

Los **ácidos teicoicos** son una clase diversa de compuestos cuya estructura básica es un polímero lineal de polioliol (tal como glicerol) unidos por puentes fosfodiéster (Delcour *et al.*, 1999; Neuhaus y Baddiley, 2003). Ellos se unen covalentemente a la capa de peptidoglicano, mientras que los ácidos lipoteicoicos se anclan a la membrana plasmática. Representan más de la mitad del peso de la pared celular y son en gran medida responsables de la carga negativa de bacterias Gram-positivas. Esto se debe al hecho que los grupos fosfato son ácidos fuertes (Schar-Zammaretti y Ubbink, 2003).

Los **polisacáridos** pueden encontrarse como polisacáridos de la pared celular o ser secretados al ambiente extracelular. Los polisacáridos asociados con la pared celular bacteriana son generalmente neutros, aunque algunos también pueden ser ácidos, ya que pueden estar ramificados con subunidades aniónicas, en particular, fosfato de glicerol. A su vez los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS), pueden estar unidos covalentemente a la superficie de la célula en forma de cápsula (CPS) y/o ser liberados al medio circundante en forma de mucílago o *slime*. Los EPS pueden clasificarse de acuerdo a su composición química en homopolisacáridos (HoPS), compuestos por un solo tipo de carbohidrato como ser glucosa, fructosa o galactosa; o heteropolisacáridos (HePS) que contienen una combinación de azúcares neutros y otro tipo de residuos como N-acetil-aminoazúcares, glicerol, grupos fosfato, etc. (Delcour *et al.*, 1999; Mozzi *et al.*, 2006).

Las **proteínas de superficie** de capa S (proteínas de capa S) han sido encontradas en muchas bacterias lácticas del género *Lactobacillus* (Avall-Jääskeläinen y Palva, 2005). Las proteínas de capa S constituyen la capa más externa que envuelve la pared celular bacteriana. Están formadas por el ensamblaje regular de subunidades idénticas de proteínas o glicoproteínas, y

representa la proteína celular más abundante. Estas subunidades, generalmente dispuestas en forma de redes simétricas, con cavidades oblicuas, cuadradas o hexagonales, muestran una tendencia intrínseca a reensamblarse en arreglos bidimensionales luego de ser removidas y disgregadas durante el proceso de extracción con agentes caotrópicos como el cloruro de guanidinio o el LiCl (Mobili, *et al.*, 2009). Estas proteínas unidas no covalentemente tienen un tamaño de 40-200 kDa y son altamente básicas, con un punto isoeléctrico calculado que va desde 9 hasta 10.4 (Jakava-Viljanen *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2002; Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005). A pesar de la naturaleza básica, se ha encontrado que la carga superficial de las proteínas de capa S de *Lactobacillus* es negativa (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003). Una explicación de esto puede ser la implicación de las zonas cargadas positivamente de proteínas de capa S en su unión al peptidoglicano (Smit *et al.*, 2001).

De acuerdo a la información anterior, se deduce que la pared celular de bacterias lácticas contiene un gran número de grupos funcionales cargados negativamente, principalmente carboxilo y fosfato. Estudios electroforéticos han establecido que la carga superficial neta de bacterias lácticas es negativa a pH neutro (Pelletier *et al.*, 1997; Boonaert and Rouxhet, 2000; Schär-Zammaretti and Ubbink, 2003; Schär-Zammaretti *et al.*, 2005).

## **Remoción de compuestos tóxicos y bacterias patógenas por BAL**

Algunas de las propiedades beneficiosas de las bacterias lácticas están relacionadas con su capacidad de adherirse o unirse a diferentes sitios blanco.

En particular, se puede mencionar la capacidad de varias especies del género *Lactobacillus* para remover o unir contaminantes tóxicos de los alimentos y del agua, tales como las micotoxinas (Peltonen *et al.*, 2001), cianotoxinas (Nybom *et al.*, 2007), aminas heterocíclicas (Turbic *et al.*, 2002) y cationes de metales pesados (Halttunen *et al.*, 2008b, 2007). En este último caso, Halttunen *et al.* (2008a y b, 2007), publicaron varios trabajos donde se comprueba la eficacia de diferentes especies de lactobacilos en la remoción de cadmio y plomo.

Los efectos protectores de las bacterias lácticas han sido generalmente asociados a mecanismos tales como la competencia por la adhesión a sitios o fuentes nutricionales, la secreción de sustancias antimicrobianas, inactivación de toxinas y la estimulación del sistema inmune. En este sentido, Golowcycz *et al.*, (2007) observaron que la preincubación de *Salmonella* con la cepa coagregante *Lactobacillus kefir* CIDCA 8321 disminuye significativamente la capacidad de la *Salmonella* para invadir y adherir a las células intestinales Caco-2/TC-7. Por el contrario, la preincubación de *Salmonella* con la cepa no coagregante *L. kefir* CIDCA 83113 no presenta un efecto significativo sobre la capacidad invasiva de la *Salmonella* a las células epiteliales en cultivo.

Los antecedentes de remoción de metales por parte de diferentes biomasas inactivas y el efecto de las estructuras superficiales de las bacterias lácticas sobre determinadas propiedades de las bacterias enteras, inspiraron el desarrollo de este trabajo de tesis. Para su desarrollo se seleccionaron dos cepas de *L. kefir* con propiedades superficiales diferentes. En primer lugar se evaluó la tolerancia de crecimiento de ambas cepas al plomo, cadmio, zinc y níquel, así como también la capacidad de *L. kefir* para actuar como biosorbente de dichos metales del agua (capítulo 1). Luego se implementaron métodos basados en la espectroscopía Raman para el análisis de las estructuras bacterianas involucradas en dicha interacción (capítulo 2). Posteriormente, se definieron modelos de calibración multivariante para la cuantificación de plomo, cadmio, zinc y níquel adsorbidos a la superficie bacteriana (capítulo 2). En un paso posterior, se utilizó microscopía de fuerza atómica (AFM) para realizar un análisis topográfico de la estructura de las proteínas de capa S (las envolturas más externas en ambas cepas utilizadas) (capítulo 3). Finalmente, se determinó el tipo de interacción entre las proteínas de capa S y los iones metálicos estudiados. Se evaluaron los grupos funcionales involucrados en dicha interacción y la influencia de los iones metálicos sobre las estructuras secundarias de las proteínas de capa S. Para ello se pusieron a punto métodos basados en la espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR) (capítulo 3).

# Objetivos

El **OBJETIVO GENERAL** del presente trabajo fue evaluar la tolerancia de *Lactobacillus kefir* a plomo, cadmio, zinc y níquel y su rol como biosorbente de dichos metales pesados a nivel molecular.

Para el desarrollo de este Objetivo General se plantearon los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

- Evaluar la tolerancia de las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 a distintas concentraciones de plomo, cadmio, zinc y níquel durante el crecimiento.
- Estudiar la remoción de plomo, cadmio, zinc y níquel por parte de ambas cepas en condiciones de no crecimiento (biosorción).
- Caracterizar la adsorción de los distintos metales a las cepas de *L. kefir* a nivel molecular, mediante espectroscopia Raman.
- Poner a punto una metodología experimental para la cuantificación de metales pesados adsorbidos a *L. kefir* basada en espectroscopia Raman y análisis multivariante.
- Estudiar a nivel topográfico las proteínas de capa S de las cepas de *L. kefir*.
- Analizar la interacción entre iones metálicos con proteínas de capa S de *L. kefir* a nivel estructural.



# CAPÍTULO I

Efecto del plomo, cadmio, zinc y níquel sobre *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 en condiciones de crecimiento (tolerancia) y no-crecimiento (biosorción)

## INTRODUCCIÓN

La célula microbiana es un adsorbente natural para los iones metálicos debido a la naturaleza y composición de la pared celular (Blackwell *et al.*, 1995). Si bien numerosos géneros bacterianos han sido utilizados en la biosorción de metales pesados, la utilización de bacterias lácticas con este fin es más reciente (Wang y Chen, 2009). Así, para eliminar metales pesados de las aguas residuales industriales, generalmente han sido utilizadas biomásas microbianas fácilmente disponibles a partir de residuos de la industria farmacéutica o alimentaria. Sin embargo, no es posible utilizar la biomasa microbiana aislada de estos residuos en el campo de la tecnología de alimentos. En el procesamiento del agua potable y los alimentos, sólo pueden ser utilizados microorganismos con status GRAS (Generally Recognized as Safe), y las bacterias lácticas pertenecen a este grupo.

La contaminación de los alimentos y el agua por metales pesados continúa en aumento debido al incremento de la contaminación ambiental. Los metales pesados en los alimentos, incluso en concentraciones bajas, pueden acarrear efectos perjudiciales para la salud (Mudgal *et al.*, 2010). Al no ser degradables, cuando dichos metales entran en el organismo se acumulan en los tejidos en forma de complejos metálicos (Vinodhini *et al.*, 2008). Una vez en contacto con las células, los metales producen daño a nivel de la membrana celular, lo que conduce al aumento de su permeabilidad. Asimismo, los metales estimulan la producción de radicales libres que intervienen en reacciones redox en cascada, siendo tóxicos para la célula (Basaga, 1990).

Existen diversos métodos convencionales físicos y químicos para remover metales pesados del agua, tales como precipitación química, intercambio iónico, tecnologías de membrana, etc. Estos métodos son eficaces, pero generalmente dependen de la concentración de iones metálicos y además, son caros y no amigables con el medio ambiente (Zouboulis *et al.*, 2004).

En ciertos casos, los compuestos quelantes como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DMSA (ácido dimercaptosuccínico), DMPS (ácido

dimercapto-propansulfonato) pueden bloquear los efectos tóxicos de metales pesados cuando ya fueron absorbidos por el organismo (Blanuša *et al.*, 2005). A pesar de su demostrada eficacia, esta terapia puede ser potencialmente perjudicial para el organismo debido a que el blanco no sólo es el metal tóxico, sino también iones esenciales. Por otra parte, el método es también muy costoso, largo y especialmente difícil para niños pequeños (Mrvčić *et al.*, 2012).

La terapia antioxidante ha demostrado mejores resultados. En este sentido, el glutatión es un antioxidante con un papel fundamental en la desintoxicación, que tiene la capacidad de unirse a metales pesados y otras toxinas y eliminarlas del organismo (Mrvčić *et al.*, 2012). Sin embargo, no existe ningún método disponible para la eliminación de metales pesados de los alimentos. Por esta razón, la unión de metales pesados a las bacterias lácticas podría ser una solución prometedora para la eliminación de metales pesados del agua y alimentos líquidos, y también del propio organismo (Halttunen *et al.*, 2003, 2007, 2008a, b.; Ibrahim *et al.*, 2006; Schut *et al.*, 2011).

### **Tolerancia a metales pesados**

A diferencia de metales pesados como el plomo y el cadmio, algunos de ellos como el níquel y zinc, en concentraciones traza (0.1 mmol/L) son esenciales para algunos procesos celulares de los microorganismos. Éstos últimos ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes o cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar estructuras proteicas (Bruins *et al.*, 2000). Sin embargo, en concentraciones superiores ejercen un marcado efecto citotóxico, por lo que el mantenimiento de concentraciones adecuadas de estos metales constituye un factor importante para lograr la homeostasis celular (Silver, 1998).

En general, la propia bacteria presenta mecanismos de incorporación y exportación para un mismo ion metálico esencial. Muchos microorganismos contienen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados. Uno es rápido e inespecífico, expresado constitutivamente y utilizado por una

variedad de sustratos. Estos sistemas rápidos son generalmente dependientes del gradiente quimiosmático existente a través de la membrana citoplasmática bacteriana. El segundo tipo de sistema de captura posee una gran especificidad de sustrato, es más lento y generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía, además del gradiente quimiosmático. Este sistema consumidor de energía sólo se induce en la bacteria cuando ésta lo necesita, en condiciones nutricionales desfavorables o en alguna situación metabólica especial (Nies *et al.*, 1995).

Cuando un microorganismo se enfrenta a grandes concentraciones de algún metal pesado que es acumulado por el sistema inespecífico, el catión del metal pesado es transportado al citoplasma, a pesar de su elevada concentración, porque estos transportadores inespecíficos son expresados constitutivamente. Por consiguiente, no es posible cerrar esta entrada. Esta "puerta abierta" es la primera razón por la cual los iones metálicos pesados son tóxicos (Nies *et al.*, 1995). Cuando el gen que codifica este sistema transportador rápido e inespecífico se muta, las mutantes obtenidas son tolerantes a metales.

Una vez dentro de la bacteria, cuando estos elementos se encuentran en exceso, pueden formar enlaces coordinados con aniones bloqueando grupos funcionales de enzimas, inhibir sistemas de transporte, desplazar metales esenciales desde los sitios nativos de enlace e interrumpir la integridad de la membrana celular (Nies, 2003).

Así, los cationes de los metales pesados foráneos pueden interactuar con iones fisiológicos, inhibiendo sus funciones en la célula. En este sentido, el Cd(II) puede interactuar con el Zn(II) o el Ca(II), el Ni(II) y el Co(II) con el Fe(II) y el Zn(II) con el Mg(II). Dichos metales foráneos también tienden a unirse a grupos sulfhidrilo, lo cual origina la inhibición de la actividad de enzimas sensibles (Nies DH, 1999). La acumulación gradual de cationes metálicos tanto en sitios antropogénicos como en ecosistemas naturales, sumada a su toxicidad potencial y a la situación de "puerta abierta", han conducido al desarrollo de la homeostasis de metales pesados. Este fenómeno se debe a un proceso de adaptación espontánea al medio, debido al desarrollo

o adquisición de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las elevadas concentraciones de iones metálicos para la célula (Trajanovska *et al.*, 1997).

### **Unión de metales pesados a bacterias lácticas en condiciones de no crecimiento**

El proceso pasivo (metabólicamente no activo) de unión de iones metálicos a la superficie celular de diversos microorganismos entre los que se encuentran bacterias lácticas, se denomina **biosorción**. Se trata de un proceso complejo que incluye adsorción, intercambio iónico, complejación, quelación y microprecipitación (Blackwell *et al.*, 1995). Además, depende de las características de los iones metálicos, las propiedades de las cepas (como grupos funcionales disponibles de la superficie celular) y las características físico-químicas del medio ambiente (pH, temperatura, concentración de iones metálicos), tal como se describió en la Introducción general.

El modelo de Langmuir es el modelo más frecuentemente utilizado para describir isotermas de adsorción simples y para comparar el comportamiento de diferentes biosorbentes (bacterias). Para evaluar qué cepa es más eficiente en la biosorción de un determinado ion metálico, además de la capacidad de unión [ $q_{\max}$  (mg o mmoles de metal/g de biomasa)], se debe considerar la concentración inicial de iones metálicos y la afinidad de la biomasa por dichos iones (**b**).

Las cepas con alto valor de **b** (afinidad de la biomasa por el ion metálico) son más eficientes a bajas concentraciones iniciales de iones metálicos (por ejemplo, en el tracto gastrointestinal). Las cepas con mayor  $q_{\max}$  tienen un mayor potencial en algunos sistemas de contaminación industrial. Teniendo en cuenta lo anterior, varios autores observaron que ciertas cepas de bacterias lácticas pueden recomendarse para la eliminación *in situ* de metales pesados. Así, *Lactobacillus casei* Shirota (Halttunen *et al.*, 2007) es capaz de eliminar cadmio; y *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 (Halttunen *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2006),

*Bifidobacterium lactis* Bb12 y *Bifidobacterium longum* 2C (Halttunen *et al.*, 2007) son capaces de remover cadmio y plomo. *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* (Mrvčić *et al.*, 2009a y b) tienen buena capacidad para adsorber cobre y zinc. Es importante destacar que las biomasas químicamente modificadas o muertas como consecuencia de tratamientos térmicos, en la mayoría de los casos tienen una capacidad de eliminación igual o mayor que las bacterias vivas. Esto se debe a la mayor exposición de los componentes celulares bacterianos a la unión de metales, como por ejemplo la ruptura parcial de la capa de peptidoglicano (**Tabla 1.1**).

La unión de iones metálicos a bacterias lácticas es un proceso rápido: sólo es necesario de 5 min a 1 h para la unión eficaz de los iones metálicos en solución acuosa. Esto sugiere un proceso pasivo de superficie, independiente del metabolismo y no una acumulación dentro de la célula. No obstante, ha sido publicado que *L. mesenteroides* es capaz de acumular zinc en estas condiciones (Mrvčić *et al.*, 2009a). Desde el punto de vista económico, la reducida duración del proceso adquiere especial relevancia cuando se piensa en propósitos prácticos de aplicación.

**Tabla 1.1:** Biosorción de plomo, cadmio, zinc y níquel a bacterias lácticas.

Metal	Bacterias lácticas	Parametros de unión		Condiciones óptimas de operación		Referencias
		q <sub>max</sub> (mg/g)	b (L/mg)	pH	T (°C)	
Plomo	<i>L. plantarum</i> CCFM8661	49.5 53.0 <sup>a</sup>		5.0	28	Tian <i>et al.</i> (2012)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	107.4 <sup>a</sup> 46.8 <sup>b</sup>	0.05 0.09 <sup>b</sup>	5.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	<i>L. rhamnosus</i> LC-705	49.3 29.1 <sup>a</sup>	0.10 0.38 <sup>a</sup>	5.0	21	Ibrahim <i>et al.</i> (2006)
	<i>L. casei</i> Shirota	97.6 <sup>a</sup> 70.4 <sup>b</sup>	0.06 <sup>a</sup> 0.15 <sup>b</sup>	5.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	<i>L. fermentum</i> ME3	136.1 <sup>a</sup> 142.6 <sup>b</sup>	0.10 <sup>a</sup> 0.15 <sup>b</sup>	5.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	<i>B. lactis</i> Bb12	111.3 <sup>b</sup>	0.5 <sup>b</sup>	5.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	<i>B. longum</i> 2C	47.1 <sup>a</sup> 45.4 <sup>b</sup>	0.12 <sup>a</sup> 0.50 <sup>b</sup>	5.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	<i>B. longum</i> 46	175.7 <sup>a</sup> 93.8 <sup>b</sup>	0.03 <sup>a</sup> 0.33 <sup>b</sup>	5.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	<i>P. freudenreichii</i> JS	79.1 105.6 <sup>a</sup>	0.03 0.02 <sup>a</sup>	5.0	21	Ibrahim <i>et al.</i> (2006)
	Cadmio	<i>L. plantarum</i> CCFM8610	3.85 3.66 <sup>a</sup>		6.0	28
<i>L. rhamnosus</i> GG		12.5 <sup>a</sup> 13.2 <sup>b</sup>	0.32 <sup>a</sup> 0.18 <sup>b</sup>	6.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
<i>L. rhamnosus</i> LC-705		18.6 24.2 <sup>a</sup>	0.31 0.38 <sup>a</sup>	6.0	4-37	Halttunen <i>et al.</i> (2003) Ibrahim <i>et al.</i> (2006)
<i>L. casei</i> Shirota		19.0 <sup>a</sup> 12.1 <sup>b</sup>	0.51 <sup>a</sup> 0.51 <sup>b</sup>	6.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)

	<i>L. fermentum</i>	26.7 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	6.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
	ME3	28.4 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>			
	<i>B. lactis</i> Bb12	32.1 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>	6.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
		34.1 <sup>b</sup>	0.13 <sup>b</sup>			
	<i>B. longum</i> 2C	14.6 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	6.0	37	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
		13.7 <sup>b</sup>	0.33 <sup>b</sup>			
	<i>B. longum</i> 46	32.0 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	6.0	21	Halttunen <i>et al.</i> (2007a)
		54.7 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>			
	<i>P. freudenreichii</i>	65.8	0.03	6.0	21	Ibrahim <i>et al.</i> (2006)
	JS	52.4 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>			
<b>Zinc</b>	<i>L. mesenteroides</i>	27.10	0.4	5.0	32	Mrvčić <i>et al.</i> (2009a, b)
	<i>L. brevis</i>	20.7	0.50	5.0	32	Mrvčić <i>et al.</i> (2009a, b)
	<i>L. plantarum</i>	10.18	0.49	5.0	32	Mrvčić <i>et al.</i> (2009a, b)
<b>Níquel</b>	N.I.	-	-	-	-	-

Sin marca: biomasa viva.

<sup>a</sup> Biomasa muerta como consecuencia de tratamiento térmico.

<sup>b</sup> Bacterias liofilizadas.

N.I.: No Informado.

Los componentes de la pared celular tienen un papel esencial en la unión de iones metálicos (Blackwell *et al.*, 1995). La pared celular de las bacterias lácticas está formada principalmente por peptidoglicano, ácidos (lipo)teicoicos, proteínas y polisacáridos (Delcour *et al.*, 1999). El peptidoglicano se compone de cadenas lineales de polisacáridos, compuestos de unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil-murámico alternadas, y conectadas entre sí por medio de dos péptidos cortos. Los polisacáridos asociados con la pared celular bacteriana y los polisacáridos extracelulares de bacterias lácticas pueden ser neutros o ácidos. Debido a su abundancia y su presencia en la superficie exterior de la pared celular, se especula que los polisacáridos extracelulares y asociados a la pared celular determinan en gran medida las propiedades superficiales de los microorganismos, así como las propiedades funcionales tecnológicas y promotoras de la salud (Ruas Madieto, *et al.*, 2002). Por otra parte, las proteínas de capa S constituyen la capa más externa que envuelve la pared celular de varias especies de lactobacilos y representan las proteínas más abundantes (Frece *et al.*, 2005). Todas estas biomoléculas superficiales poseen numerosos grupos funcionales entre los que se encuentran carboxilatos, oxhidrilos, aminas, y fosfatos con diversas distribuciones de carga, por lo que podrían unir iones metálicos.

Existen diferentes metodologías analíticas capaces de dilucidar el papel de los diversos componentes de la pared celular en la unión de iones metálicos. Entre ellas, la espectroscopía vibracional, que incluye principalmente la espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR) y la espectroscopía Raman, constituye una herramienta poderosa que de acuerdo a nuestro conocimiento, no ha sido utilizada en gran medida con estos fines. La adsorción de metales en la superficie bacteriana es capaz de modificar el entorno, lo cual se refleja en alteraciones en los espectros (Plaza Cazón *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2005; Mrvčić *et al.*, 2009a). Teniendo en cuenta dichas alteraciones, así como la dependencia del pH de los iones metálicos en la interacción con dichas superficies, se ha propuesto que varios mecanismos reversibles, tales como el intercambio de iones (Halttunen *et al.*, 2007) o la formación de complejos de metales con grupos carboxilo y fosfato en la pared

celular (Ibrahim *et al.*, 2006) podrían estar involucrados en la interacción bacteria-metal. En el caso de las bacterias lácticas, los grupos hidroxilo de la capa de peptidoglicano y los grupos carboxilato de proteínas también juegan un papel importante en la unión de los iones metálicos (Mrvčić *et al.*, 2009a; Lin *et al.* 2005).

Los mecanismos de unión de iones metálicos a las bacterias lácticas no difieren de los mecanismos presentes en otras bacterias (Vijayaraghavan & Yun, 2008). Las diferencias más significativas están relacionadas con la capacidad de unión de iones metálicos debido a los grupos funcionales expuestos en la superficie de cada bacteria, así como también del área disponible para la interacción. Estos factores dependen de cada género y especie bacteriana y de su estado de división celular. Así, los factores que afectan la síntesis de la pared celular tienen un significativo impacto en el proceso de biosorción y la capacidad de unión de iones metálicos.

Además de la estructura de la pared celular, existen parámetros fisicoquímicos tales como la concentración inicial de iones metálicos, pH inicial, el tiempo de contacto, la concentración de biosorbente y variación de la temperatura que también pueden afectar al proceso de biosorción. El valor del pH es uno de los parámetros clave que influye en la biosorción. Así, variaciones en el pH inducen cambios en las propiedades químicas de iones metálicos y la actividad de grupos funcionales, así como la competencia entre cationes metálicos y protones por los sitios de unión a la pared celular. A pH bajo ( $\text{pH} \leq 3$ ) en presencia de alta concentración de  $\text{H}^+$  la unión de los iones metálicos es insignificante y cuando aumenta el pH hasta valores cercanos a 6, la unión de los iones metálicos también aumenta (Ibrahim *et al.*, 2006; Mrvčić *et al.*, 2009 a, b). En este rango de pH, los grupos carboxilo que participan en la unión al ion metálico están cargados negativamente lo que aumenta la eficiencia de los procesos. En soluciones de pH más elevado, puede ocurrir la disminución de la solubilidad y la precipitación de iones metálicos (Ibrahim *et al.*, 2006; Mrvčić *et al.*, 2009a, b; Schut *et al.*, 2011). De acuerdo a los autores que trabajaron con

bacterias lácticas, un pH de 5.0 es óptimo para la biosorción de metales (Halttunen *et al.*, 2007; Mrvčić *et al.*, 2009 a, b).

El aumento de la concentración de la biomasa microbiana incrementa el área de contacto y por lo tanto, el número de sitios de unión a metales (Ibrahim *et al.*, 2006; Mrvčić *et al.*, 2009 a,b). Generalmente, la unión de metales a una biomasa microbiana sigue un modelo lineal. Sin embargo, algunos autores han informado que la competencia entre los sitios de unión disponibles cuando las densidades de biomasa son elevadas o están auto- y/o co-agregadas ha causado la disminución en la capacidad de extracción específica del biosorbente (Halttunen *et al.*, 2008b). Además de la concentración, la eficiencia del proceso se ve afectada por el tamaño de partícula de biosorbentes, las partículas pequeñas tienen una mayor área de contacto y son más adecuadas para el proceso de biosorción. La biosorción es más eficiente cuando la concentración inicial de iones metálicos en solución y la velocidad de mezclado son elevadas.

## **Interacción Hospedador con Metales**

### **Biosorción del metal en el cuerpo humano**

Se sabe que en los ecosistemas ambientales existe una intrincada interacción entre los contaminantes metálicos y los microorganismos nativos. Estos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia únicos que les permiten sobrevivir y, en algunas instancias eliminar o reducir las concentraciones de contaminantes en sus entornos. Con nuestro organismo como huésped de una gran población microbiana en áreas como la cavidad oral o el tracto gastrointestinal, ¿qué papel puede jugar la microbiota en la interacción con metales, una vez que entran en el organismo? La microbiota intestinal es la comunidad microbiana que tiene mayor contacto con los metales y otros contaminantes ingeridos a través de la dieta. Esta microbiota contiene al menos dos órdenes de magnitud más de genes que los que forman parte del

genoma humano (Qin *et al.*, 2010), por lo tanto la diversidad genética y enzimática es inmensa. Estos microorganismos desempeñan un papel clave en la regulación de la digestión al proporcionar enzimas requeridas para la descomposición metabólica, así como también el procesamiento y metabolismo de compuestos que entran en el huésped a través de una dieta normal (Martens *et al.*, 2011; Serino *et al.*, 2011). La mayor población de especies bacterianas se encuentra desde el intestino delgado al intestino grueso (Turroni *et al.*, 2009), que es el sitio principal de la degradación metabólica y la absorción de nutrientes. Por lo tanto, es posible que los metales incorporados y liberados durante el metabolismo puedan ser secuestrados por la microbiota endógena, la cual impedirá la absorción de los metales en el huésped.

Una de las mayores evidencias de esta protección intrínseca es el hecho de que muchos de los metales tóxicos, como plomo, cadmio y mercurio, se consumen en concentraciones mucho más elevadas que las que en realidad se detectan en muestras de sangre y cabello de los individuos expuestos (Fierens *et al.*, 2007; Zubero *et al.*, 2010). La biodisponibilidad relativa de los contaminantes ingeridos después de la exposición oral se calcula tradicionalmente mediante experimentos con animales que controlan el porcentaje de una dosis ingerida absorbida en la sangre (Diamond *et al.*, 1998). La bio-accesibilidad de contaminantes se refiere a la fracción porcentual de un contaminante ingerido que se libera en fluidos gastrointestinales simulados (Rodriguez *et al.*, 1999). La primera prueba base de extracción fisiológica, para calcular la bio-accesibilidad de plomo desde suelos contaminados fue desarrollada en un modelo *in vitro* gastrointestinal (GI) que simula las condiciones físicas, químicas y enzimáticas del tracto GI humano (Ruby *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta que antes de la absorción de los contaminantes a través del epitelio GI es necesaria su disolución, la bio-accesibilidad es considerada como un factor de predicción de la biodisponibilidad *in vivo* (Oomen *et al.*, 2003). Uno de los modelos más aceptados y reciente de la biodisponibilidad es el Simulador del Ecosistema Humano Microbiano Intestinal (SHIME), un modelo GI *in vitro* único porque incorpora la actividad de la microbiota GI humana (Boever *et al.*, 2000; Van de Wiele *et al.*, 2007). No hay

otras pruebas o modelos estándar que tengan en cuenta el efecto de la microbiota GI humana en la alteración de la biodisponibilidad de los metales.

El secuestro microbiano de metales por la microbiota intestinal es fuertemente respaldado por diversos estudios en los cuales se han determinado diferencias significativas en la concentración de contaminantes antes y después de ser consumidos. Aproximadamente el 40-60% de la cantidad total de metales originalmente ingeridos nunca es absorbido a través de la barrera intestinal (Wester *et al.*, 1992). Esta variación en la bio-accesibilidad es única para cada metal y depende de la vía de entrada, de los alimentos que se consumen y del tipo de microbiota del huésped (Sun *et al.*, 2012). Si bien el sistema SHIME ha sido importante para demostrar el efecto de la microbiota intestinal en la liberación de metales biodisponibles, aún no ha sido respondida la pregunta acerca del rol de la microbiota intestinal en la unión de metales y secuestrantes y en la protección del huésped.

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos principales de resistencia bacteriana es la capacidad de unirse a metales. Han sido descritos tres mecanismos de unión de metales a las paredes celulares bacterianas: i) reacciones de intercambio iónico con el peptidoglicano y los ácidos teicoicos, ii) la precipitación a través de reacciones de nucleación, y iii) la formación de complejos con ligandos de nitrógeno y de oxígeno (Beveridge *et al.*, 1980).

El phylum *Firmicutes* representa una gran parte de la microbiota en el colon (Zoetendal *et al.*, 2006). Se compone en gran parte de las bacterias Gram-positivas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, y también *Lactobacillus* (Vrieze *et al.*, 2010). Así, en el tracto intestinal humano hay grandes poblaciones de células bacterianas potencialmente capaces de unir y secuestrar los metales que ingresan en el organismo.

La desintoxicación es el proceso por el cual se remueven o eliminan drogas, mûgatenos y otros agentes tóxicos del organismo. En cambio la detoxificación es el mecanismo de prevención de entrada de compuestos perjudiciales en el organismo, y por lo general se produce en el tracto GI, hígado y riñones antes de que los compuestos puedan diseminarse y llegar a sitios donde sean

perjudiciales (Jin *et al.*, 2009; Berhane *et al.*, 1994). En este proceso, la microbiota intestinal, que contiene bacterias potencialmente probióticas, puede tener un rol importante, evitando el ingreso de metales al organismo y consecuentemente, protegiendo al huésped.

## **Los metales y la microbiota intestinal**

Los constituyentes de la microbiota intestinal se ven afectados por metales como el plomo, el cadmio, mercurio, lo que lleva a un estado disbiótico (Coolon *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas especies de lactobacilos podrían usarse como adyuvantes en el tratamiento de la toxicidad de metales en seres humanos, ya que dichos microorganismos poseen mecanismos de resistencia eficaces en la prevención del daño celular generado por metales tóxicos (Tian *et al.*, 2012). Además, el género *Lactobacillus*, junto con algunos otros géneros o especies bacterianas, han demostrado ser capaces de unir y secuestrar metales tóxicos en sus superficies celulares, eliminándolos del ambiente (Robinson *et al.*, 1984). En general, los genes de resistencia a metal y a antibióticos son codificados en el mismo plásmido y la exposición a antibióticos y metales ejerce una presión selectiva sobre los portadores de estos plásmidos para mantener esta información genética. La exposición a los metales es un hecho cotidiano en el ambiente intestinal y las especies que tienen mecanismos de resistencia a metales probablemente se adaptan mejor (Devirgiliis *et al.*, 2011).

Los lactobacilos constituyen una población importante de la microbiota intestinal, contribuyendo a la homeostasis y la inhibición del crecimiento de patógenos. Dado su largo historial de uso seguro en productos alimentarios y como probióticos, su consumo se ha incrementado en los últimos años. La contaminación por metales sigue siendo un problema de la salud pública y la mayor puerta de entrada al organismo continúa siendo la dieta. En este sentido,

tiene gran importancia la capacidad de los lactobacilos para reducir el estrés oxidativo causado por la toxicidad de los metales *in vitro* (Bhakta *et al.*, 2012; Koller *et al.*, 2008) y la capacidad de desintoxicación contra otras toxinas de la dieta (Stidl *et al.*, 2008). La capacidad de los lactobacilos para unir y secuestrar metales depende de los mecanismos de resistencia de cada cepa. Las bacterias que tienen la capacidad de exportar metales disminuyen el daño mediante la reducción de su concentración celular de metales. Sin embargo, este mecanismo no es ideal para la desintoxicación del tracto gastrointestinal, ya que resulta en un movimiento cíclico del metal. Mientras que la bacteria bombea estos metales de nuevo hacia el lumen intestinal, el proceso de captación de metales, transcripción de los genes necesarios y generación de todas las proteínas necesarias para una concentración lo suficientemente alta lleva tiempo. Durante este tiempo, el metal está atrapado dentro de la bacteria, mientras que el microorganismo se está moviendo al intestino bajo hacia la eliminación a través de la defecación. Posiblemente la especie bacteriana ideal para la desintoxicación es la que carece de los genes que codifican transportadores de metal y por lo tanto sólo se unen y secuestran metales pesados. Esto, en teoría, podría reducir la concentración de metal en el tracto intestinal y reducir la disponibilidad de los metales para la absorción en el huésped (Monachese *et al.*, 2012b).

Por todas estas razones el análisis de la interacción de los lactobacilos con metales es importante para entender la toxicología de los metales y para el desarrollo de tratamientos naturales que contribuyan a su detoxificación.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Microorganismos utilizados

En el presente trabajo se utilizaron microorganismos de la especie *Lactobacillus kefir*. *L. kefir* CIDCA 8348 aislada a partir de gránulos de kefir del CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos), y la cepa de colección *L. kefir* JCM 5818 (obtenida de la *Japan Collection of Microorganisms*). Ambas se seleccionaron por tener diferentes propiedades superficiales (capacidad de agregación y co-agregación), reconocimiento por anticuerpos y estructura de las proteínas de capa S. (**Tabla 1.2**)

**Tabla 1.2:** *L. kefir* empleadas y sus propiedades superficiales

Cepa	% H	CtA	CtC	Ht	Mr de Capa S (KDa)	%Adh
<i>L. kefir</i>						
CIDCA 8348	83.0 ± 1.0	40.0 ± 5.0	23.1 ± 9.8	+	66 ± 1	4.5 ± 1.3
JCM 5818	80.0 ± 5.0	0	0	-	69 ± 1	ND

**%H:** Porcentaje de hidrofobicidad determinado por partición en haxadecano (Pérez *et al.*, 1998).

**CtA:** Coeficiente de autoagregación.  $CtA = [1 - (DO_t/DO_i)] \times 100$ , donde  $DO_t$  es la densidad bacteriana a 550 nm a tiempo = 0 min, y  $DO_t$  es la densidad óptica a tiempo = 60 min. (Golowczyc *et al.*, 2007).

**CtC:** Coeficiente de coagregación de *L. kefir* con *Salmonella* sp.  $CtC = [1 - (DO_t/DO_i)] \times 100 - CtA$ .

**Ht:** Habilidad de aglutinar glóbulos rojos (Garrote *et al.*, 2004).

**Mr:** Masa molecular relativa de las proteínas de capa- S.

**% Adh:** Porcentaje de adhesión a células Caco-2/TC-7 calculado como: (número de lactobacilos adheridos/ número de lactobacilos adicionados a la fosa) x 100 (Golowczyc *et al.*, 2008).

**ND:** no determinado.

## 2. Medios de cultivo, soluciones buffer y soluciones de metales

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos (salvo indicación contraria).

### Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe, 1960), Biokar Diagnostics, Beauvais, France

peptona universal	10.0 g/L
extracto de carne	5.0 g/L
extracto de levadura	5.0 g/L
D(+) glucosa	20.0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g/L
Tween 80	1.0 g/L
citrato ácido de amonio	2.0 g/L
acetato de sodio	5.0 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.1 g/L
MnSO <sub>4</sub>	0.05 g/L
pH = 6.5 ± 0.1	

### Caldo LAPTg (Raibaud, P. *et al.* 1961)

peptona	15 g/L
extracto de levadura	10 g/L
triptona	10 g/L
glucosa	10 g/L
Tween 80	1 g/L
agua destilada	c.s.p. 1 litro
pH final= 6.6	

### Medios sólidos

Los medios agarizados se obtuvieron a partir de los caldos homónimos, suplementados con 1.5% (p/v) de agar.

## Medio diluyente

Agua peptona (peptona 1 g; agua destilada, c.s.p. 1 litro). Se utilizó para preparar diluciones decimales de los cultivos para el recuento de microorganismos viables en medios sólidos.

## Buffer PBS

NaCl	8.02 g/L
KCl	0.23 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.17 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g/L
pH = 7.4 ± 0.2	

## Coloración de Gram

### Materiales:

Cristal violeta: 10 g/L en agua destilada.

Safranina (solución madre): 25 g/L en etanol.

Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10.

Lugol: 10 g I<sub>2</sub> + 20 g KI en 1 litro de agua destilada.

Decolorante: etanol-acetona 4:1.

Las soluciones se filtran antes de utilizarlas.

### Protocolo:

	Tiempo de exposición (seg)
Cristal violeta	120
Lugol	60
Lavado con agua	

Decolorante	10
Lavado con agua	
Safranina	120

### **Soluciones de metales**

Las soluciones madre de metales se prepararon a partir de las siguientes sales comerciales en agua Milli Q:

Plomo de  $Pb(NO_3)_2$  marca FLUKA (Chemie GmbH, Suiza)

Cadmio de  $Cd(NO_3)_2$  marca Baker (Phillipsburg, New Jersey, USA)

Niquel de  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  Fluka (Chemie GmbH, Suiza)

Zinc de  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  Fluka (Chemie GmbH, Suiza)

### **3. Condiciones de cultivo y crecimiento de las bacterias**

Las cepas de *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818 se activaron al 2 % en medio MRS a 30 °C en aerobiosis durante 48 horas. Estos cultivos iniciales se repicaron al 2 % en medios de cultivo frescos de LAPTg o MRS, y se incubaron a 30 °C en aerobiosis sin agitación durante 48 h.

### **4. Tolerancia de *L. kefir* a distintas concentraciones de metales**

Una vez reactivadas las cepas, se realizaron cinéticas de crecimiento en placas de 96 fosas (Greiner Bio-one, Alemania). Las cepas de *L. kefir* se crecieron en medio MRS diluido a la mitad de su concentración original. Se adicionó al medio MRS, diferentes concentraciones de los cationes  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en el rango 10-0.02 mM y en el rango 1-0.002 mM para el caso del ion  $Cd^{2+}$ . Luego, cada fosa se inoculó con las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818 al 2 %. Se utilizaron fosas sembradas sólo con las bacterias y sólo con los metales como controles. Las placas se incubaron durante 76 h a 30 °C; realizándose lecturas de DO a 600 nm en intervalos de 4 h a 10 h.

#### 4-a Cálculo de la dosis-respuesta (EC50)

Se consideró la DO de la bacteria crecida en medio de cultivo en ausencia de metal (control) como 100 % de crecimiento. Posteriormente, se multiplicó por 100 la DO de la bacteria crecida en presencia de distintas concentraciones de metal luego de 55 h de crecimiento (fase estacionaria) y el valor obtenido se dividió por la DO del control de la manera siguiente:

$$\%DO = \frac{DO_{bacteria/Me} * 100}{DO_{control}} \quad (I.1)$$

donde  $DO_{bacteria/Me}$  es la DO de la bacteria crecida en presencia de distintas concentraciones de metal luego de 55 h de crecimiento (fase estacionaria) y  $DO_{control}$  es la DO del control.

Esto permitió obtener una gráfica de % de DO vs  $\log_{10}$  de las concentraciones de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  para cada cepa de *L. kefir*. A partir de este gráfico se determinó la concentración efectiva 50 (EC50), definida como la concentración de ion metálico que produce un 50 % de inhibición en el crecimiento bacteriano.

Para ello se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, 2007) que emplea la ecuación log (inhibidor) vs respuesta con pendiente variable:

$$EC50 = \frac{DO_i + (DO_m - DO_i)}{1 + 10^{[(\log EC50 - X) * P]}} \quad (I.2)$$

donde **EC50** es la concentración efectiva cincuenta; **DO<sub>i</sub>** es el porcentaje de DO a 600 nm mínima referida a la DO del control; **DO<sub>m</sub>** es el porcentaje de DO a 600 nm máxima referida a la DO control; **X** es la concentración de metal usada y **P** es la pendiente de la gráfica.

#### **4-b Observación microscópica de las bacterias crecidas en presencia de metales**

Para evaluar el efecto de la exposición a los metales sobre la morfología y/o de agrupación en los lactobacilos, se realizaron observaciones al microscopio óptico (1000X). Para ello, se seleccionaron las EC50 de cada metal y se incubó cada bacteria en MRS durante 48 h a 30 °C. En el caso del plomo se usó una concentración de 10 mM (la máxima concentración ensayada en las curvas de tolerancia). Las muestras fueron posteriormente fijadas sobre un portaobjeto a 37 °C durante 20 min y teñidas usando sólo cristal violeta para lograr un efecto de contraste y evitar al máximo la manipulación del cultivo.

#### **5. Ensayos de unión a iones metálicos (biosorción)**

Se realizó un ensayo general de biosorción para determinar la retención bacteriana de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  en condiciones de no crecimiento. Las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 fueron crecidas en MRS y una vez alcanzada la fase estacionaria, se realizaron los ensayos de biosorción. Para ello, se usaron alícuotas de 1 mL de cultivo equivalentes a 1 mg de peso seco de biomasa (aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  UFC/ mL), los cuales fueron cosechados y lavados dos veces con agua milli Q (Milli-Q plus; Millipore Cop., USA). Los pellets obtenidos se resuspendieron en 1 mL de soluciones de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  en el rango 0 – 1.2 mM (pH 5.5).

Las suspensiones de bacterias se incubaron 1 h (de acuerdo a ensayos preelimanres y bibliografía) a 30 °C y luego se centrifugaron a 6600 g durante 4 min.

Los pellets se conservaron para ser analizados por Espectroscopia Raman (ver capítulo II) y los sobrenadantes se usaron para determinar la concentración de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  adsorbidos mediante kit colorimétricos (MERCK y Macherey-Nagel, Alemania).

## 5.a Cálculo de los parámetros de la isoterma de biosorción

Se determinó la concentración de iones metálicos adsorbidos por las cepas de *L. kefir* usando la isoterma de Langmuir descrita en la siguiente ecuación (Davis *et al.*, 2003):

$$q = q_{max} [b C_f / (1 + b C_f)] \quad (I.3)$$

donde **Cf** es la concentración de metal libre en el equilibrio (mM de metal); **q** es la concentración de metal unido en el equilibrio (mmoles de metal/g de biomasa seca); **q<sub>max</sub>** es la capacidad máxima de unión (mmoles de metal/g de biomasa seca) y **b** es la constante de afinidad (L/mmoles de metal).

Los parámetros *q<sub>max</sub>* y *b* fueron estimados utilizando la función SOLVER del Programa Excel, Microsoft Office 2007.

## 5.b Cuantificación de metales utilizando kits colorimétricos

**Plomo:** Los iones Pb<sup>2+</sup> en solución alcalina reaccionan con el 4-(2-piridilazo)-resorcina (PAR) formando un complejo rojo que puede determinarse espectrofotométricamente a 520 nm (Spectroquant Lead Test, MERCK Alemania).

**Cadmio:** El método se basa en la reacción de iones Cd<sup>2+</sup> presentes en el sobrenadante con la ditizona para dar un complejo de ditizonato de cadmio de color rojo el cual se extrae con cloroformo y se cuantifica colorimétricamente a una longitud de onda de 520 nm (Test Nanocolor Cadmio, Macherey-Nagel, Alemania).

**Zinc:** La determinación se basa en la reacción de iones Zn<sup>2+</sup> con 2-carboxi-2-hidroxi-5-sulfoformazylbenceno (zincon) para formar un complejo azul oscuro que se determina a una longitud de onda de 620 nm (Test Nanocolor Zinc, Macherey-Nagel, Alemania).

**Níquel:** Se basa en la detección fotométrica a 445 nm de iones  $\text{Ni}^{2+}$  mediante dimetilglioxima formando un complejo rojo-rosado (Test Nanocolor Níquel, Macherey-Nagel, Alemania).

En todos los casos se usó un espectrofotómetro UV-visible (Helios Gamma, Thermo Spectronics, USA).

## **6. Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)**

Para esta observación se seleccionaron las muestras de bacterias de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 luego de haber interactuado con una concentración de plomo  $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$  de 0.9 mM, tal como se indicó en la sección 5. Las muestras (pellets resultantes de la interacción bacterias-plomo) se fijaron en glutaraldehído al 2% (p/v) en buffer fosfato (pH 7.2-7.4) durante 2 horas a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4 °C y posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación microscópica de transmisión se realizó con un Microscopio Philips EM 301 (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina). La magnificación empleada fue de 26.000x, 46.000x y 100.000x.

## **7. Análisis Estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. El análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de los iones de metales removidos se llevó a cabo para ambas cepas y para todos los tratamientos, usando el programa estadístico IsnfoStat 2008 (InfoStat / Estudiantil, Grupo Infostat / FCA. Universidad Nacional Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina).

La comparación de medias se realizó utilizando el método de Tukey, y si  $p < 0.05$ , la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

## RESULTADOS Y DISCUSION

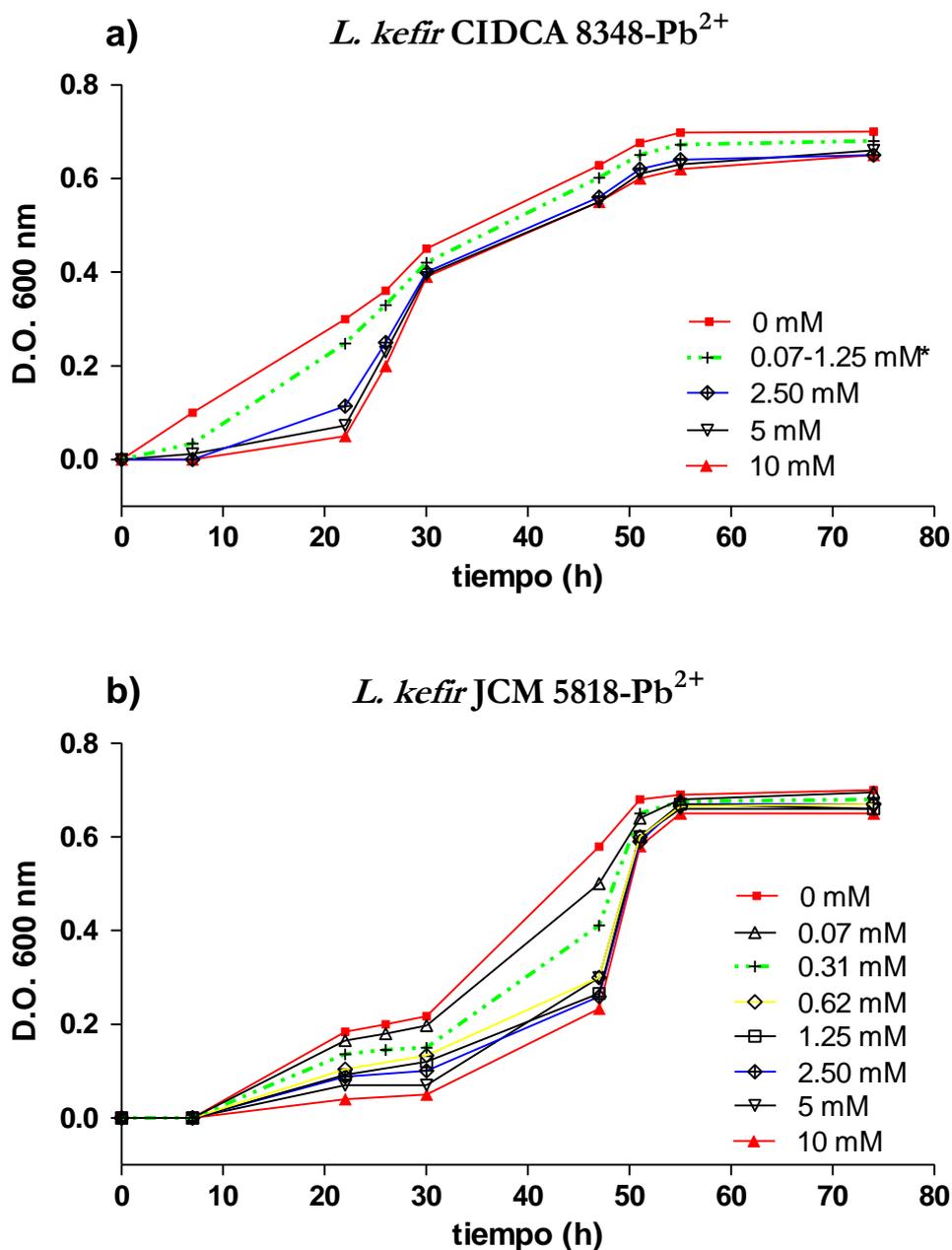
### TOLERANCIA

#### Tolerancia de *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818 a distintas concentraciones de $Pb^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Zn^{2+}$ y $Ni^{2+}$

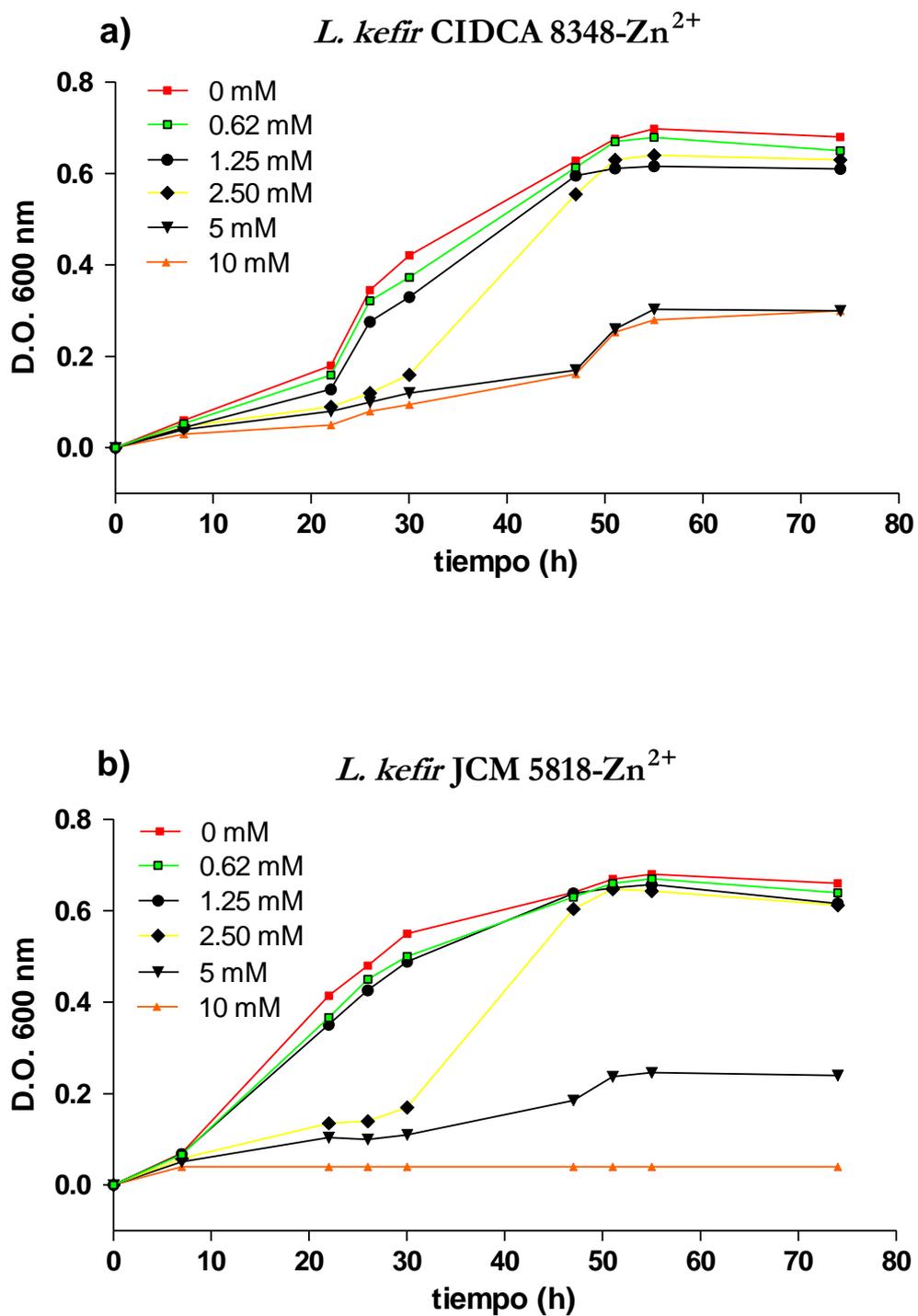
El primer paso de este trabajo fue evaluar la tolerancia de las cepas de *L. kefir* a metales pesados como plomo, cadmio, zinc y níquel.

Para ello se crecieron las cepas CIDCA 8348 y JCM 5818 en tres medios de cultivo diferentes. En primer lugar se utilizó el medio MRS (De Man, Rogosa, Sharpe, 1960), preparado en una concentración 55g/L a partir del medio comercial deshidratado. Sin embargo, luego de adicionar  $Pb^{2+}$  al medio de cultivo se observó precipitación, debida probablemente al alto contenido de proteínas, lo cual interfiere en la medición de densidad óptica bacteriana. Por esta razón, se ensayó con otro medio de cultivo, el LAPTg (Raibaud *et al.*, 1961), que es un medio más pobre que el MRS. Si bien el LAPTg ya ha sido utilizado para el crecimiento de bacterias lácticas (Juárez Tomás *et. al.*, 2003), el crecimiento bacteriano en ausencia de metales fue menor al observado en MRS, posiblemente debido al menor contenido de proteínas y sales. Es por esto que finalmente se probó el medio MRS diluido a la mitad de su concentración original, que contiene una concentración de proteínas y sales mayor que la del LAPTg. En el medio MRS diluido a la mitad se observó buen desarrollo bacteriano y no hubo precipitación de ningún metal, por lo que fue el medio seleccionado para los ensayos de tolerancia.

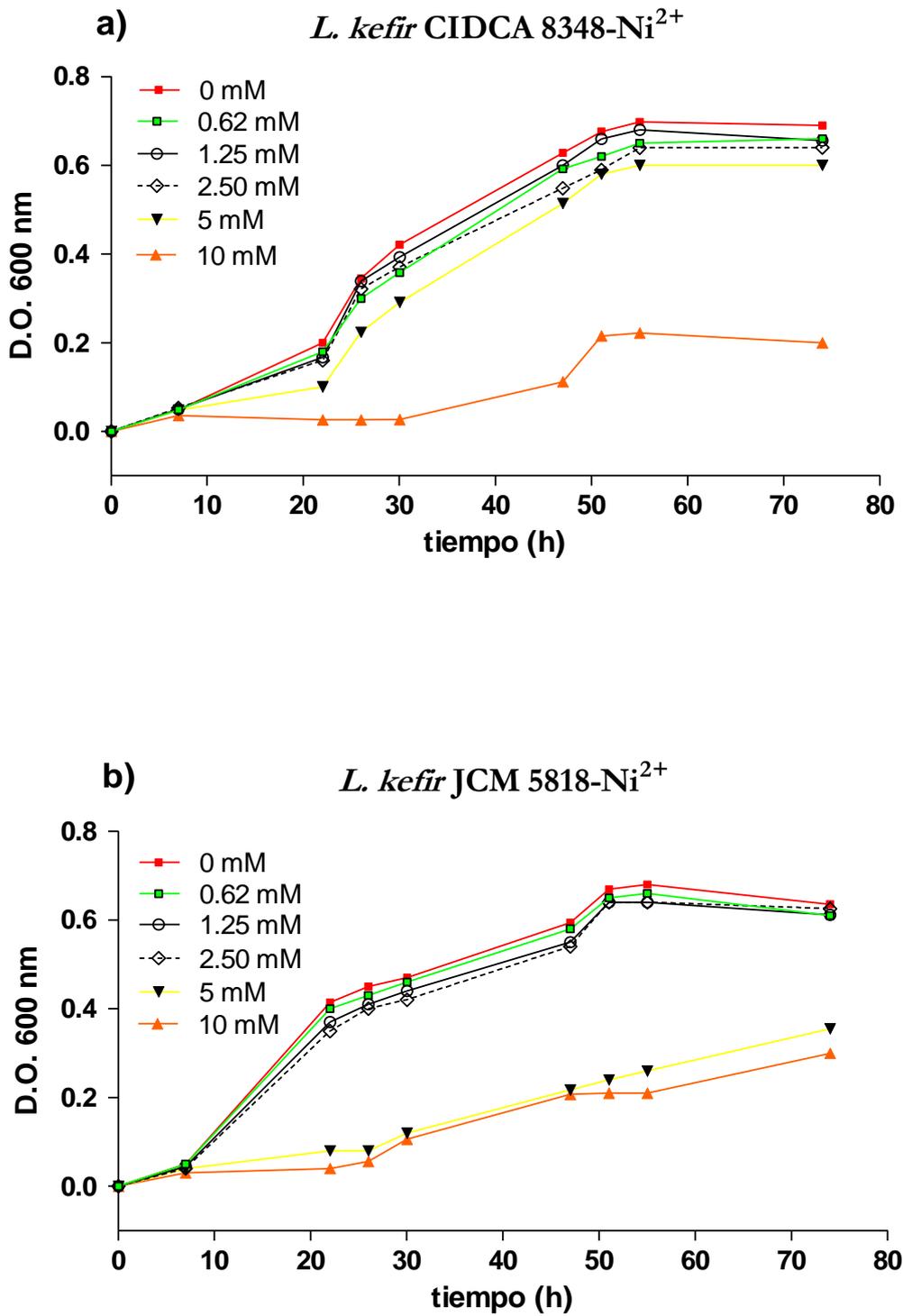
En las **Figuras 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4** se muestran las cinéticas de crecimiento de *L. kefir* CIDCA 8348 (**a**) y *L. kefir* JCM 5818 (**b**) en presencia de distintas concentraciones de  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ .



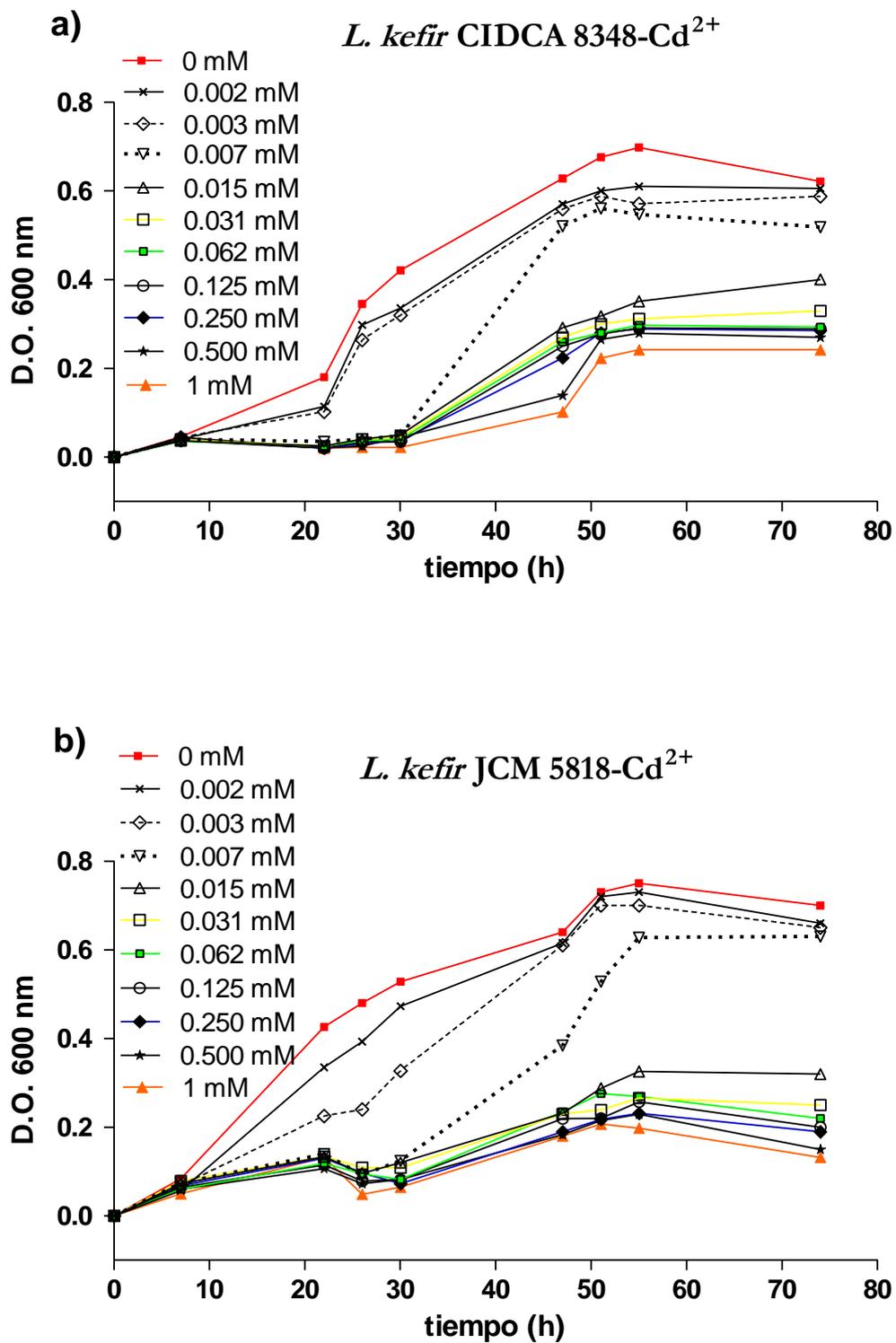
**Figura 1.1:** Curva de crecimiento de *L. kefir*. CIDCA 8348 **a)** y JCM 5818 **b)** en presencia de concentraciones de Pb<sup>2+</sup> de 0.07 a 10 mM. \*Rango de concentraciones en el cual las curvas se superponen. Para facilitar la visualización, sólo se presenta una de las curvas obtenidas en ese rango de concentraciones.



**Figura 1.2:** Curva de crecimiento de *L. kefir*: CIDCA 8348 **a)** y JCM 5818 **b)** en presencia de concentraciones de Zn<sup>2+</sup> 0.62 a 10 mM.



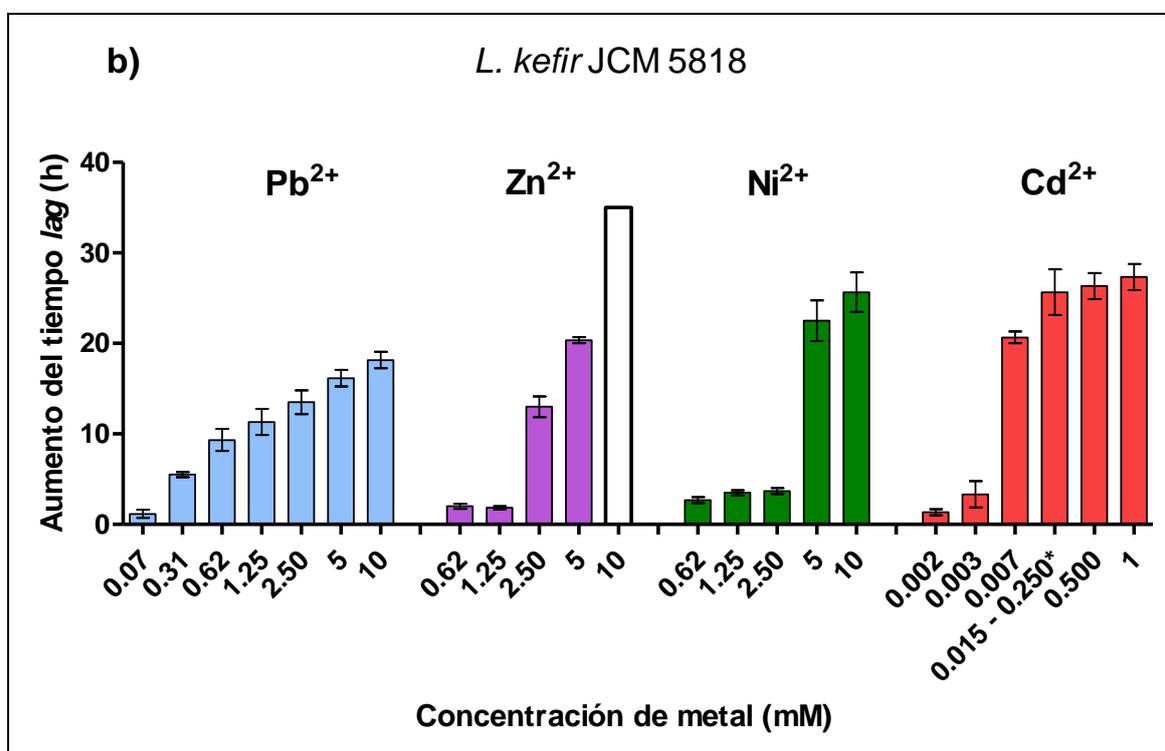
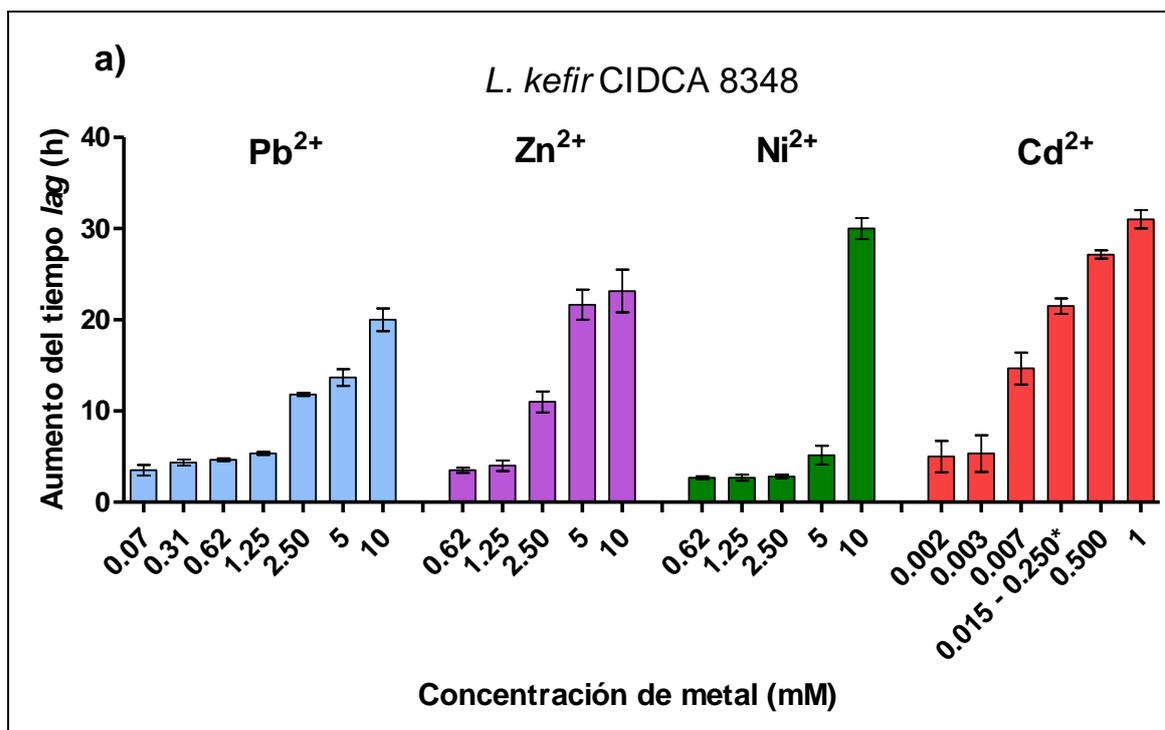
**Figura 1.3:** Curva de crecimiento de *L. kefir*: CIDCA 8348 a) y JCM 5818 b) en presencia de concentraciones de Ni<sup>2+</sup> 0.62 a 10 mM.



**Figura 1.4:** Curva de crecimiento de *L. kefir*: CIDCA 8348 **a)** y JCM 5818 **b)** en presencia de concentraciones de Cd<sup>2+</sup> 0.002 a 1 mM.

Ambas cepas de *L. kefir* fueron capaces de crecer en presencia de los distintos iones metálicos ensayados, aunque el nivel tolerado fue variable. El  $\text{Pb}^{2+}$  produjo un retardo considerable en la cinética de crecimiento para ambas cepas, sin cambios significativos en la biomasa total después de 76 h de crecimiento, aun en concentraciones de 10 mM (**Figura 1.1**). En el caso del  $\text{Zn}^{2+}$ , ambas cepas toleraron concentraciones de hasta 2.5 mM sin una disminución de la biomasa total en la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$  de 10 mM inhibieron el crecimiento de *L. kefir* JCM 5818 (**Figura 1.2**). En el caso del  $\text{Ni}^{2+}$ , las concentraciones máximas toleradas sin disminución de la biomasa fueron de 5 mM y 2.5 mM para *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818, respectivamente (**Figura 1.3**). Por su parte, el  $\text{Cd}^{2+}$  demostró ser el más tóxico de los metales analizados, ya que ambas cepas de *L. kefir* sólo toleraron concentraciones menores que 1 mM (**Figura 1.4**).

Es importante mencionar que para todas las cinéticas de crecimiento, existe una concentración de metal a partir de la cual el crecimiento es retardado. Este retardo abrupto en el crecimiento bacteriano se refleja claramente cuando se grafica el tiempo *lag* (período de adaptación a las condiciones de crecimiento) en función de las concentraciones de metales (**Figura 1.5 a y b**).

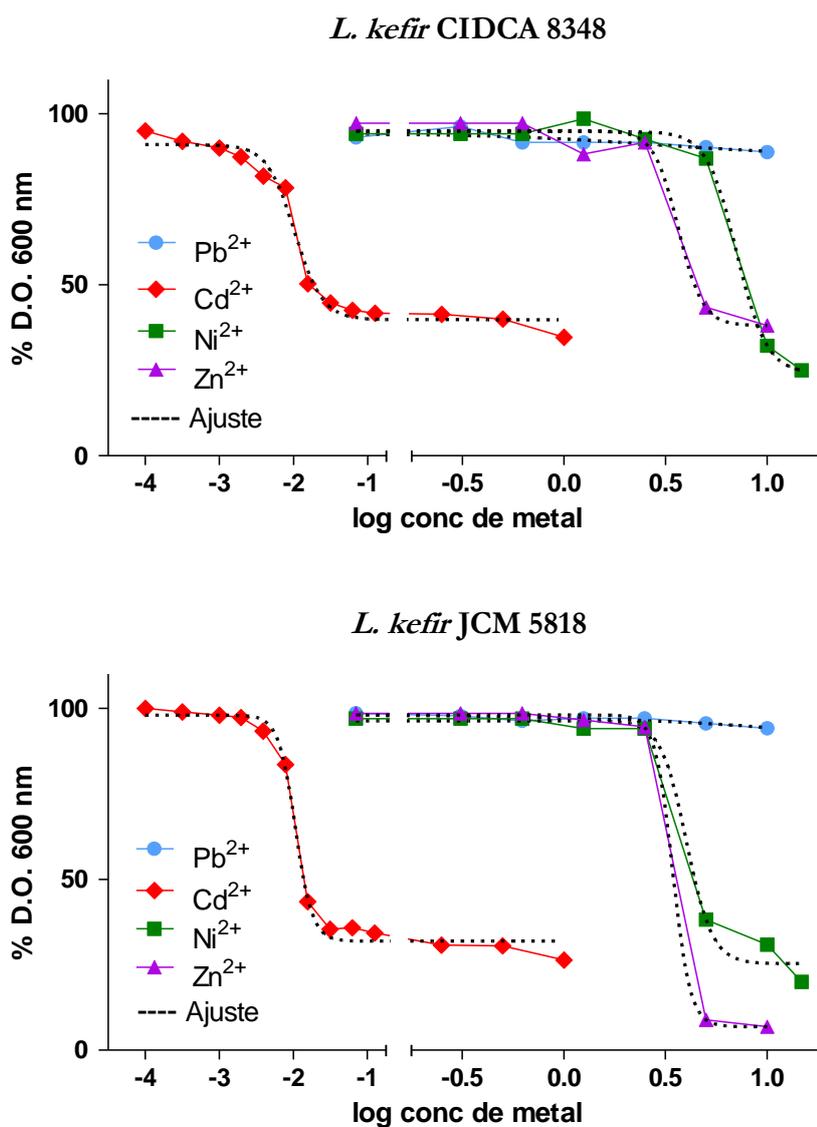


**Figura 1.5:** Aumento del tiempo *lag* con respecto a los controles (bacterias crecidas en ausencia de metales) de *L. kefir*. (a) CIDCA 8348 y (b) JCM 5818 crecidas en medio MRS diluido a la mitad en presencia de distintas concentraciones de Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>. Los resultados se obtuvieron a partir de tres ensayos independientes. □ Indica inhibición del crecimiento. \*Rango de concentración en el que el tiempo *lag* fue similar.

En términos generales, *L. kefir* CIDCA 8348 presenta menores tiempos *lag*, que *L. kefir* JCM 5818, es decir, se adapta más rápidamente al crecimiento en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , y  $\text{Cd}^{2+}$ .

En la mayoría de los casos se observó un incremento abrupto del tiempo *lag* a partir de un valor determinado de concentración de metal. En el caso del  $\text{Pb}^{2+}$  este incremento ocurre entre 1.25 y 2.5 mM para *L. kefir* CIDCA 8348 y entre 0.07 y 0.31 mM para *L. kefir* JCM 5818. En el caso del  $\text{Zn}^{2+}$ , dicho aumento se presenta entre 2.50 y 5 mM y entre 1.25 y 2.50 mM para *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818, respectivamente. El  $\text{Ni}^{2+}$  por su parte, fue el metal que produjo el salto más abrupto del tiempo *lag* (entre 5 y 10 mM para *L. kefir* CIDCA 8348 y entre 2.5 y 5 mM para *L. kefir* JCM 5818). Con respecto al  $\text{Cd}^{2+}$ , se observó un aumento importante del tiempo *lag*, pero en un rango de concentraciones mucho más bajas (0.002-1mM) que para los otros metales (0.625 a 10 mM).

Otro parámetro importante a estudiar en relación a la tolerancia de los metales pesados es la concentración efectiva 50 (EC50), analizada a través de la relación dosis-respuesta. En este caso se graficó el % DO en función del logaritmo de la concentración de metal (**Figura 1.6**). El % DO se determinó a partir de las cinéticas de crecimiento (**Figura 1.1 a 1.4**), tomando los valores de DO luego de 55 h de incubación, tal como se describió en Materiales y Métodos [4.a Cálculo de la dosis-respuesta (EC50)].



**Figura 1.6:** Curvas de EC<sub>50</sub> de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 para los cuatro metales en estudio luego de 55 h de crecimiento.

La EC<sub>50</sub> ha sido definida como la concentración de ion metálico que produce un 50 % de inhibición en el crecimiento bacteriano. En la **Tabla 1.3** se presentan los valores de EC<sub>50</sub> extraídos de la **Figura 1.6**.

**Tabla 1.3:** Valores de EC50 estimados para *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 luego de 55 h de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> ensayadas.

<i>L. kefir</i>				
	CIDCA 8348		JCM 5818	
	55 h	R <sup>2</sup>	55h	R <sup>2</sup>
<b>Pb<sup>2+</sup></b> (mM)	NA	-	NA	-
<b>Cd<sup>2+</sup></b> (mM)	0.01	0.98	0.01	0.99
<b>Zn<sup>2+</sup></b> (mM)	3.65	0.98	3.43	0.99
<b>Ni<sup>2+</sup></b> (mM)	7.09	0.99	4.02	0.99

NA: No ajusta a la ecuación de EC50.

A diferencia de los otros metales, en el caso del Pb<sup>2+</sup> no fue posible obtener ajustes de las cinéticas a 55 h de crecimiento, debido a que no hubo disminución de la biomasa en ninguna de las concentraciones ensayadas (**Figura 1.6** y **Tabla 1.3**).

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Monachese *et al.* 2012a, quienes también observaron que la presencia de concentraciones de plomo de 50 mg/L (0.15 mM) en el medio MRS no afectan el crecimiento de cepas de bacterias lácticas de *L. casei* 393<sup>T</sup>, *L. plantarum* 14917<sup>T</sup>, *L. rhamnosus* GR-1. No obstante, como se vio anteriormente, este catión produjo un aumento del tiempo *lag* para ambas cepas. Esto indica que a pesar de alcanzar valores de biomasa similares a los controles, el Pb<sup>2+</sup> induce daños de los cuales la bacteria debe recuperarse (**Figura 1.5**).

El Cd<sup>2+</sup> fue el metal más tóxico, observándose que la EC50 luego de 55 horas de incubación fue aproximadamente de 0.01 mM en ambas cepas. En la bibliografía existen evidencias que dan cuenta de la elevada toxicidad del cadmio en diferentes especies del género *Lactobacillus* (Monachese *et al.*,

2012a). En concreto, cepas de bacterias lácticas de *L. johnsonii* 20553, *L. casei* 393<sup>T</sup>, *L. plantarum* 14917<sup>T</sup>, *L. rhamnosus* GR-1 toleran concentraciones de 50 mg/L (0.16 mM) durante el crecimiento en medio MRS. Rial *et al.* (2011) encontraron valores similares de EC50 para el Cd<sup>2+</sup> (0.013 mM y 0.026 mM) en cepas de bacterias lácticas de *Carnobacterium piscícola* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Lysis*. La mayor toxicidad observada para el Cd<sup>2+</sup> puede ser explicada en base a dos factores: a) este metal no es un elemento traza esencial para el microorganismo y b) la baja capacidad complejante con el medio de cultivo usado deja al cadmio completamente biodisponible (Vullo *et al.*, 2008).

Cabe destacar que el origen de las bacterias lácticas influye en su tolerancia a los metales pesados. En este sentido, Bhakta *et al.* observaron concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) altas de Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> para 26 cepas de bacterias lácticas aisladas de lodo y barro de aguas residuales de canales de la India y Vietnam. Así, de acuerdo a la información proporcionada en dicho trabajo, la CIM para las bacterias lácticas varía desde 60 a > 1000 mg/L (5.45 mM) para el Cd<sup>2+</sup> y presenta valores mayores que 2000 mg/L (6 mM) para el caso del Pb<sup>2+</sup>.

Sin embargo, no se puede descartar que la elevada capacidad complejante del Pb<sup>2+</sup> podría inducir una sobreestimación de la concentración tolerada para este metal. Este hecho puede explicar que *L. kefir* tolere concentraciones más altas de Pb<sup>2+</sup> que de Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup>, a pesar del Pb<sup>2+</sup> ser un metal no esencial.

La EC50 a las 55 horas de crecimiento fue mayor para el Ni<sup>2+</sup> que para el Zn<sup>2+</sup> en un rango de concentración desde 7 mM a 3.43 mM, es decir que el Ni<sup>2+</sup> fue el metal menos tóxico (**Tabla 1.3**). En este sentido, Rial *et al.*, 2011 observaron para *Carnobacterium piscícola* que el Ni<sup>2+</sup> resulta ser el metal menos tóxico cuando es comparado con Co<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>, aunque encontraron valores de EC50 considerablemente más bajos (0.41 mM) que los obtenidos en este trabajo de tesis. Es probable que esta diferencia esté relacionada con la presencia de mecanismos de resistencia diferentes, teniendo en cuenta que se trata de dos géneros bacterianos diferentes.

Como se comentó anteriormente, concentraciones elevadas de  $\text{Ni}^{2+}$ , y en menor escala de  $\text{Zn}^{2+}$ , originan una disminución de la biomasa total y un salto abrupto y mucho más pronunciado en el tiempo *lag* con respecto al  $\text{Pb}^{2+}$  y al  $\text{Cd}^{2+}$ . Esto puede explicarse teniendo en cuenta que tanto  $\text{Ni}^{2+}$  como  $\text{Zn}^{2+}$  son metales esenciales en concentraciones trazas, y a partir de una determinada concentración, su efecto ya es tóxico para la bacteria.

### **Alteraciones morfológicas inducidas por los metales presentes en el medio de cultivo**

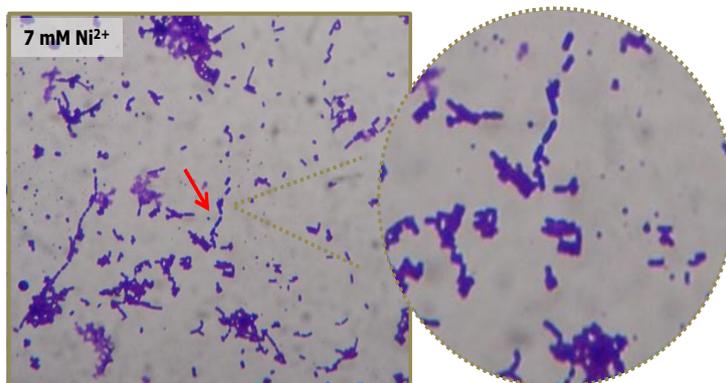
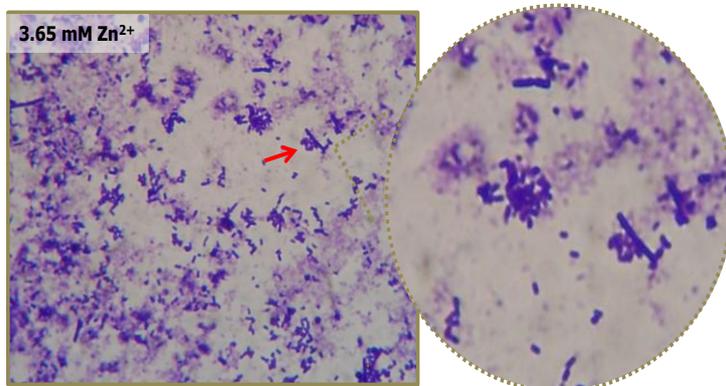
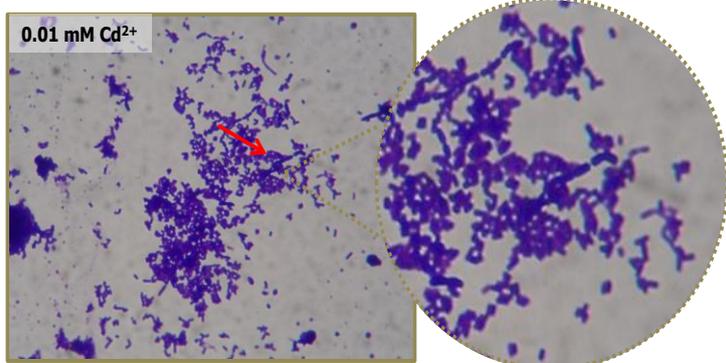
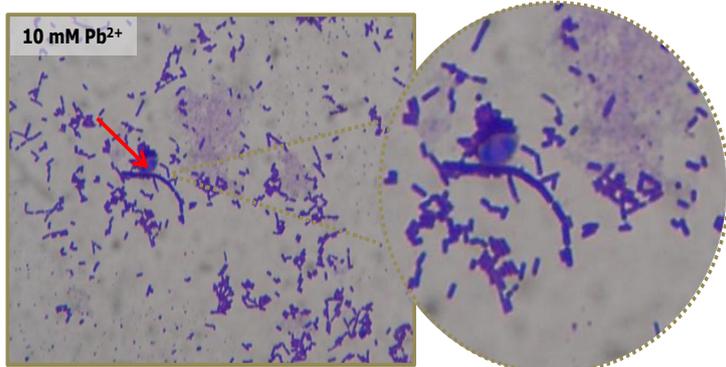
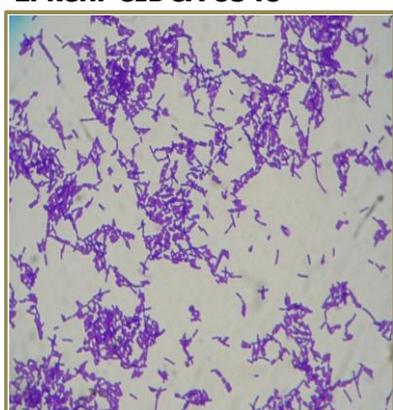
Para tratar de incursionar un poco más en la tolerancia de las 2 cepas de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 durante el crecimiento en presencia de metales pesados, se realizaron observaciones al microscopio óptico 1000x.

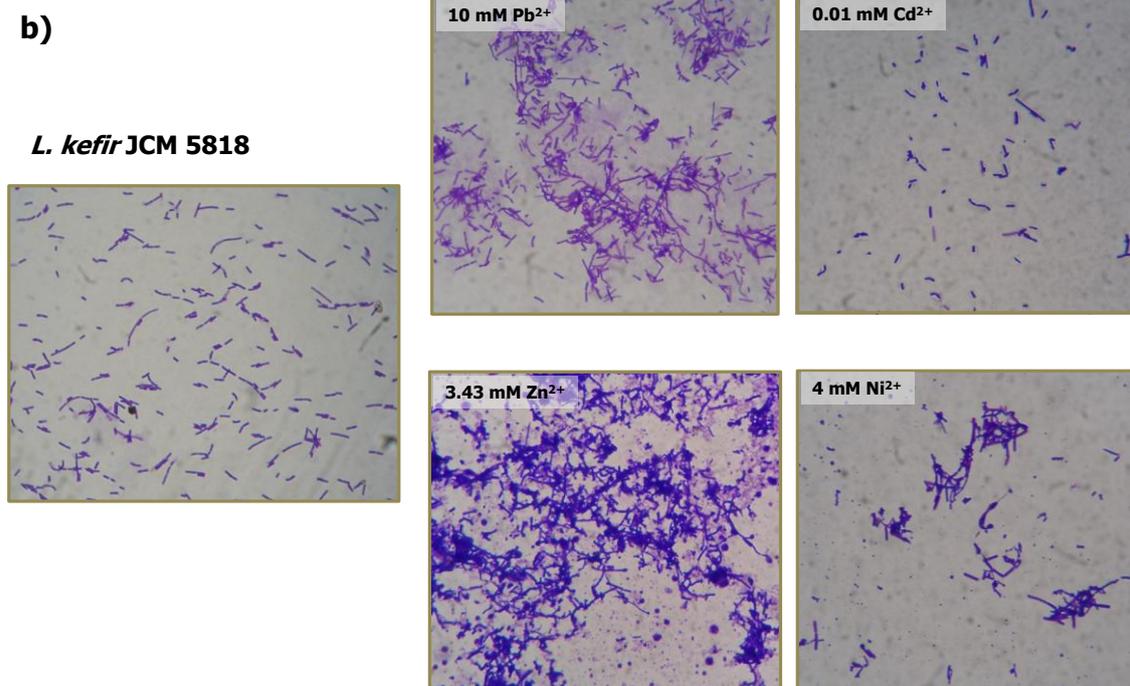
Desde el punto de vista morfológico, se observó que la cepa agregante *L. kefir* CIDCA 8348 crecida en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  presenta bacilos más cortos, algunos de los cuales aparecen más engrosados con respecto al control (**Figura 1.7 a**). Cuando esta cepa fue crecida en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$ , además de presentar engrosamientos, perdió la capacidad de formar agregados (**Figura 1.7 a**). En el caso de *L. kefir* JCM 5818 no agregante, se observó formación de agregados en presencia de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . A su vez, en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  se visualizaron bacilos más cortos (**Figura 1.7 b**).

En este sentido, algunos autores (Adarsh *et al.*, 2007; Panwichian *et al.*, 2011) revelan que durante el crecimiento en presencia de metales pesados como cobre, zinc o cadmio, las bacterias presentan cambios morfológicos, asociados a la bioacumulación, la interacción de éstos con estructuras superficiales de la pared celular o a la inducción de diferentes mecanismos de resistencia a los mismos.

a)

*L. kefir* CIDCA 8348





**Figura 1.7:** Observación microscópica de *L. kefir* CIDCA 8348 **a)** y JCM 5818 **b)** en ausencia y presencia de metal. (1000X). Las flechas señalan aquellos lactobacilos donde el engrosamiento es más evidente.

## BIOSORCIÓN

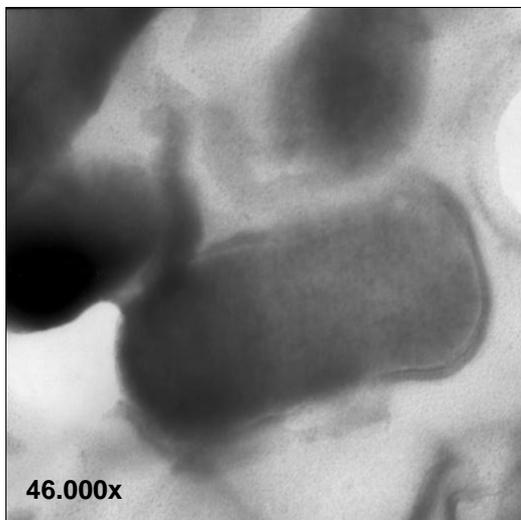
### Capacidad de biosorción de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818

Para comprobar la interacción bacteria-metal a la superficie bacteriana en condiciones de no crecimiento (biosorción) se procedió a realizar MET. Las micrografías electrónicas de transmisión de las dos cepas de *L. kefir* antes y después del tratamiento con plomo demostraron claramente la presencia del metal pesado depositado sobre la superficie bacteriana. La **Figura 1.8** muestra las imágenes obtenidas en donde se observa claramente la presencia de depósitos de plomo sobre la superficie bacteriana, que pueden deberse no sólo a un intercambio iónico sino también a la participación de diferentes mecanismos químicos como la reducción de plomo catiónico a plomo metálico. Por ejemplo, ha sido publicado que la unión de plomo a *B. subtilis* se inicia con una reacción estequiométrica entre los cationes metálicos y los sitios de unión de la superficie, seguida por la deposición inorgánica de más metal, actuando el

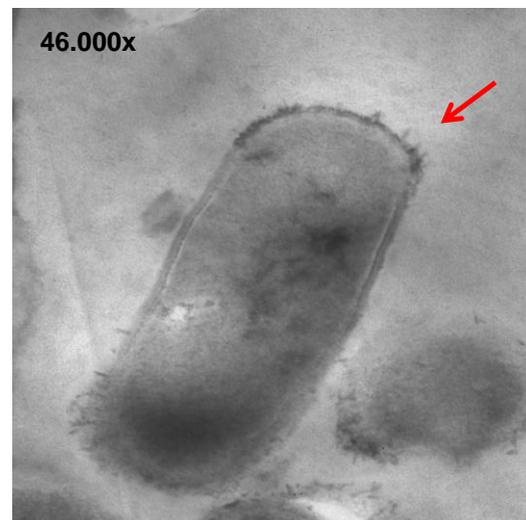
primer catión metálico como un centro de nucleación (Beveridge and Murray, 1980; Halttunen *et al.*, 2008). Los depósitos de plomo observados en la superficie de *L. kefir* podrían ser el resultado de una reacción de óxido-reducción entre cationes plomo y los constituyentes de la pared celular (como por ejemplo azúcares reductores) llevando así a la formación de plomo metálico. Cabe destacar que la superficie más externa que rodea las bacterias de *L. kefir*, son las proteínas de capa S. Esto refuerza el interés en el estudio de la interacción entre los iones metálicos y las proteínas de capa S bajo condiciones bien controladas (**capítulo III**).

### *L. kefir* CIDCA 8348

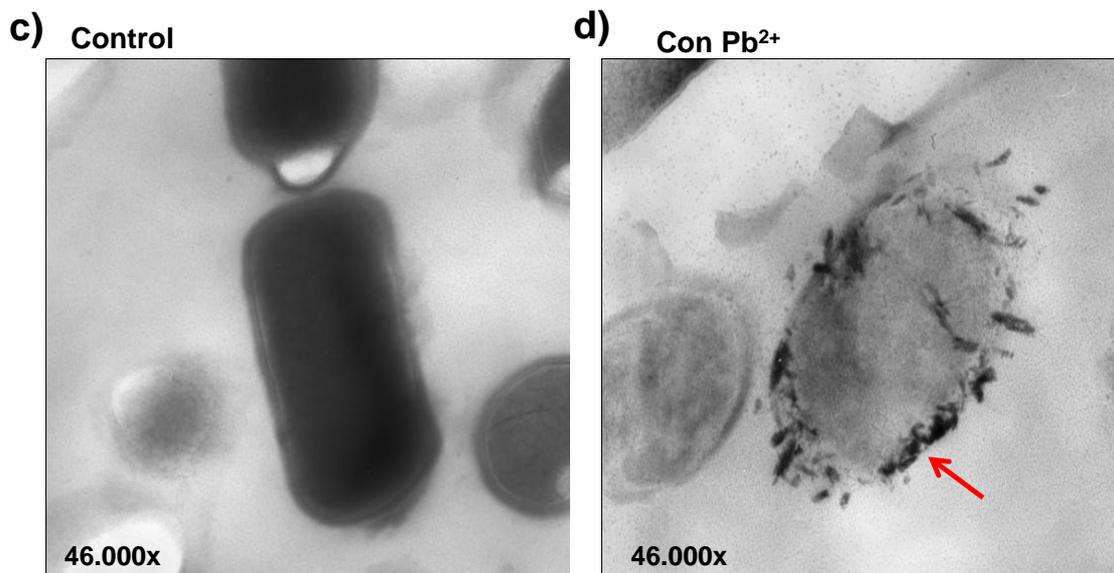
a) Control



b) Con  $Pb^{2+}$



### *L. kefir* JCM 5818

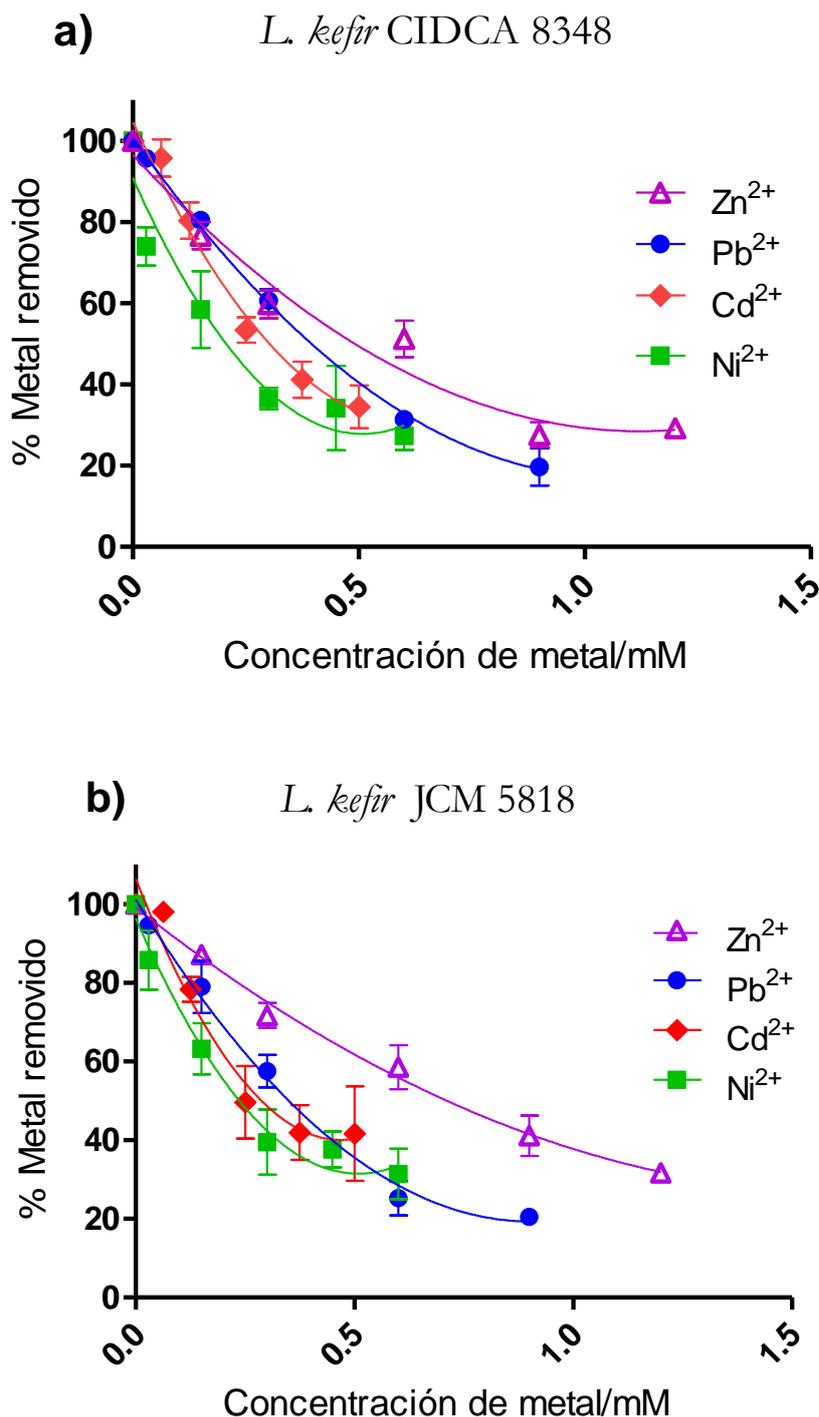


**Figura 1.8:** Microscopía electrónica de transmisión de las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 antes (**a** y **c**) y luego de ser incubadas con  $Pb^{2+}$  (**b** y **d**). Las flechas muestran la unión del plomo a la superficie celular.

### Isotermas de Biosorción

Una vez que las imágenes de MET demostraron la deposición de plomo sobre la superficie bacteriana, se procedió a estudiar la capacidad de las cepas de *L. kefir* para adsorber  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  en su superficie en condiciones de no crecimiento.

La **Figura 1.9** muestra la remoción de los tres iones metálicos por parte de ambas cepas analizadas. El rango de remoción osciló entre un 20 y 40% para las concentraciones más altas ensayadas, siguiendo la eficiencia de remoción el patrón:  $Zn^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$  en ambas cepas. Aunque la eliminación de metales es dependiente de la cepa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas para el cada metal ( $P < 0.05$ ).



**Figura 1.9:** Remoción de Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> por *L. kefir* CIDCA 8348 (a) y JCM 5818 (b). *L. kefir* a) y b) se expusieron a concentraciones de metales en el rango de: Pb<sup>2+</sup> 0.03-0.90 mM, Cd<sup>2+</sup> 0.06-0.50 mM, Zn<sup>2+</sup> 0.15-1.20 mM y Ni<sup>2+</sup> 0.03-0.60 mM. Los resultados se obtuvieron a partir de tres ensayos independientes.

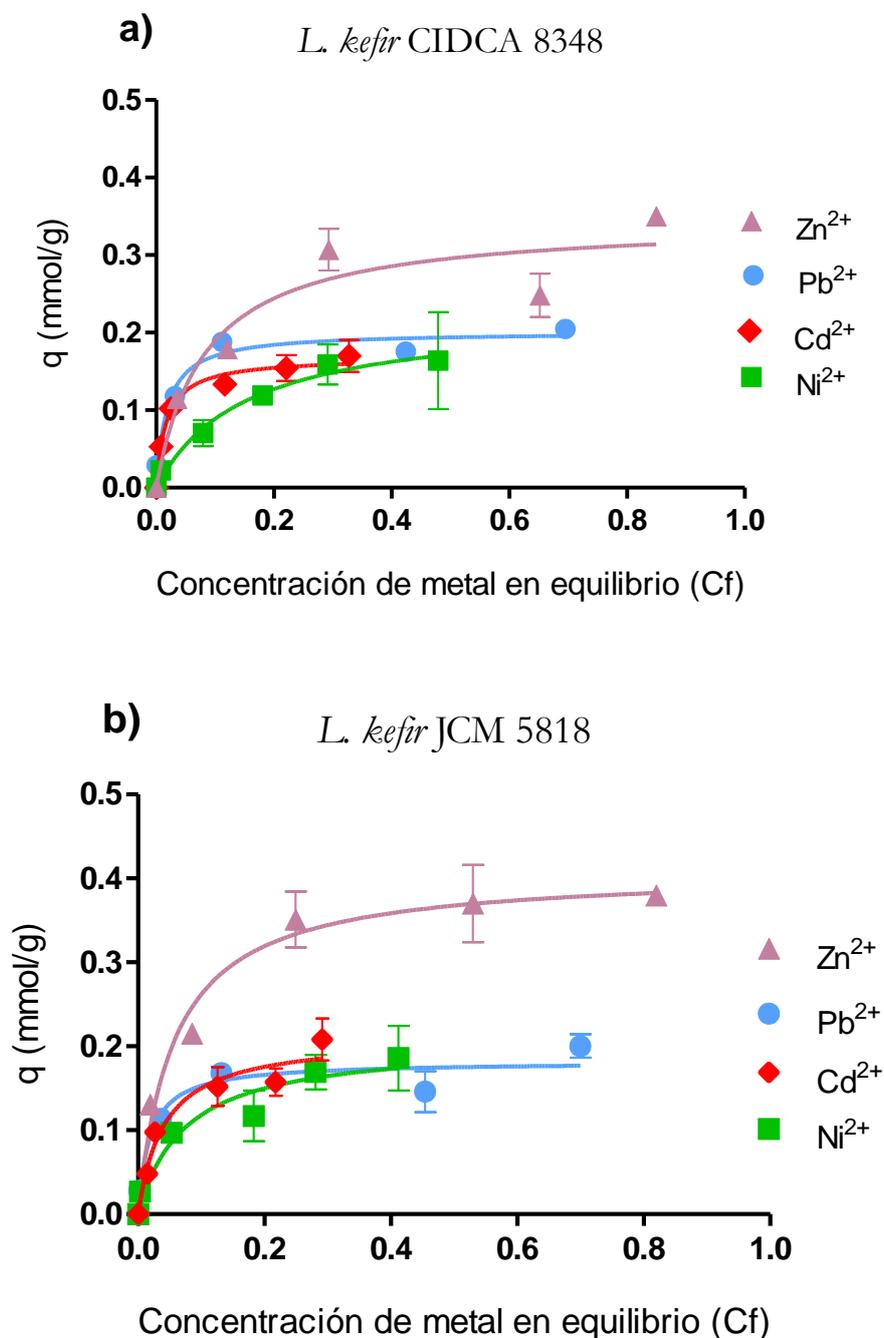
Para predecir los diferentes parámetros que describen la unión de metales pesados a biomazas microbianas, generalmente se utilizan modelos matemáticos, siendo las isothermas de Langmuir uno de los modelos más utilizados. La unión de plomo, cadmio, zinc y níquel a *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 ajustaron bien a la isoterma de Langmuir (**Figura 1.10**) (valores de  $R^2$  entre 0.97 y 0.86). La isoterma de Langmuir fue originalmente desarrollada para describir la adsorción de gas a superficies sólidas. Cuando el modelo fue desarrollado, se hicieron varias suposiciones:

- 1) el número de moléculas adsorbidas no supera el número de sitios de adsorción,
- 2) todos los sitios de adsorción tienen la misma energía para las moléculas adsorbidas,
- 3) una molécula interactúa sólo con un único sitio de adsorción.

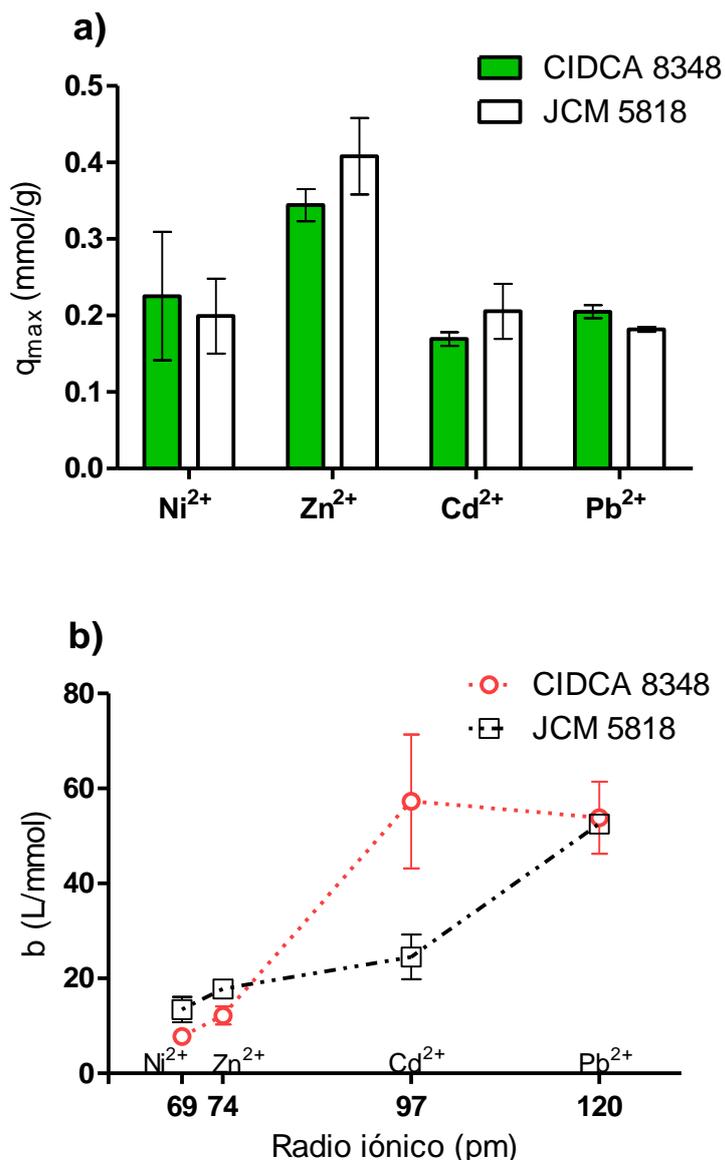
En el caso de la adsorción de metales por biomazas microbianas, al menos una de estas suposiciones no se cumple. Sin embargo, esta isoterma es útil y permite el cálculo de dos parámetros importantes: la capacidad máxima de unión ( $q_{\max}$ ) y la constante de afinidad ( $b$ ) (a veces también se presenta como una constante de disociación ( $K_d = 1/b$ ) (Davis *et al.*, 2003).

El  $q_{\max}$  para la interacción bacteria/metal fue de aproximadamente 0.2 mmoles/g para plomo, cadmio y níquel, lo que corresponde a valores que oscilan entre 52-67 mg de metal por gramo de masa seca (**Figura 1.11a**). En este sentido, Halttunen *et al.* determinaron que los  $q_{\max}$  de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  para diferentes cepas de lactobacilos y bifidobacterias se encuentran en el rango 45-175 mg de metal/g de biomasa seca y de 12-54 mg de metal/g de masa seca, respectivamente (Halttunen *et al.*, 2007). En el caso del  $Zn^{2+}$ , los  $q_{\max}$  obtenidos fueron de 0.34 (100 mg/g) y 0.40 mmoles/g (119 mg/g) para *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818, respectivamente. Esto se diferencia de los resultados encontrados por Mrvčić *et al.* para *L. mesenteroides*, *L. brevis* y *L. plantarum* donde el  $Zn^{2+}$  presentaba valores de  $q_{\max}$  de entre 10 y 27 mg/g (Mrvčić *et al.*,

2009a). Estas diferencias podrían estar relacionadas con los grupos funcionales expuestos en la superficie de cada género y especie bacteriano, así como también del área disponible para la interacción.



**Figura 1.10:** Isotherma de biosorción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  para: **a)** *L. kefir* CIDCA 8348 y **b)** *L. kefir* JCM 5818. Los símbolos representan la información experimental y las líneas representan el ajuste realizado con el modelo de Langmuir.



**Figura 1.11: a)** Gráfico de barras mostrando el  $q_{max}$  para cada metal en ambas cepas.

**b)** Gráfico mostrando las constantes de afinidad relativas ( $b$ ) para cada metal en ambas cepas.

Con respecto a  $b$ , se observaron algunas diferencias para los metales analizados. La **Figura 1.11b** indica que existe una correlación entre los valores de  $b$  y el radio iónico de los metales ensayados, observándose que cuanto mayor es el ion (mayor radio iónico), mayor es la afinidad (mayores valores de  $b$ ). Los valores de  $b$  indican que los iones metálicos de mayor radio iónico ( $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$ ) son aquellos con mayor afinidad, observándose diferencias significativas

( $p < 0.05$ ) para el caso del plomo con respecto a todos los metales en ambas cepas, salvo para el caso de *L. kefir* CIDCA 8348 con cadmio. Esta observación sugiere que los iones metálicos más grandes inducen cambios estructurales en la superficie bacteriana que permiten la exposición de los sitios con mayor afinidad para los iones metálicos.

La eficiencia de *L. kefir* para eliminar metales pesados nunca había sido tratada con anterioridad. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la capacidad secuestrante de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 es comparable con la observada para otras bacterias lácticas. Además teniendo en cuenta otros autores que usaron el modelo de Langmuir para estudiar la unión de metales pesados a otras biomasas (hongos y algas), los valores  $q_{\max}$  de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 podrían ser considerados como moderados.

## Conclusiones

1. La tolerancia de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 fue buena comparada con otros géneros de bacterias lácticas, siendo el cadmio el metal más tóxico.
2. *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 se unen de una manera eficiente a los metales pesados. Este hecho apoya su potencial uso como adsorbentes de trazas de metales pesados en productos dirigidos a consumo humano y animal, aprovechando su estatus GRAS.
3. La afinidad de ambas cepas a los metales pesados investigados podría estar correlacionada con su radio iónico, siendo el plomo y el cadmio los más afines.

En función de estos resultados, resulta interesante desarrollar un modelo que permita cuantificar la remoción metales pesados a los fines de uso práctico, así como también indagar acerca de las estructuras superficiales involucradas en la interacción bacteria/metal.

## CAPÍTULO II

Implementación de Espectroscopia  
Raman y Análisis Multivariante  
para el estudio de la interacción de  
plomo, cadmio, zinc y níquel a las  
cepas de *Lactobacillus kefir* CIDCA  
8348 y JCM 5818

---

## INTRODUCCIÓN

La identificación, caracterización, discriminación y/o clasificación de microorganismos es un tema de gran relevancia en varias disciplinas, con aplicaciones en diversos campos entre los cuales podemos mencionar, la industria farmacéutica, alimentaria, el sector médico y medio ambiente, entre otros.

La mayor parte de los métodos utilizados para la identificación y clasificación de microorganismos se basa esencialmente en el análisis morfológico, la evaluación e interpretación de reacciones bioquímicas, la capacidad de crecer en diferentes medios y condiciones de cultivo. Por su parte, los avances de la Biología Molecular han provisto de metodologías que pueden ser usadas adecuadamente con criterios taxonómicos. Entre ellos pueden citarse la homología de ADN-ADN, ARNr 16S, RAPD-PCR, ribotipificación, perfil de ácidos grasos, perfil de proteínas solubles, etc. Sin embargo, la mayoría de estos métodos necesitan reactivos de biología molecular costosos o requieren la aplicación combinada de los mismos para obtener una amplia información (Al-Khaldi y Mossoba, 2004, Gómez-Zavaglia, 2000).

En base a lo expresado, la búsqueda de métodos alternativos confiables y rápidos para la identificación, discriminación y/o clasificación de microorganismos, es un tema de investigación sumamente activo (Ivnitski *et al.*, 1999, Mulvaney & Keating, 2000). Así, en las últimas tres décadas se han propuesto métodos alternativos, basados en la espectroscopía vibracional. En particular, la espectroscopía de infrarrojo y la espectroscopía Raman han sido ampliamente utilizadas debido a su capacidad de proveer información, química, bioquímica y estructural de materiales biológicos, entre los que se encuentran los microorganismos (Naumann, 2000).

Su implementación se basa en la capacidad de aportar información global sobre la composición molecular de la bacteria (*i.e.*: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y componentes de la pared celular) permitiendo de esta manera

extender su aplicación más allá de la taxonomía bacteriana (Naumann *et al.*, 1991).

Dichas metodologías presentan diversas ventajas sobre los métodos convencionales utilizados en Microbiología. Entre ellas, puede mencionarse:

1) las muestras en estudio requieren una mínima o nula preparación para su análisis;

2) a diferencia de otros métodos espectroscópicos, los métodos basados en la espectroscopía vibracional no requieren de la utilización de agentes externos (sondas), que pueden llegar a interferir con lo que se desea medir;

3) permiten una rápida caracterización de cepas microbianas *in situ*, de una manera no destructiva y en tiempo real, lo que a su vez permite utilizarlas para monitorear la producción de determinados metabolitos (Bosch *et al.*, 2006, Naumann *et al.*, 1991);

4) debido a la gran cantidad de información química y bioquímica que proveen, pueden ser utilizadas con propósitos diversos tales como, detección, clasificación e identificación de microorganismos a diferentes niveles taxonómicos (serotipo, cepa, especie o género), proporcionando patrones que se correlacionan con los árboles filogenéticos construidos a partir del análisis de la secuencia de ADN (Mobili *et al.*, 2011, Naumann, 2000; Baena y Lendl, 2004).

Considerando las ventajas de los métodos basados en la espectroscopía vibracional en términos de sencillez, simplicidad y reproducibilidad, no resulta sorprendente su crecimiento como métodos de *screening* a gran escala o como métodos alternativos en aplicaciones clínicas (Naumann *et al.*, 1991, Naumann, 2000) y en la discriminación e identificación de patógenos o contaminantes de alimentos (Alexandrakis *et al.*, 2008, Lefier *et al.*, 2000; Naumann, 2000).

### **Espectroscopía Raman**

En la espectroscopía Raman (llamada así en honor a su descubridor Chandrasekhara V. Raman), los espectros se generan como consecuencia de la

dispersión de la radiación de una fuente de emisión láser en el material en estudio. Esta dispersión se traduce en un ligero desvío de las longitudes de onda con respecto a las de la radiación incidente.

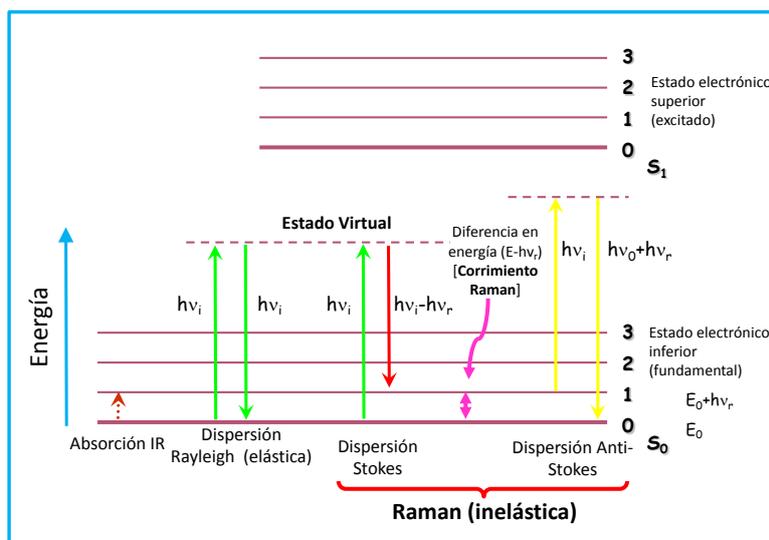
Se trata de una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de compuestos orgánicos, inorgánicos y sistemas biológicos permitiendo así su identificación.

Esta técnica se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia  $\nu_i$  sobre la muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra (**Figura 2.1**). La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio en la frecuencia, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia  $\nu_i$  que la luz incidente se conoce como **dispersión Rayleigh** (dispersión elástica), y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias diferentes a la de la radiación incidente (dispersión inelástica), es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y se conoce como **dispersión Raman**. Las nuevas frecuencias,  $+\nu_r$  y  $-\nu_r$ , son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente (**Figuras 2.1 y 2.2**).

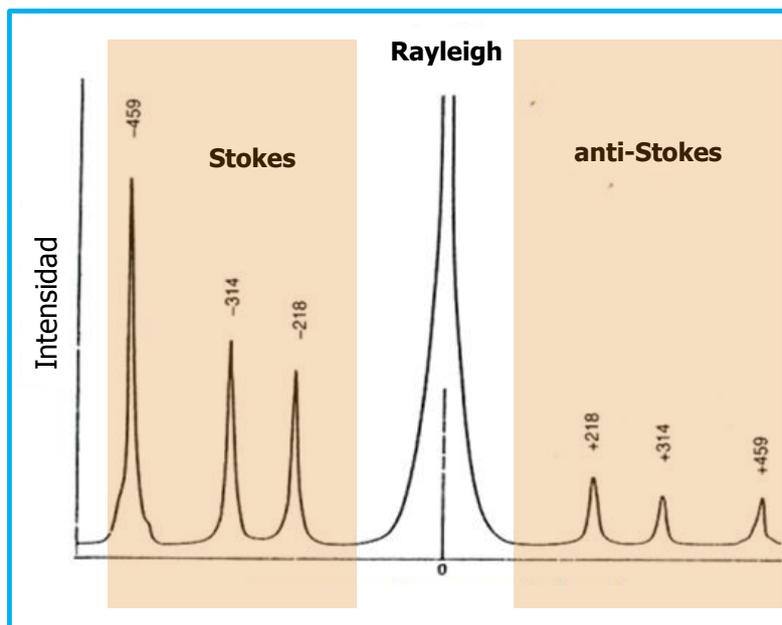
En la dispersión Raman la energía de la luz incidente no es suficiente para excitar la molécula a un nivel electrónico de mayor energía por lo que sólo cambia el estado vibracional de la molécula.

Para que una molécula exhiba el efecto Raman, la luz incidente debe inducir un cambio en la polarizabilidad molecular que es una propiedad relacionada con la capacidad de un enlace para deformarse. Por ejemplo, en el caso del dióxido de carbono, el cambio en la polarizabilidad se puede visualizar cualitativamente como un cambio en la forma de la nube electrónica. La nube electrónica alrededor de la molécula de  $\text{CO}_2$  se alarga o encoge, alternativamente, en fase con la variación oscilante de la componente eléctrica de la onda

electromagnética. La luz dispersada contiene una pequeña porción de la luz debida a la dispersión Raman, además de la debida a la dispersión Rayleigh normal. A su vez la dispersión Raman contiene **líneas Stokes** y **anti-Stokes**; sus frecuencias corresponden a la suma y diferencia de las frecuencias de la luz incidente y las frecuencias vibracionales moleculares permitidas. Cuando los fotones interactúan con una molécula, una parte de su energía se puede convertir en varios modos de vibración de la molécula. Como se muestra en las **Figuras 2.1 y 2.2**, la luz dispersada pierde energía equivalente a la energía dada a las vibraciones moleculares (efecto Raman Stokes). Si la molécula se encontraba inicialmente en un estado rotacional o vibracional excitado, es posible que la luz dispersada tenga mayor energía que la incidente (efecto Raman anti-Stokes), siempre y cuando el sistema decaiga a un estado de menor energía que la del estado inicial. Como normalmente la población de los estados excitados es mucho menor que la del estado básico, la dispersión Raman Stokes es mucho más intensa que la dispersión anti-Stokes (100 veces superior). La diferencia entre la intensidad del efecto Stokes y anti-Stokes hace que habitualmente se trabaje midiendo sólo el efecto Stokes y por comodidad se sitúa el resultado en la parte positiva del eje.



**Figura 2.1:** Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.



**Figura 2.2:** Espectro Raman del  $\text{CCl}_4$  usando una fuente laser de 488 nm

Teniendo en cuenta que sólo una pequeña fracción de los fotones ( $1$  en  $10^7$ ) es dispersada inelásticamente, las líneas Raman son por lo general, muy débiles. La mayor parte de la luz dispersada tiene la misma frecuencia (energía) que la de la luz incidente original, lo cual hace que la observación del efecto sea relativamente difícil. Sin embargo, el advenimiento de los láseres permitió irradiar con un haz monocromático de muy alta densidad de energía, facilitando con ello su observación. El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda  $\tilde{\nu}$ . EL número de onda es proporcional a la frecuencia ( $\nu$ ) e inversamente proporcional a la longitud ( $\lambda$ ) de onda y se expresa en  $\text{cm}^{-1}$  ( $\tilde{\nu} = \nu/c = 1/\lambda$ ), y donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío.

La espectroscopía de absorción infrarroja (IR) está asociada a excitaciones vibracionales y rotacionales en las moléculas, sin que se produzcan transiciones electrónicas. (**Figura 2.1**). Así, los espectros infrarrojos se originan a partir de transiciones entre niveles vibracionales de la molécula en el estado electrónico basal y son, por lo general, observados como espectros de absorción en la región del infrarrojo. Desde un punto de

vista cuántico, una vibración es activa en el IR si el momento dipolar de la molécula cambia durante la vibración. En el capítulo III se analizará en profundidad la espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). En este capítulo sólo se hace una breve mención con el fin de comparar los fundamentos de las espectroscopías Raman e infrarrojo.

Las espectroscopías Raman e IR son técnicas complementarias a la hora de estudiar los modos vibracionales de una molécula. Por ejemplo, la banda correspondiente al estiramiento simétrico (*stretching*) del CO<sub>2</sub> sólo es observable en el Raman (debido a un cambio en la polarizabilidad), mientras que las bandas fundamentales de vibración de deformación (*bending*) y estiramiento asimétrico sólo lo son en el IR (debido a un cambio del momento dipolar). La espectroscopía Raman también tiene interés para el estudio de sustancias en solución acuosa (por ejemplo en medios biológicos), ya que el H<sub>2</sub>O absorbe fuertemente en el IR, enmascarando otras bandas, pero no en el Raman.

El uso y aplicación de la espectroscopía Raman para el análisis de muestras biológicas y microorganismos, data aproximadamente de las últimas tres décadas (Krafft, 2004). En sistemas biológicos, la espectroscopía Raman ha sido utilizada para realizar estudios en tejidos, detección de analitos en fluidos biológicos, y diferenciación de bacterias a nivel taxonómico, entre otras (Lopez Díez y Goodacre, 2004; Maquelin *et al.*, 2003).

Entre las ventajas que la espectroscopía Raman ofrece para el análisis de muestras biológicas, se pueden mencionar su alta sensibilidad a cambios moleculares sutiles, y su capacidad de operar de forma no-invasiva (es decir sin alterar la superficie de análisis). Adicionalmente, se requiere una mínima o nula preparación de la muestra en estudio, no tiene interferencia del CO<sub>2</sub> o del H<sub>2</sub>O atmosféricos, mínima interferencia del H<sub>2</sub>O líquida y puede ser utilizada para mediciones remotas, mediante el uso de sondas de fibra óptica. Asimismo, la microespectroscopía Raman permite realizar mediciones

en muestras biológicas del orden de micrómetros tanto *in vitro* como *in vivo*, sin necesidad de utilizar reactivos.

### **Métodos de análisis multivariante (Métodos quimiométricos)**

Las espectroscopías vibracionales generan una gran cantidad de datos, los cuales requieren métodos apropiados de análisis para aprovechar al máximo la información contenida en ellos.

La Quimiometría es la disciplina que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para extraer de forma eficiente la información relevante contenida en los datos experimentales, que en nuestro caso son los espectros (grupos multivariantes de datos). En líneas generales, los métodos multivariantes pueden clasificarse como *no supervisados*, cuando no requieren información adicional para su estudio, y *supervisados*, cuando requieren información previa para el análisis de datos.

Diversos autores han utilizado los métodos multivariantes para el análisis de datos espectrales, con fines de discriminación, identificación y/o clasificación de microorganismos y otros especímenes biológicos (Mobili *et al.*, 2011; Bosch *et al.* 2006; Minnaard *et al.*, 2007). Algunos de los métodos más utilizados para este propósito son: el análisis de componentes principales (PCA), análisis por factores (FA), análisis de discriminación lineal (LDA), análisis de *clusters* (HCA), mínimos cuadrados parciales (PLS), redes neuronales (ANNs), entre otros (Ghiamati *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2004).

Por otro lado, aunque las mediciones experimentales y la metodología para la recolección de datos se encuentren bien definidas o establecidas, siempre existirán fuentes de variación, que resultan ser un problema para la calibración de modelos de clasificación o predicción, y que deben ser minimizadas. En este sentido, la remoción de ciertos efectos físicos causados por la dispersión de la luz, variación en la línea base y el ruido aleatorio, es de vital importancia en el análisis y caracterización de muestras biológicas.

Estos inconvenientes pueden solucionarse en gran medida con un adecuado pre-procesamiento de datos [*i.e.*: normalización, suavizado, corrección de la línea base, derivación, corrección de efectos multiplicativos (MSC), etc.] (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005). Adicionalmente, existen determinados criterios para la selección de un rango o región espectral, que son generalmente utilizados para eliminar la información no específica en los modelos de clasificación o predicción. Para esta tarea, se cuenta con diversos métodos ya establecidos que permiten una eficiente selección de estos rangos espectrales (Jarvis & Goodacre, 2005; Goicoechea & Olivieri, 2003).

A continuación, se describen dos de los métodos multivariantes más utilizados para la identificación, discriminación y/o clasificación de microorganismos.

### **Análisis de componentes Principales (PCA)**

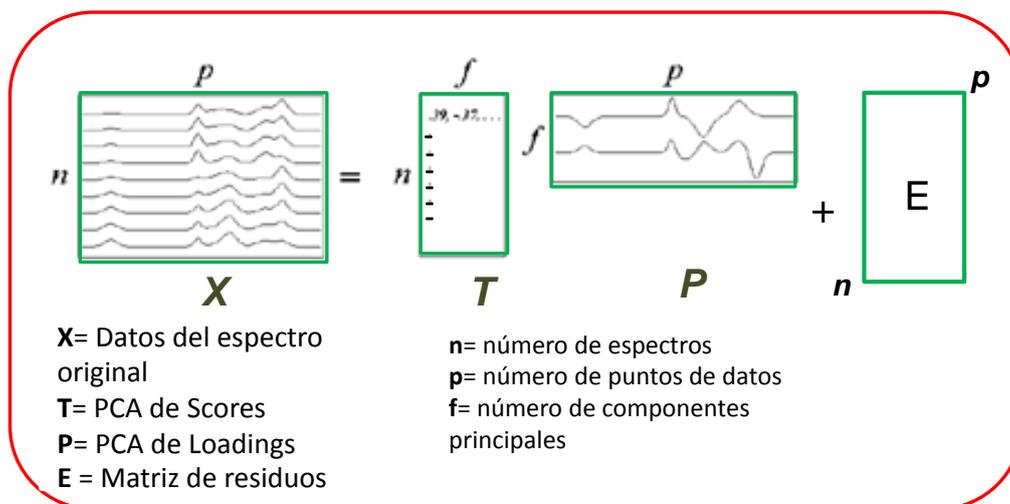
El PCA es un método multivariante que opera de forma no supervisada, y es utilizado para analizar la estructura inherente de los datos. Este método reduce la dimensionalidad del conjunto de datos, encontrando un grupo de ejes coordenadas alternativas, llamadas componentes principales (PC's) (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005). Estos ejes de coordenadas alternativos tienen la propiedad de que la mayor parte de la información está contenida en unas pocas primeras dimensiones, pudiéndose descartar el resto con muy poca pérdida información (**Figura 2.3**). La forma general del modelo de PCA es la siguiente:

$$X = TP^T + E \quad (\text{II.1})$$

donde la matriz  $X$  (matriz de datos o espectros), es descompuesta en dos matrices más pequeñas, una llamada matriz de *scores* ( $T$ ) y la otra, matriz de *loadings* ( $P$ ) donde el superíndice T indica la operación de transposición del vector, es decir, el intercambio de filas por columnas. Los *scores* muestran la posición de las muestras a lo largo de cada componente del modelo, y son utilizados para detectar, similitudes o diferencias de las muestras, patrones y/o

agrupamientos. Los *loadings* muestran el peso (o relevancia) de una determinada variable por el modelo de componentes principales. Son utilizados para entender cuánto contribuye cada variable al significado de la variación de los datos, y de esta manera, interpretar la relación entre variables. También pueden ser utilizados para interpretar el significado de cada componente del modelo.

Teniendo en cuenta que existen menos componentes principales que variables y debido al error de ajuste del modelo con los datos, se produce un error E que se acumula en la matriz (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3:** Esquema general del Análisis de Componentes Principales (PCA)

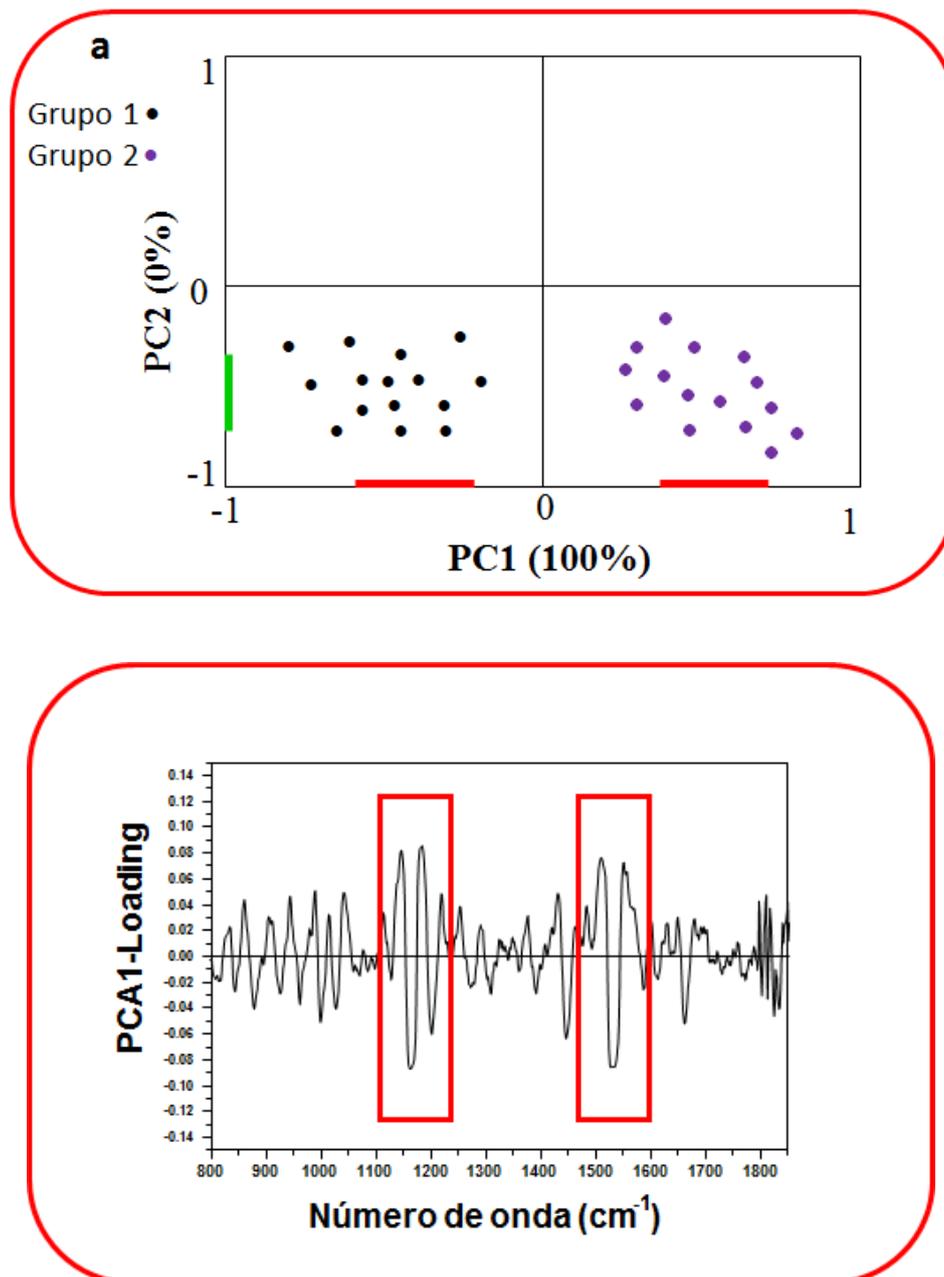
Las PC's corresponden a una combinación lineal de las variables originales, las cuales son ortogonales entre sí, y elegidas de tal manera que cada una de ellas explica de forma sucesiva la máxima variabilidad del conjunto de datos. En otras palabras, PCA involucra un procedimiento matemático que transforma una gran cantidad de variables correlacionadas (*i.e.*: corrimiento Raman o números de onda), en una cantidad menor de variables no correlacionadas, las cuales son llamadas, componentes principales (PC's).

La primera componente principal (PC1), explica la mayor variabilidad en el conjunto de datos, y cada componente sucesiva, explica la variabilidad remanente de la PC anterior.

Cuando los *scores* son graficados como una combinación de PC's (**Figura 2.4a**), éstos pueden revelar relaciones existentes entre las muestras (agrupaciones). Es importante recordar que PCA actúa de una forma no supervisada, lo cual significa que para el análisis de datos no es necesario ningún tipo de información adicional al conjunto de espectros o datos colectados experimentalmente.

El PCA provee el porcentaje de la varianza explicada por cada PC. Además nos indica el número de componentes principales (PC's) que retienen la mayor cantidad de información presente en el conjunto de datos, relacionada con su estructura intrínseca (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005). Adicionalmente, los *loadings* proporcionan información referente a las variables de diagnóstico estadísticamente más importantes o influyentes, relacionadas con las principales diferencias encontradas en el conjunto de datos (**Figura 2.4b**).

En la **Figura 2.4a** se muestra una gráfica de los PCA-*scores* representativos de dos grupos de muestras de diferentes especies bacterianas. La separación existente entre los dos grupos, se encuentra dada a lo largo del eje perteneciente a la componente 1 (PC1), la cual explica un 100 % de la varianza total de los datos. De esta manera, la PC1 contiene la información espectral relacionada con la especie de las bacterias.



**Figura 2.4:** **a)** Gráfico de PCA-*scores* (PC1 vs PC2) obtenidos del análisis de componentes principales de espectros Raman de dos especies bacterianas filogenéticamente relacionadas. Las agrupaciones observadas a lo largo del eje de la componente principal 1 (PC1), corresponden a los dos grupos de bacterias analizadas. **b)** Gráfico de *loading* del análisis de PCA realizado en todo el rango del espectro Raman (1800-800 cm<sup>-1</sup>) para las muestras en estudio. Los recuadros en rojo indican las variables más influyentes del gráfico de PCA-*scores*.

En resumen, la transformación en PC da algunas facilidades para analizar la información tales como:

- Obtener información gráfica de los datos en 2 ó 3 dimensiones.
- Inspeccionar las estructuras de los datos aplicando métodos computacionales intensivos sobre los datos reducidos. De esta manera los datos se presentan de manera más clara que en las  $n$  dimensiones originales.
- Obtener información cuantitativa acerca del "peso" de cada variable en el conjunto de datos.

### **Mínimos cuadrados parciales (PLS)**

Las técnicas de calibración multivariante, tales como regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS, por sus siglas en inglés), pueden relacionarse con el procesamiento de espectros y su cuantificación. Una vez que la calibración ha sido realizada, la predicción de futuras muestras (determinación de concentraciones en muestras desconocidas por regresión) es simplemente una multiplicación de matrices.

El modelo PLS es un método para la construcción de modelos de predicción cuando los factores (variables manejables de manera controlada) son muchos y altamente colineales (no son significativamente redundantes).

Las variables espectrales son colectadas como una matriz  $\mathbf{X}$  con número de muestras y el número de columnas igual al número de canales en el espectro. Esta matriz de respuestas  $X$  (matriz de espectros), es descompuesta de manera similar a como se hace en PCA, generando una matriz de *scores* ( $T$ ) y una matriz de *loadings* ( $P$ ) (también llamados vectores base).

$$X = TP^T + E \quad (\text{II.2})$$

Los elementos de la matriz  $\mathbf{Y}$  corresponden a las concentraciones (número de filas = número de muestras; número de columnas = número de elementos)

y un análisis similar al de  $X$  es llevado a cabo, produciendo una matriz de *scores* ( $U$ ) y otra de *loadings* ( $Q$ ).

$$Y = UQ^T + F \quad (\text{II.3})$$

El objetivo de PLS es modelar las matrices  $X$  e  $Y$ , de tal forma que el conjunto de valores residuales de  $X$  e  $Y$ , llamados  $E$  y  $F$  respectivamente, sean igual a cero. Asimismo, se construye una relación entre el conjunto de *scores* y *loadings*

$$U = TW \quad (\text{II.4})$$

donde  $U$  y  $T$  son los *scores* asociados a las matrices  $X$  e  $Y$ , respectivamente, y  $W$  es una matriz de regresión lineal entre los espacios de los *scores* que debemos calcular.

Este modelo es mejorado mediante el desarrollo de lo que se conoce como "relaciones internas". Debido a que los vectores base son calculados para ambos conjuntos de datos  $X$  e  $Y$  de manera independiente, éstos pueden tener una débil relación entre ellos. Esta relación interna es mejorada mediante el intercambio de los *scores*  $T$  y  $U$ , en un cálculo iterativo. Esto permite que la información de un conjunto de datos pueda ser utilizada para ajustar la orientación de los vectores base o latentes (PC) en otro conjunto de datos y viceversa. Una descripción más amplia de este proceso, puede ser encontrada en la literatura (Araujo-Andrade *et al.*, 2005).

Una vez calculado el modelo, las ecuaciones anteriores se combinan para proporcionar una matriz de vectores de regresión, uno por cada componente en  $Y$ :

$$\hat{B} = P(P^T P)^{-1} W Q^T \quad (\text{II.5})$$

$$\hat{Y} = X \hat{B} \quad (\text{II.6})$$

El objetivo del PLS es entonces, obtener un modelo en un espacio de menor dimensión capturando la máxima variación en X con el número mínimo de variables (PCA) y maximizando la correlación entre X e Y.

Es por todo esto que el énfasis del PLS se encuentra en la predicción de las respuestas y no necesariamente en tratar de entender las relaciones existentes entre variables.

### **Métodos de validación**

La validación de un modelo de predicción está referida a su capacidad predictiva de datos desconocidos, que no han sido utilizados en la calibración del mismo. Este nuevo conjunto de datos recibe el nombre de "*set de validación*", y es utilizado para validar el modelo calibrado bajo una situación real. Sin embargo, en ciertos casos el número de muestras o determinaciones es limitado y no es posible contar con un grupo de muestras para la calibración del modelo, llamado también "*set de entrenamiento*", y un "*set de validación*". En dichos casos, es necesario recurrir a procedimientos alternativos que proporcionen una aproximación a la validación ideal.

A continuación, se describe uno de los métodos de validación alternativos y mejor aceptado por los expertos en el tema, cuando no se cuenta con suficiente cantidad de muestras o mediciones para una validación por "*set de validación*". Este método, proporciona una validación buena, pero a su vez, aproximada a la validación ideal.

### **Validación cruzada (LOOCV)**

El método de validación cruzada, es comúnmente conocido por su nombre en inglés como *full-cross-validation* o *leave-one-out-cross-validation* (LOOCV). El método consiste en calibrar tantos sub-modelos como objetos existan, y en donde en cada calibración se excluye de cada sub-modelo un objeto (espectro o muestra), que será predicho por el sub-modelo.

Si existen  $n$  objetos, cada sub-modelo será calibrado con  $n-1$  objetos. El cuadrado de la diferencia entre el valor predicho y el valor de referencia  $Y$  para cada objeto o muestra excluida, es sumado y promediado, dando como resultado la varianza en  $Y$ , en el mismo sentido que si se realizara en un grupo de muestras independiente.

El método de validación cruzada, suele ser la mejor opción cuando no se cuenta con un número suficiente de muestras para tener un set de entrenamiento y otro grupo independiente de muestras de validación. Por lo descrito anteriormente, diversos autores en la literatura recomiendan este método como una buena aproximación para validar un modelo (Martens & Nielsen, 2003; Esbensen, 2005).

## MATERIALES Y METODOS

### Espectroscopia Raman

Se realizaron análisis de la biosorción de las cepas de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 con  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  mediante espectroscopía Raman. De todas las concentraciones de metales ensayadas en el experimento de biosorción [capítulo I. Sección 3-b Ensayos de unión a iones metálicos (biosorción)], se seleccionaron tres, para el registro de los espectros Raman. Las concentraciones seleccionadas fueron:  $\text{Pb}^{2+}$  0.03, 0.3 y 0.9 mM;  $\text{Cd}^{2+}$  0.06, 0.25 y 1.2 mM;  $\text{Zn}^{2+}$  0.15, 0.6 y 1.2 mM; y  $\text{Ni}^{2+}$  0.03, 0.3 y 0.45 mM.

La labor experimental se desarrolló en Unidad Académica de Física de la Universidad Autónoma de Zacatecas y en el Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. Unidad Aguascalientes, México, a cargo del Dr. C. Araujo-Andrade y Dr. C. Frausto Reyes.

### Espectros Raman

Los espectros Raman de las muestras de bacterias (tanto las bacterias con los iones metálicos adsorbidos como las bacterias no tratadas que se usaron como controles) fueron registrados en un sustrato de aluminio y luego en un microscopio Leica integrado al sistema Raman (Renishaw 1000B). Para obtener la mayor información espectral de cada cepa, se llevaron a cabo varias exploraciones en diferentes puntos de la muestra moviendo el sustrato en las direcciones X e Y. El sistema de Raman se calibró con una silicona semiconductor utilizando el pico Raman a  $520\text{ cm}^{-1}$  como *standard* y para optimizar aún más la calibración se usaron muestras de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) [que aporta bandas a 261, 364 y  $667\text{ cm}^{-1}$ ] y ciclohexano ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ) [que aporta bandas a 383, 426, 801, 1028, 1157, 1265, 1347 y  $1443\text{ cm}^{-1}$ ]. La longitud de onda de excitación fue de 830 nm, y el láser se centró en la superficie de la muestra con un objetivo de 50 X (tamaño de la mancha de aproximadamente  $20\text{ }\mu\text{m}$ ). La irradiación de energía láser sobre las muestras fue de 45 mW.

El PCA se llevó a cabo de forma independiente sobre el conjunto de ocho muestras que corresponde a cada interacción de bacteria/metal en sus tres concentraciones. Se registraron 244 espectros Raman a partir de las ocho muestras que contenían los iones metálicos adsorbidos en diferentes concentraciones. Para la calibración del modelo se utilizó un total de 192 espectros Raman adquiridos a partir de los ocho conjuntos de muestras. Cada espectro se registró con una exposición de 30 s, dos acumulaciones, en la región de 1800-200  $\text{cm}^{-1}$  con 2  $\text{cm}^{-1}$  de resolución espectral.

### **Análisis de los datos**

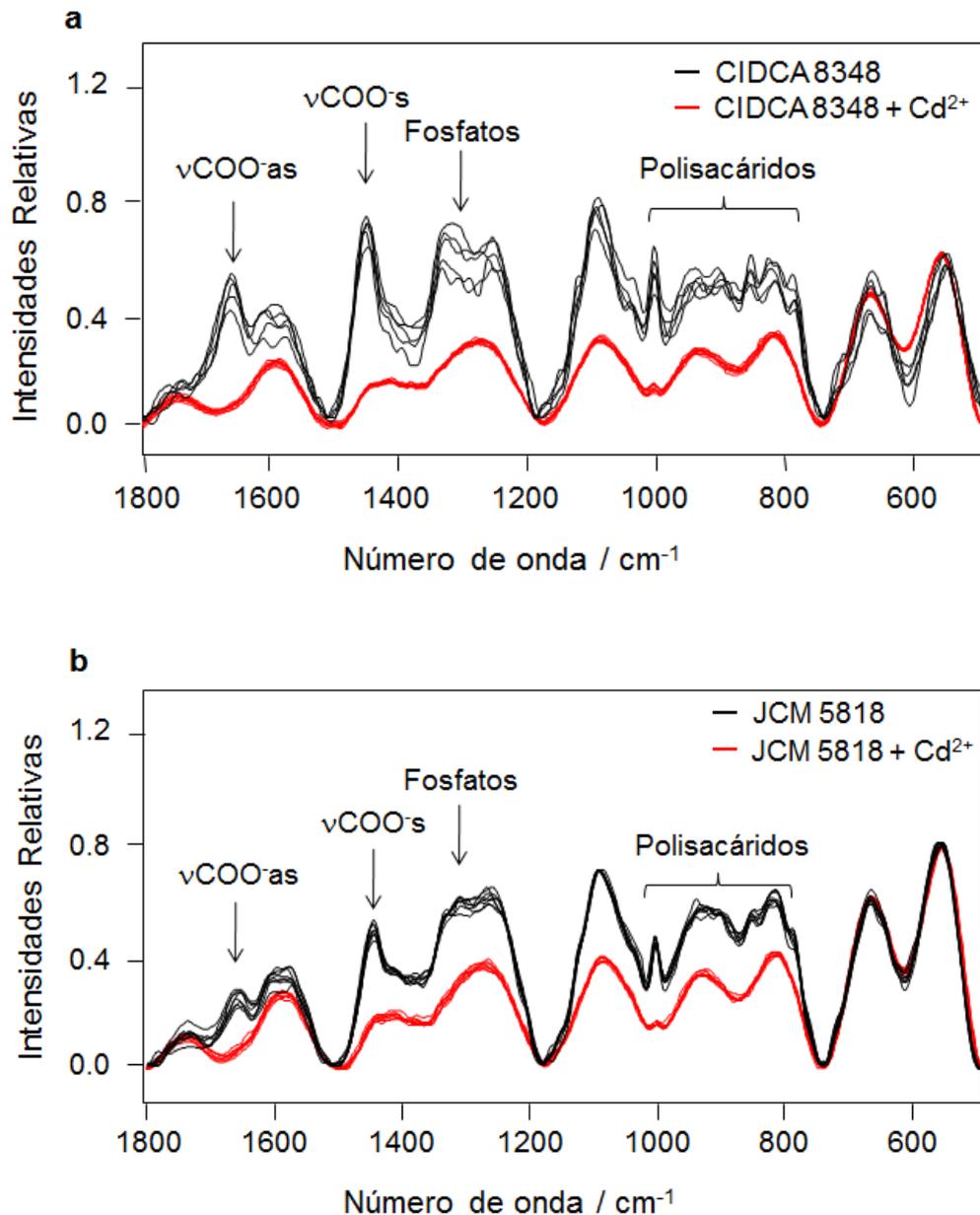
Los espectros Raman fueron analizados mediante el programa GRAMS (versión 3.04; Thermo Galactic, EE.UU.). El análisis multivariante y el procesamiento de datos [corrección de línea de base, autoescalado (centrado y normalización) y corrección de la multiplicación de dispersión (MSC)] se realizaron utilizando el programa computacional Unscrambler (versión 9.8; CAMO, Noruega).

El PCA se realizó sobre los espectros Raman preprocesados para evaluar las diferencias espectrales entre las cepas que previamente interactuaron con diferentes concentraciones de un único ion metálico en el espacio PC. A continuación, se calibraron los modelos PLS, que permitieron cuantificar los diferentes iones metálicos adsorbidos a la superficie de cepas *L. kefir* (Martens & Naes 1989; Esbensen 2005).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Análisis estructural

Como primer paso en el análisis espectral, se comparó los espectros Raman de ambas cepas de *L. kefir* no tratados (controles) con los obtenidos después del tratamiento con cada metal. Se observaron varias diferencias cualitativas. La **Figura 2.5** muestra un ejemplo de un espectro promedio Raman preprocesado para ambas cepas luego del tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  junto con sus controles correspondientes. Se observaron diferencias cualitativas similares para las otras muestras de bacteria/metal, en comparación con sus respectivos controles. Las principales diferencias entre los controles y las muestras de bacteria/metal indican los sitios de unión de los metales. La banda de  $1655\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento [o *stretching* ( $\nu$ )] asimétrico de los grupos carboxilato ( $\nu\text{COO}^-$  as), desaparece después del tratamiento con los metales. La banda de  $1445\text{ cm}^{-1}$  es claramente transformada en un hombro después de la interacción con los metales. Esta banda puede ser atribuida al estiramiento simétrico de grupos carboxilato ( $\nu\text{COO}^-$  s). Las modificaciones de ambas bandas,  $\nu\text{COO}^-$  as y  $\nu\text{COO}^-$  s, indican que las interacciones de las bacterias con los metales se producen a través de grupos carboxilato. Por su parte, la banda de  $1260\text{ cm}^{-1}$  desaparece después del tratamiento con metales y corresponde a los grupos fosfato. Por último, las diferencias observadas en el rango de  $1000\text{-}850\text{ cm}^{-1}$  se relacionan principalmente con polisacáridos de la pared celular.



**Figura 2.5:** Espectros Raman correspondientes a *L. kefir* CIDCA 8348/Cd<sup>2+</sup> (a) y *L. kefir* JCM 5818/Cd<sup>2+</sup> (b). Los espectros correspondientes a las cepas no tratadas con metales (controles) se muestran en negro.

En concordancia con resultados de otros autores, los espectros Raman de la **Figura 2.5** indican que la interacción bacteria/metal involucra grupos carboxilato y fosfato y también polisacáridos superficiales (Halttunen, *et al.*, 2007; Mrvcic, *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que la biosorción es un proceso que ocurre en la superficie bacteriana, las estructuras bacterianas superficiales

que participan en la interacción con los metales son los polisacáridos asociados con la pared celular y las proteínas de capa S, que son proteínas superficiales características de *L. kefir*. (Sara & Sleytr 2000; Mobili *et al.* 2010). Como se explicará detalladamente en el capítulo III, los grupos carboxilatos de las proteínas de capa S, de las cadenas laterales de aspartato y glutamato, estarían involucrados en la interacción capa S/ion metálico.

Por otro lado, las alteraciones observadas en las bandas correspondientes a los grupos fosfatos y polisacáridos avalan la participación de las estructuras de la pared celular en la interacción bacteria/metal.

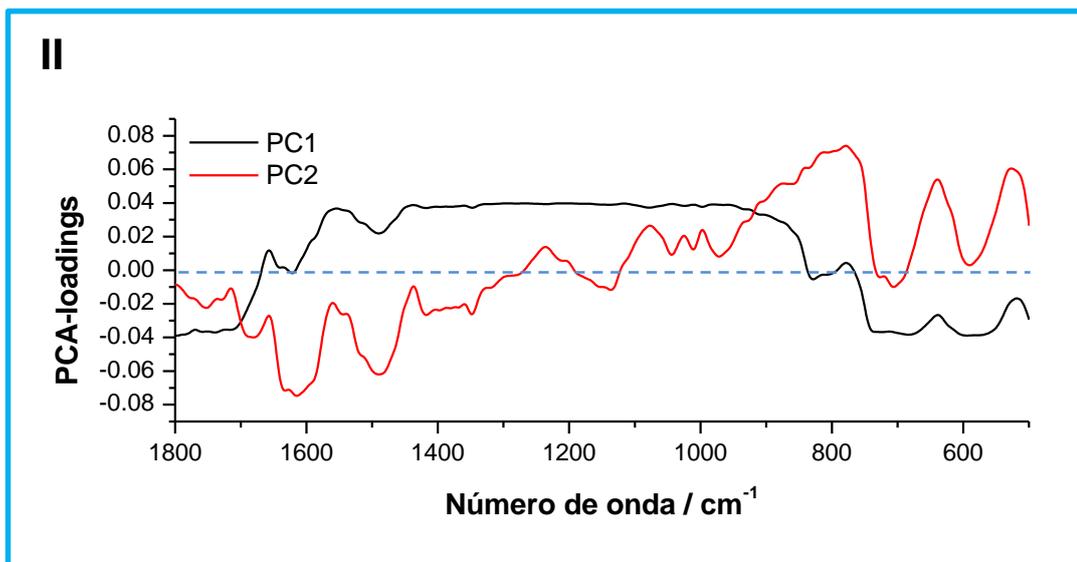
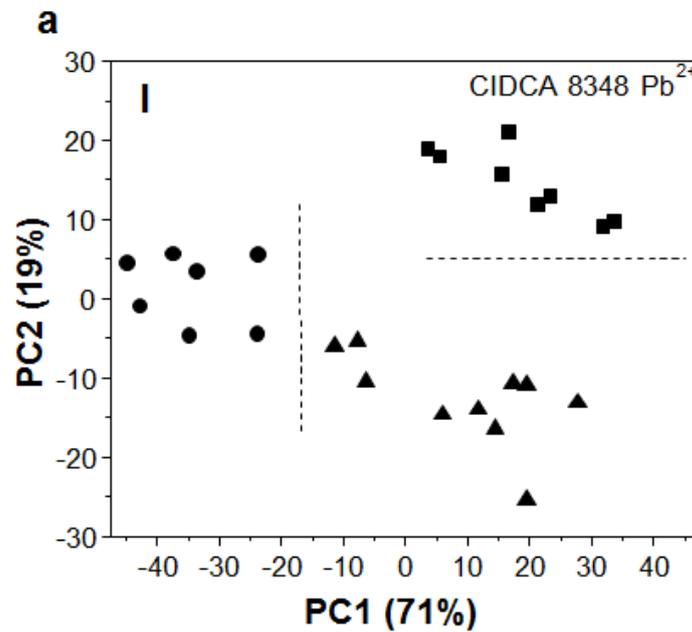
A partir de la información obtenida por espectroscopia Raman se utilizó el análisis multivariante para tratar de desarrollar un modelo que permitiera relacionar y cuantificar la interacción de los cuatro metales (en tres concentraciones) con las cepas de *L. kefir*.

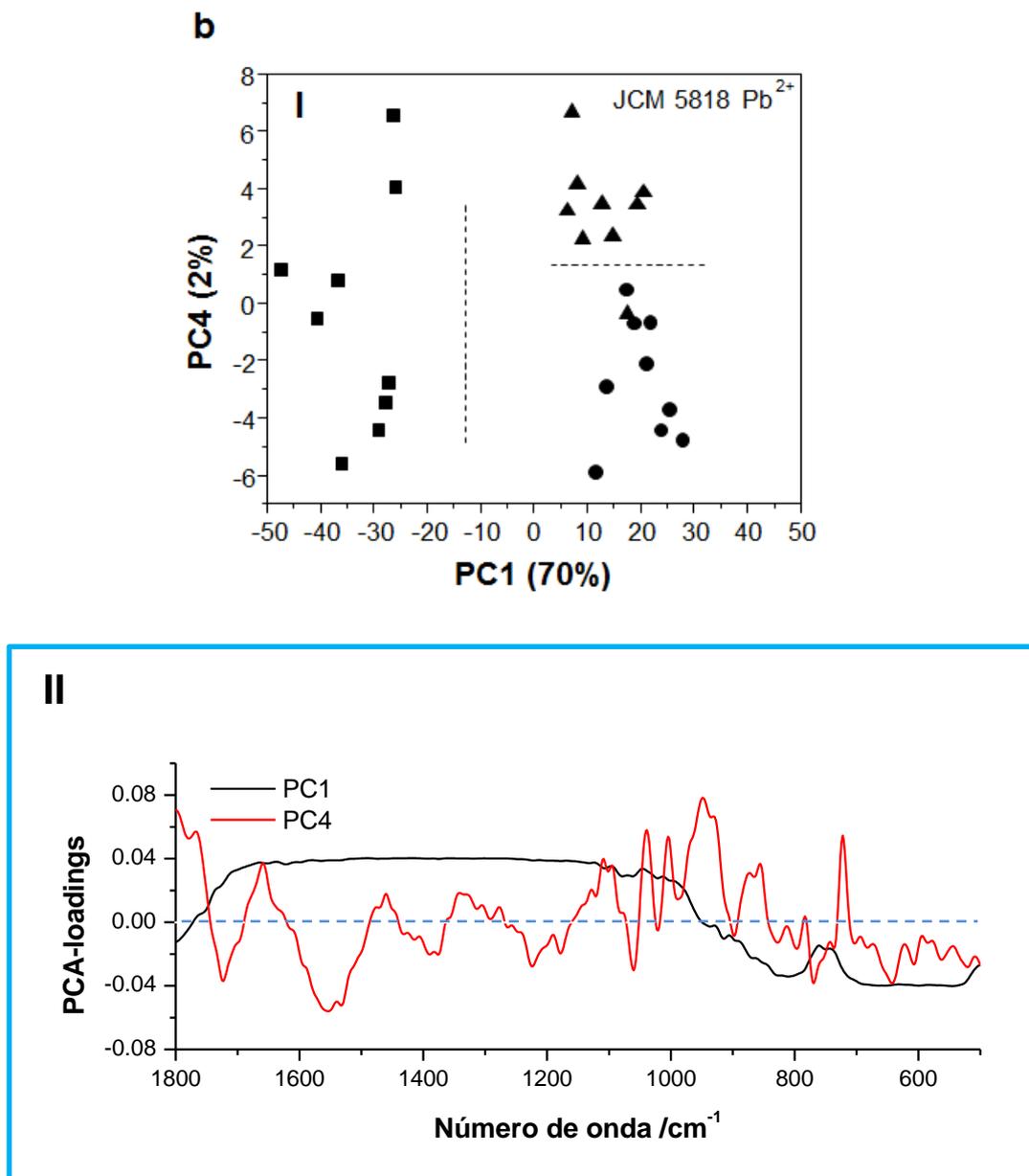
### **Análisis de componentes principales (PCA)**

El PCA se llevó a cabo para cada uno de los cuatro metales en estudio y ambas cepas, para investigar en una forma no supervisada si es posible agrupar los espectros experimentales en función de la concentración de iones metálicos unidos a la biomasa bacteriana. Teniendo en cuenta que los espectros Raman correspondientes a las cepas tratadas con las tres concentraciones de metales son claramente diferentes a los correspondientes controles (bacterias no tratadas) estos últimos no fueron considerados para el PCA. Esto se debe a que la inclusión de los controles en el PCA permite la separación de sólo dos grupos: bacteria con metal y bacteria sin metal (control) no pudiendo discriminar entre diferentes concentraciones de metal.

La **Figura 2.6 aI y II** muestra los gráficos de PCA llevados a cabo sobre la totalidad espectros Raman preprocesados en el rango 1800-200  $\text{cm}^{-1}$ , para la interacción de ambas cepas con  $\text{Pb}^{2+}$ . La **Figura 2.6 aI** muestra el gráfico correspondiente a PC2 vs PC1 de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348, y la **Figura 2.6**

**bI**, el gráfico de PC4 vs PC1 de *L. kefir* JCM 5818. En ambos casos, se observaron tres grupos separados correspondientes a las tres concentraciones analizadas.





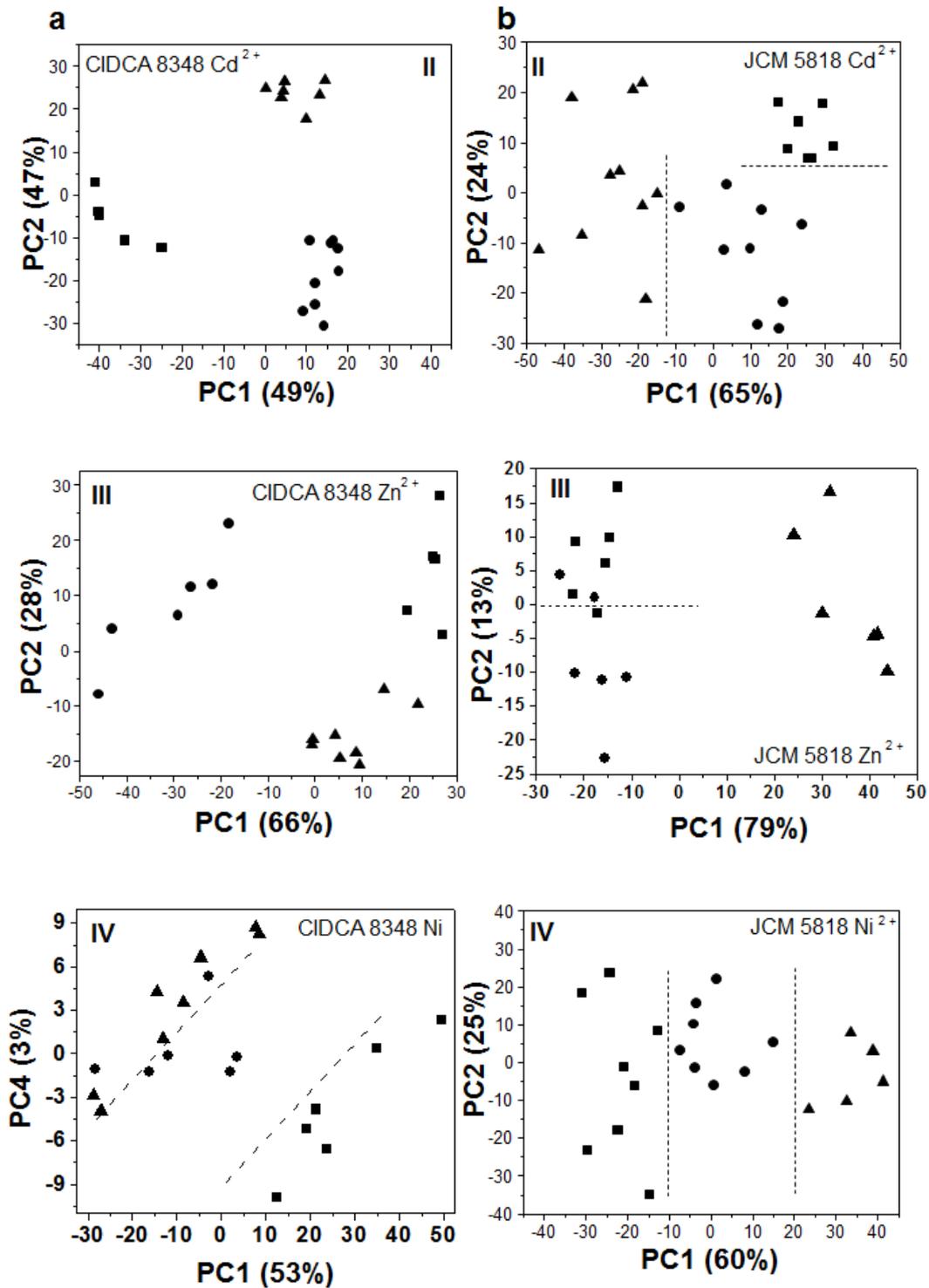
**Figura 2.6:** Gráfico de PCA realizado sobre el espectro Raman (región 1800-200 cm<sup>-1</sup>) de *L. kefir* luego de la interacción con diferentes concentraciones de plomo. **a I)** *L. kefir* CIDCA 8348: ■ 0.028, ● 0.181 y ▲ 0.217 mM. **b I)** *L. kefir* JCM 5818 ■ 0.028, ● 0.165 y ▲ 0.184 mM. **a II)** y **b II)** corresponden a los *loadings* del análisis de PCA realizado en todo el rango del espectro Raman (1800-600 cm<sup>-1</sup>) para las muestras en estudio. Las líneas celestes discontinuas indican zonas por arriba o debajo de cero que se corresponden con las variables más influyentes del gráfico de PCA-scores.

Además, en los gráficos de *loadings* de la **Figura 2.6 a II y b II** se observó las regiones espectrales que son influyentes para las agrupaciones en el gráfico de PCA-*scores*. Se identificaron como variables estadísticamente influyentes las zonas de  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la absorción de  $\nu\text{COO}^-$  y la zona de  $1000-800\text{ cm}^{-1}$  relacionada con los polisacáridos superficiales de la pared celular.

El análisis de PC para  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (**Figura 2.7**) muestra claras agrupaciones relacionados con las concentraciones de metal usada, para ambas cepas de *L. kefir*.

Los porcentajes de varianza explicada en cada componente principal después del PCA llevado a cabo en el conjunto de espectros Raman preprocesados para todas las interacciones bacterias/iones metálicos se muestran en la **tabla 2.1**. La varianza total explicada para los dos componentes que se muestra en la tabla es mayor que el 72 % en todos los casos salvo para *L. kefir* CIDCA 8348 con níquel (56%). En la mayoría de los casos la PC1 y PC2 explican la casi totalidad de la variabilidad de los datos. Sin embargo, en el caso de *L. kefir* JCM 5818 con  $\text{Pb}^{2+}$  y *L. kefir* CIDCA 8348 con  $\text{Ni}^{2+}$  se observó que la PC4 (a pesar de resultar en una variación residual baja), es la componente principal que permite discriminar los grupos en función de la concentración de metal. Esto último es debido a que la PC4 explica alguna propiedad adicional asociada a la concentración de metal.

Estos resultados de PCA indican una correlación muy buena entre la información contenida en los espectros Raman y las concentraciones de iones metálicos adsorbidos a la biomasa bacteriana. Los altos porcentajes de varianza explicada constituyen un sólido soporte para calibrar los modelos de predicción deseados.



**Figura 2.7:** Gráfico de PCA realizado a partir del espectro Raman (región 1800-200  $\text{cm}^{-1}$ ) de *L. kefir*. **a) CIDCA 8348** con diferentes concentraciones de **II) Cadmio**. ■ 0.060, ● 0.133, ▲ 0.172 mM, **III) Zinc** ■ 0.115, ● 0.307, ▲ 0.350 mM y **IV) Níquel** ■ 0.022, ● 0.110, ▲ 0.182 mM; **b) JCM 5818** con **II) Cadmio** ■ 0.062, ● 0.124, ▲ 0.210 mM, **III) Zinc** ■ 0.131, ● 0.351, ▲ 0.498 mM y **IV) Níquel** ■ 0.026, ● 0.118, ▲ 0.179 mM.

**Tabla 2.1:** Porcentaje de la varianza total explicada en cada componente principal luego del análisis de los componentes principales

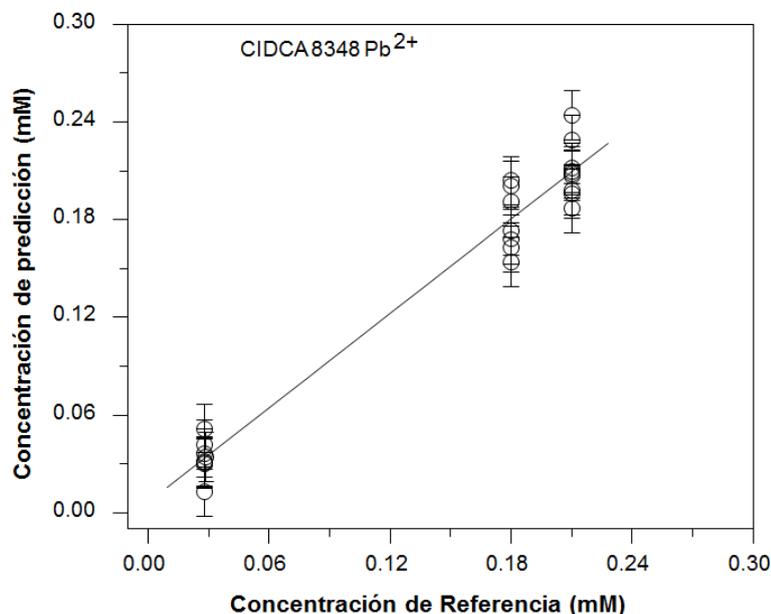
	PC1 (%)	PC2 (%)	PC4 (%)	Varianza total explicada (%)
<b><i>L. kefir</i> CIDCA 8348</b>				
Pb <sup>2+</sup>	71	19	-	90
Cd <sup>2+</sup>	49	47	-	96
Zn <sup>2+</sup>	66	28		94
Ni <sup>2+</sup>	53	-	3	56
<b><i>L. kefir</i> JCM 5818</b>				
Pb <sup>2+</sup>	70	-	2	72
Cd <sup>2+</sup>	65	24	-	89
Zn <sup>2+</sup>	79	13		92
Ni <sup>2+</sup>	60	25	-	85

### Mínimos cuadrados parciales (PLS)

Habiendo demostrado que un método no supervisado como el PCA permite una clara discriminación entre las diferentes concentraciones de los metales, en un paso posterior fueron calibrados modelos de predicción que permitiesen cuantificar metales en muestras desconocidas. Para este propósito, se desarrollaron los modelos basados en cuadrados mínimos parciales. Los PLS operan de una manera supervisada, lo que significa que se requiere un conocimiento previo de la concentración de iones de metal (Martens & Naes 1989).

La **Figura 2.8** muestra los resultados de la validación cruzada para el modelo de predicción desarrollado para la cuantificación de Pb<sup>+2</sup> adsorbido a *L. kefir* CIDCA 8348. El modelo se calibró usando los espectros pre-procesados Raman en el rango de 1800-200 cm<sup>-1</sup> y validado mediante el método de Leave-one-out-cross validation (LOOCV), debido al número limitado de muestras (Martens & Naes 1989). El error cuadrático medio de predicción (RMSEP) se

representa en las barras de error-Y. Los resultados obtenidos por métodos analíticos (**ver capítulo I Figura 1.10**) se utilizaron como concentraciones de referencia.



**Figura 2.8:** Validación cruzada del modelo de predicción de concentración para cuantificar  $Pb^{2+}$  adsorbido a *L. kefir* CIDCA 8348. El modelo se calibró usando los espectros Raman en la región de  $1800-200\text{ cm}^{-1}$ . Los resultados obtenidos por métodos analíticos se usaron como concentraciones de referencia. Los valores correspondientes a la validación cruzada de los modelos desarrollados para todas las condiciones (cepas y metales) se describen en la tabla 2.3 y los valores estadísticos en la tabla 2.4.

El mismo proceso se llevó a cabo para todos los iones metálicos para ambas cepas. Los datos completos del proceso de calibración/validación se muestran en la **Tabla 2.2**.

**Tabla 2.2.** Preparación del conjunto de datos y resultados del diseño de PLS

Cepa	<i>L. kefir</i> CIDCA 8348				<i>L. kefir</i> JCM 5818			
	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
Nº total de espectros registrados	29	31	30	32	31	30	31	30
Nº Espectros usados para la calibración	25	22	19	27	27	25	23	23
Nº Espectros eliminados de la calibración (outliers)	4	9	11	5	4	5	8	7
Método de validación	Loocv	Loocv	Loocv	Loocv	Loocv	Loocv	Loocv	Loocv
Nº. Espectros para validación	25	22	19	27	27	25	23	23
Tratamiento matemático	crudo	crudo	crudo	crudo	crudo	crudo	crudo	crudo
Pre-procesamiento	BLR, MSC 1/Std* MC	BLR, MSC 1/Std MC						
Factores de PLS para predicción	4	1	4	4	4	4	2	4

BLR: Remoción de la línea de base

MSC: Corrección de la dispersión multiplicativa.

MC: Media centrada.

Loocv: Leave-one-out-cross validation (Dejar uno afuera para la validación cruzada).

\*Estandarización.

La validación cruzada compara las concentraciones obtenidas utilizando métodos analíticos (**Ver capítulo I Figura 1.10**), con los obtenidos utilizando el modelo de predicción construido. El gráfico de PLS representado en la **Figura 2.8** es un ejemplo representativo de los resultados obtenidos a partir de los procesos de validación cruzada llevadas a cabo. A partir de estos

resultados, se puede concluir que la media de los valores predichos ajusta muy bien a los resultados obtenidos a partir de los métodos analíticos (**Tabla 2.3**). La **tabla 2.4** resume los valores estadísticos obtenidos para cada modelo de predicción de PLS calibrado y validado. Estos valores (correlación, R-cuadrado, RMSEP y SEP) indican la capacidad predictiva de cada modelo de predicción PLS.

**Tabla 2.3:** Comparación de concentraciones de metales calculadas por métodos analíticos con las concentraciones obtenidas por PLS.

	Valores determinados por métodos analíticos (mM)	Valores obtenidos por PLS (mM)
<b><i>L. kefir</i> CIDCA 8348</b>		
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	0.028	0.033
	0.181	0.179
	0.217	0.210
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	0.060	0.065
	0.133	0.131
	0.172	0.164
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	0.115	0.131
	0.307	0.296
	0.350	0.340
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	0.022	0.025
	0.110	0.121
	0.182	0.149
<b><i>L. kefir</i> JCM 5818</b>		
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	0.028	0.032
	0.160	0.161
	0.184	0.174
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	0.062	0.066
	0.124	0.122
	0.210	0.195
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	0.131	0.236
	0.351	0.257
	0.498	0.487
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	0.026	0.033
	0.118	0.102
	0.179	0.163

**Tabla 2.4:** Valores estadísticos calculados en el paso de validación para la calibración de modelos de cada interacción bacteria-metal en la región de 1800-200  $\text{cm}^{-1}$ .

Cepa	<i>L. kefir</i> CIDCA 8348				<i>L. kefir</i> JCM 5818			
	Muestra	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
<b>Correlación</b>	0.98	0.96	0.93	0.88	0.96	0.95	0.78	0.93
<b>R-square</b>	0.96	0.93	0.89	0.80	0.93	0.92	0.64	0.88
<b>RMSEP</b>	0.015	0.010	0.033	0.028	0.017	0.016	0.095	0.020
<b>SEP</b>	0.015	0.011	0.034	0.029	0.017	0.016	0.097	0.020

**R-square:** Coeficiente de determinación.

**RMSEP:** Error cuadrático medio de predicción.

**SEP:** Error estándar de desempeño.

Los resultados presentados en la **Figuras 2.6 y 2.7** permitieron la construcción de modelos de cuantificación a partir de los espectros Raman (**Tabla 2.3 y Figuras 2.6 y 2.7**). Los valores estadísticos de la **Tabla 2.4** constituyen un soporte válido para la utilización de estos modelos en la cuantificación de iones metálicos adsorbidos a la superficie bacteriana. De acuerdo a nuestro conocimiento, la espectroscopia Raman no se ha utilizado para la cuantificación de metales pesados adsorbidos a microorganismos. Por lo tanto, la contribución más importante de este capítulo es el desarrollo de un modelo de predicción útil para la determinación de metales pesados en muestras desconocidas. Para obtener esta información, el único requerimiento experimental es el registro *in situ* del espectro Raman (es decir, no se necesitan posteriores tratamientos de las muestras). Por otra parte, el uso de la espectroscopía Raman en el estudio de la adsorción de iones metálicos a las células bacterianas tiene un valor agregado: además de ser eficiente como método de cuantificación, al mismo tiempo proporciona información estructural sobre los sitios que participan en la interacción bacteria/metal.

## CONCLUSIONES

El principal logro de este capítulo fue desarrollar un modelo de calibración multivariante que permite cuantificar la interacción de iones metálicos con bacterias lácticas a partir del solo registro de espectros Raman. En este contexto, se destacan además los siguientes aportes:

a) La identificación de las estructuras bacterianas que participan en la interacción bacteria-metal, se producen principalmente a través del carboxilato y polisacáridos expuestos en la superficie bacteriana.

b) El desarrollo de un modelo de cuantificación que permite una evaluación directa y rápida de esta interacción.

A su vez el análisis de componentes principales permitió una clara discriminación de los espectros de las bacterias por la interacción de metales en diferentes concentraciones.

El modelo de PLS desarrollado en este trabajo es potencialmente útil para la cuantificación de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  en muestras desconocidas.

## CAPÍTULO III

Análisis estructural de la interacción de proteínas de capa-S de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 con plomo, cadmio, zinc y níquel

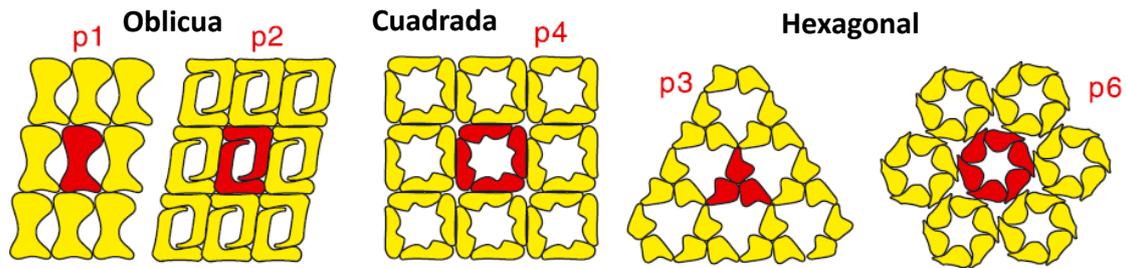
## INTRODUCCIÓN

La capacidad de las bacterias para interaccionar entre ellas o con los diferentes elementos de su entorno está determinada en gran parte por las propiedades de sus estructuras superficiales. Entre dichas estructuras superficiales, las proteínas de capa S constituyen las estructuras bacterianas más externas en más de 600 especies diferentes de microorganismos.

Las proteínas de capa S son estructuras regulares ubicadas sobre la superficie externa de la bacteria. Están formadas por subunidades de proteína o glicoproteína que se autoensamblan formando una red cristalina bidimensional que cubre por completo al microorganismo durante todas las etapas del crecimiento (Sleytr *et al.*, 2001). Estos arreglos regulares de macromoléculas están ampliamente distribuidos entre los procariotas, y se ha demostrado su presencia en microorganismos pertenecientes a casi todos los grupos taxonómicos de los dominios *Archaea* y *Bacteria*, tanto Gram (-) como Gram (+) (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005; Sleytr *et al.*, 2001).

Las proteínas de capa S de diferentes microorganismos están compuestas en su mayor parte por un único tipo de proteína o glicoproteína con masa molecular de 40 a 200 kDa. El grado de glicosilación de las proteínas de capa S puede variar entre un 2 y 10 % (p/p) (Sleytr *et al.*, 2007).

Las proteínas de capa S poseen de 5 a 25 nm de espesor, y las subunidades que las componen se ensamblan entre sí formando poros (tamaño desde 2 a 8 nm) con una determinada morfología. Estos poros representan en conjunto el 30-70 % de la superficie total de las proteínas (Sára & Sleytr, 2000). A fin de comparar sus estructuras, las proteínas de capa S se clasifican de acuerdo con la posición de los protómeros o subunidades proteicas y de los poros en relación a los ejes de simetría (**Figura 3.1**). De esta forma, las subunidades se ordenan en un entramado con simetría oblicua, cuadrada o hexagonal. Cada unidad morfológica se compone entonces de una (p1), dos (p2), tres (p3), cuatro (p4) o seis (p6) subunidades proteicas idénticas con distancias de 3 a 30 nm de centro a centro (Sleytr *et al.*, 2007).



**Figura 3. 1:** Esquemas ilustrando los diferentes tipos de simetría bidimensional que pueden presentar las proteínas de capa S. Una unidad morfológica (en rojo) en la simetría oblicua consiste en una (p1) o dos (p2) subunidades idénticas, en la simetría cuadrada consiste en cuatro (p4) subunidades, mientras que en la simetría hexagonal puede estar formada por tres (p3) o seis (p6) subunidades (modificado de Sleytr *et al.*, 2007).

La presencia de proteínas de capa S ha sido descrita en muchas especies de lactobacilos tales como *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus* (Messner & Sleytr, 1992), *L. plantarum* (Möschl *et al.*, 1993), *L. crispatus* (Toba *et al.*, 1995) y más recientemente en *L. parakefir* y *L. kefir* aislado de granos de kefir (Garrote *et al.*, 2004).

Las proteínas de capa S del género *Lactobacillus* están entre las más pequeñas descritas hasta el momento, con tamaños que van desde 25 kDa (Ventura *et al.*, 2002) hasta 71 kDa (Garrote *et al.*, 2004), y presentan algunas similitudes con respecto a las de otros microorganismos en cuanto a la composición aminoacídica. Entre las características comunes con otras proteínas de capa S se pueden citar el elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos (31.9 % al 38.7 %), el reducido contenido de aminoácidos con residuos azufrados, (no mayor del 2 %, de los cuales la mayoría corresponden a metionina), elevado porcentaje de aminoácidos con restos hidroxilados (23-33 %) y el hecho de que la lisina es el aminoácido básico predominante (10 %) (Åvall- Jääskeläinen & Palva, 2005; Sára & Sleytr, 2000). Por otro lado, uno de los rasgos diferenciales más notables en las proteínas de capa S del género

*Lactobacillus* lo constituye el número de residuos positivamente cargados siempre mayor que el número de residuos negativamente cargados, lo que determina los elevados valores de punto isoeléctrico (pI) (de 9 a 10.4) calculados para estas proteínas a partir de sus secuencias aminoacídicas (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005). A pesar de la naturaleza básica de las proteínas de capa S producida por *Lactobacillus*, se ha encontrado que la carga superficial es negativa, probablemente debido a la participación de las zonas cargadas positivamente de proteínas de capa S en su unión al peptidoglicano (Smit *et al.*, 2001; Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003). Solamente las proteínas de capa S del archaea *Methanothermus fervidus* (Brökl *et al.*, 1991) comparten pI altos con los lactobacilos, ya que el resto de las proteínas de capa S poseen pI con valores entre 3 y 6 (Sára & Sleytr, 2000).

Las subunidades constituyentes de la mayoría de las proteínas de capa S interactúan unas con otras y con los constituyentes subyacentes de la envoltura celular a través de fuerzas no covalentes, tales como uniones iónicas, interacciones hidrofóbicas o de puente de hidrógeno, y algunas requieren cationes mono o divalentes para el mantenimiento de su integridad estructural (Sleytr & Beveridge, 1999; Sleytr & Messner, 1988). Para la extracción de proteínas de capa S se utilizan distintos agentes caotrópicos, capaces de debilitar las interacciones entre las subunidades proteicas provocando así la disrupción de la capa S con la consiguiente liberación de sus componentes en forma de monómeros o de oligómeros. Uno de los agentes utilizados para tal fin es el LiCl en concentración 5 M (Mobili *et al.*, 2009), un agente disociante con propiedades caotrópicas, ya que los iones  $\text{Li}^+$  alteran la estructura del agua y reducen así las interacciones hidrofóbicas (Rojas *et al.*, 2002). Una vez removido el agente disruptor, las subunidades aisladas de proteínas de capa S son capaces de recristalizar en arreglos regulares sobre soportes sólidos, interfaces líquido superficie, sobre películas lipídicas y liposomas. Las estructuras regulares formadas son idénticas a las que se observan en la superficie de las bacterias intactas. Tal como ocurre en otros sistemas capaces de autoensamblarse, las subunidades individuales de proteínas de capa S

contienen toda la información requerida para el crecimiento del arreglo regular (Sleytr & Beveridge, 1999).

La capacidad de las proteínas de capa S para autoensamblarse formando arreglos bidimensionales altamente regulares les otorga un elevado interés para aplicaciones bio- y nanotecnológicas (Sleytr *et al.*, 2007). Esto comprende su utilización como: a) membranas de filtración con tamaño uniforme de poro; b) estructuras de soporte para la inmovilización e incorporación de moléculas con determinadas funciones (antígenos, anticuerpos, ligandos, enzimas); c) matrices para el desarrollo de biosensores; d) soportes y matrices de estabilización de membranas lipídicas, liposomas y emulsiones; e) adyuvantes de antígenos inmunogénicamente débiles y haptenos; f) matrices para la formación de superficies nanoestructuradas con un patrón repetitivo de propiedades fisicoquímicas definidas. Esta última aplicación está relacionada con la capacidad de las proteínas de capa S de algunas bacterias para unir cationes metálicos, lo cual por un lado serviría como sitio de iniciación para la formación de nanoclusters de metales (con importantes aplicaciones en nanoelectrónica), y por otro lado permitiría su utilización como materiales filtro para biosorción de iones a partir de soluciones contaminadas con metales pesados (Pollmann *et al.*, 2006; Sára *et al.*, 2006; Sleytr *et al.*, 2007; Pollmann & Matys, 2007).

La relevancia de estas aplicaciones requiere estudios detallados en lo que respecta a las propiedades estructurales de las proteínas de capa S y de su interacción con metales pesados.

La utilización de diferentes técnicas ha permitido un gran avance en la identificación y posterior caracterización de las proteínas de capa S, así como también en las interacciones con distintos metales pesados. En este sentido, la **microscopía de fuerza atómica (AFM)** y la **espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)** han posibilitado la obtención de valiosos resultados (Mobili *et al.*, 2009; Györvary *et al.*, 2003).

## Microscopía de Fuerza Atómica

En los últimos años, el empleo de **AFM** ha permitido obtener imágenes de alta resolución en lo que respecta tanto a la topografía de biomoléculas como a sus propiedades físicas y fuerzas de interacción. Esto permitió la obtención de modelos o reconstrucciones tridimensionales de las proteínas de capas S en tiempo real. El empleo de AFM posee varias ventajas tales como:

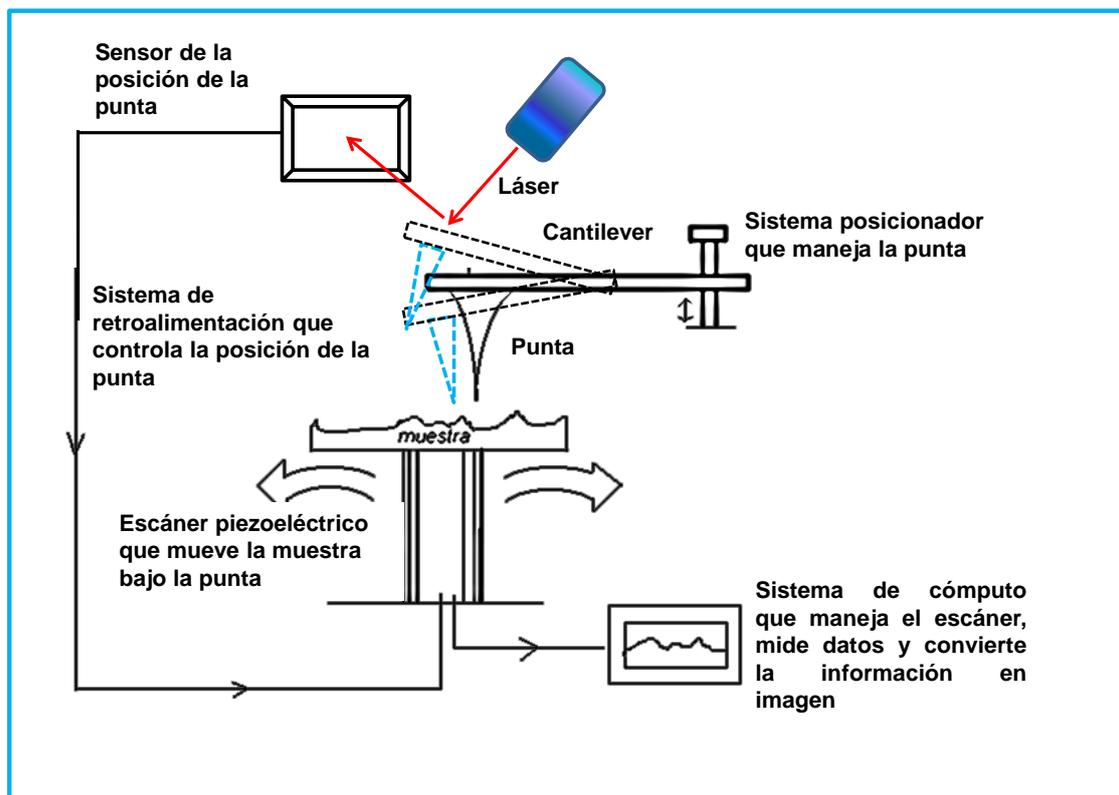
**1)** la posibilidad de investigar proteínas en su medio natural o en solución sin necesidad de usar sondas o de deshidratar muestras, conservando un aspecto lo más parecido posible al que presenta la estructura nativa sobre la superficie celular;

**2)** presenta resoluciones mayores que 1 nm, lo que permite lograr imágenes de hasta una subunidad proteica y

**3)** permite visualizar alteraciones conformacionales de biomoléculas simples (Fotiadis *et al.*, 2002).

El microscopio de fuerza atómica tiene 6 elementos fundamentales: la punta, el escáner, el láser, el detector, el sistema de control electrónico y el sistema de aislamiento de vibración (**Figura 3.2**). La **punta** se selecciona de acuerdo al tipo de muestra y a las propiedades que se desean determinar; ésta puede ser de diferentes materiales. Las más comunes son de nitruro de silicio o de silicio. El diseño del **escáner** tiene forma de tubo y es de un material cerámico piezoeléctrico que cambia de dimensiones en respuesta a un voltaje aplicado. Estos escáneres se caracterizan por tener tres grados de libertad, expandiéndose en una dirección y contrayéndose en otra como resultado del voltaje aplicado a sus electrodos. También se caracterizan por su frecuencia de resonancia, su rango de barrido el cual depende del material piezoeléctrico, sus dimensiones y el voltaje aplicado. El mayor intervalo de operación de un escáner es de  $\sim 100 \mu\text{m}$  en movimiento lateral y  $\sim 10 \mu\text{m}$  en movimiento vertical. Un **láser** incide sobre la punta localizada al final de un *cantilever* (micropalanca) a medida que se monitorea la superficie de la muestra. Las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra provocan la deflexión del *cantilever* que se traduce en un cambio en la posición de incidencia del láser en el **detector**.

El **sistema de control electrónico** rectifica, subiendo o bajando el escáner piezoeléctrico, de forma que el haz vuelva a incidir en el centro del detector. La medida de deflexión del *cantilever* por el detector, genera una micrografía de la superficie, es decir las imágenes son generadas por “sentir” más que por “mirar” las muestras (**Figura 3.2**). La fuerza interatómica que contribuye a la deflexión del *cantilever* es la fuerza de Van der Waals (Morris *et al.*, 1999). Por último, para obtener buenos resultados en AFM es necesario un **aislamiento perfecto de vibraciones**, que consiste en una gran masa sujeta por cuerdas ancladas a la estructura del edificio donde se encuentra el equipo.



**Figura 3.2:** Diagrama general del funcionamiento de un AFM.

El microscopio de fuerza atómica utiliza múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir:

*Tapping.* También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.

*No Contacto o Atractivo*: Mide la topografía, de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta. Es decir, el *cantilever* se sitúa a “larga” distancia (entre 10 y 20 Å) y, por lo tanto, predominan las fuerzas de atracción.

Y por último el modo con el cual se trabajó en esta tesis,

***Contacto (o modo repulsivo)***: en este modo, la punta barre la superficie de la muestra, aplicando una fuerza constante ( $F = \text{constante}$ ) y sin levantar la punta de la superficie. La fuerza aplicada está relacionada con la deflexión que experimenta la punta mediante la constante de fuerza del *cantiléver*. Así:

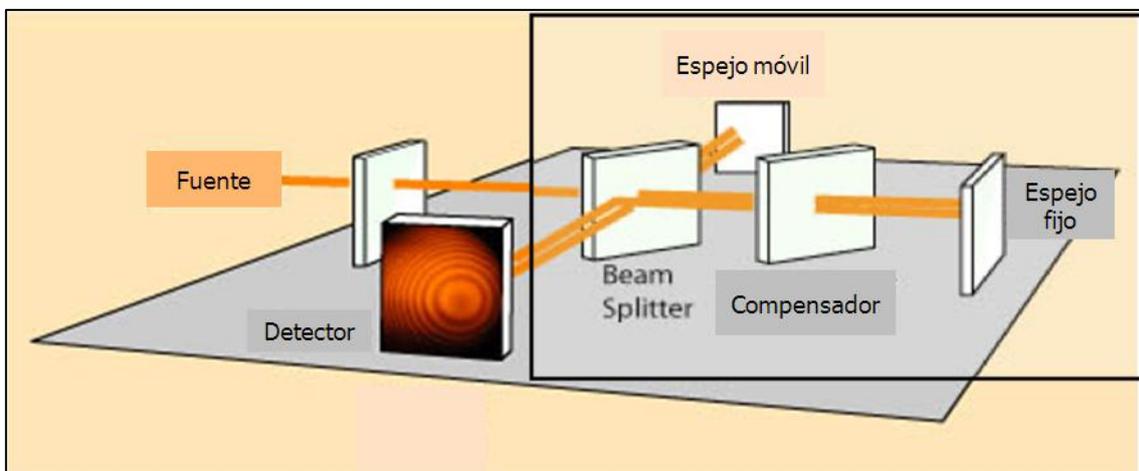
$$F = -k \cdot D \quad (\text{III.1})$$

donde **F** es la fuerza aplicada, **k** es la constante de fuerza del *cantilever* y **D** la deflexión. El signo negativo indica que la fuerza actúa en dirección opuesta al desplazamiento del *cantilever*. Por lo tanto, trabajar a una determinada deflexión ( $D = \text{constante}$ ) es equivalente a trabajar a una fuerza constante, ya que son proporcionales. Así, se fija la deflexión de trabajo (**D<sub>sp</sub>**;  $s_p = \text{setpoint}$ ) y a medida que la punta hace el barrido en el plano de la superficie X-Y, el escáner (tubo piezoeléctrico) sube o baja (en Z) para mantener una deflexión constante ( $D = \text{cte} \Rightarrow F = \text{cte}$ ). Representando la altura de la punta (Z) en función de su posición sobre la muestra (X, Y) es posible trazar un mapa topográfico de la muestra  $Z=Z(X, Y)$  es decir obtener una imagen (Morris *et al.*, 1999).

### **Espectroscopía de Infrarrojo por Transformadas de Fourier**

La caracterización estructural e identificación de los sitios de unión de las proteínas durante la biosorción de metales pueden llevarse a cabo mediante técnicas **espectroscópicas no destructivas** (Vijayaraghavan & Yun, 2008), que son aquellas en las cuales las moléculas permanecen intactas durante su análisis como es el caso de la espectroscopía **FTIR**.

El espectrómetro de infrarrojo por transformadas de Fourier está basado en el principio del interferómetro de Michelson (**Figura 3.3**). La radiación proveniente de una fuente de luz blanca llega a un divisor de haz (generalmente de KBr, recubierto con una película delgada de Germanio) que escinde el haz de luz en dos partes iguales. Los dos haces de luz son luego reflejados sobre dos espejos dispuestos uno enfrente (espejo móvil) y otro perpendicular (espejo fijo) a la trayectoria del haz original. En su viaje de vuelta los haces interfieren en el divisor y atraviesan la muestra para luego alcanzar al detector. Si el espejo móvil se desplaza se producirá una diferencia en el camino óptico recorrido por los dos rayos, lo que conducirá a una diferencia de fase entre ambos al llegar al detector. De acuerdo a la relación entre la diferencia de camino recorrido por cada rayo y el valor de la longitud de onda ( $\lambda$ ), para cada  $\lambda$  los dos rayos interferirán de manera constructiva o destructiva, haciendo que la señal que llega al detector sea mayor o menor. Cuando una luz blanca atraviesa el divisor de haz, todas las señales moduladas se superponen. El detector está permanentemente observando todas las frecuencias al mismo tiempo. La representación de la intensidad de esta onda en función de la distancia recorrida por el espejo es lo que se llama interferograma.



**Figura 3.3:** Esquema del interferómetro de Michelson.

El interferograma luego de ser registrado es amplificado y digitalizado por un conversor analógico/digital y finalmente transformado a un espectro mediante una técnica rápida de transformada de Fourier.

El espectro IR de una muestra se obtiene evaluando la intensidad de la radiación IR antes y después de pasar por la muestra. Entonces, el espectro IR de la muestra se puede expresar como:

$$T = I_S / I_R \text{ en función del número de onda,}$$

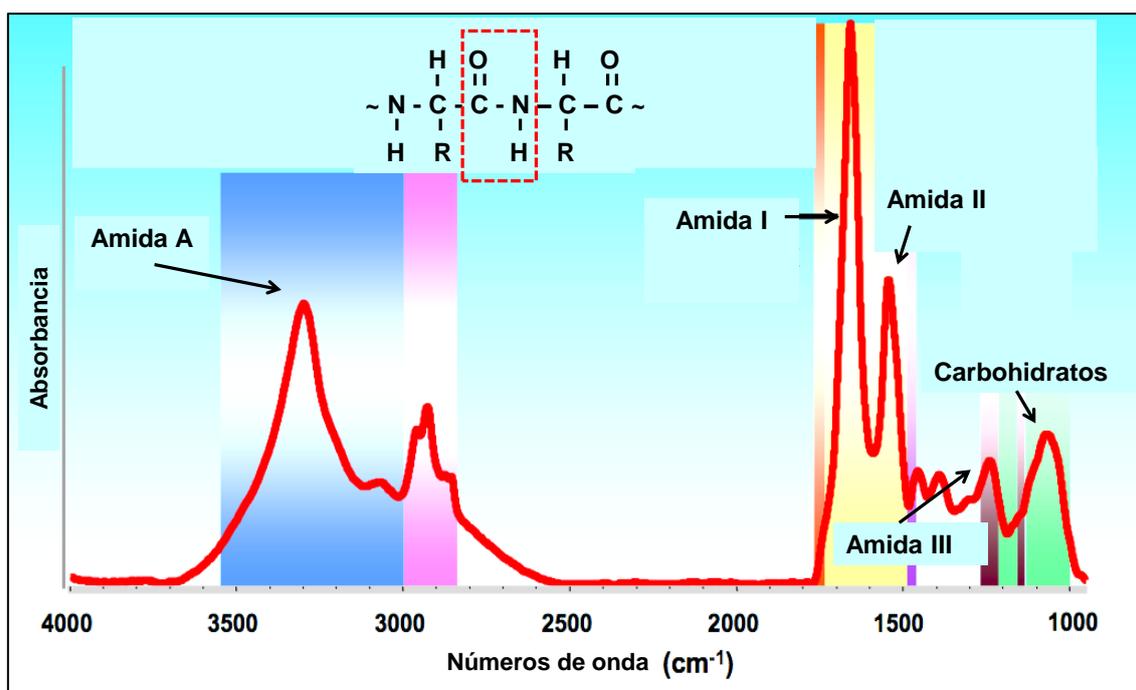
donde T es la transmitancia,  $I_S$  es la intensidad IR antes de pasar por la muestra y  $I_R$  es la intensidad IR después de pasar por la muestra. En muchos casos se utiliza la absorbancia ( $A = -\log T$ ) que de acuerdo a la ley de Lambert y Beer, es directamente proporcional a la concentración de la muestra. El registro gráfico del % de radiación absorbida o transmitida por la muestra en función de la longitud de onda o del número de onda (definido como la inversa de la longitud de onda) de la radiación infrarroja incidente es lo que se llama espectro IR.

El espectro IR consiste en un gran número de bandas de absorción que se originan a partir de vibraciones de estiramiento y balanceo de los enlaces de las moléculas excitadas por la absorción de la radiación IR. Desde un punto de vista cuántico, una vibración es activa en el IR si el momento dipolar de la molécula cambia en su módulo u orientación. Cada grupo funcional absorbe luz IR de determinadas frecuencias, originando bandas de absorción características. Ciertas diferencias estructurales (conjugación, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals) modifican el entorno en el que se encuentran los grupos funcionales. Como consecuencia, la frecuencia de absorción de un grupo determinado sufrirá pequeños corrimientos resultantes de las alteraciones del entorno en el que se encuentran.

La espectroscopía FTIR se ha utilizado extensivamente en sistemas biológicos para la elucidación y análisis de la estructura secundaria de proteínas (Matheus *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 1990). Algunas ventajas del FTIR sobre otras técnicas radican en que las muestras pueden ser estudiadas en solución,

como films hidratados, dispersiones no homogéneas o sólidos. Además, el tamaño de las proteínas no es un factor limitante y la cantidad de proteína para tener una "señal aceptable" es baja (1 mM).

Se han identificado nueve bandas con frecuencias características que se originan a partir de los modos vibracionales de los grupos amida de los enlaces peptídicos de las proteínas (Krimm & Bandekar, 1986). Las principales bandas son la **amida A** (centrada alrededor de  $3200\text{ cm}^{-1}$ ), originada por el estiramiento (*stretching*) N-H, la **amida I** ( $1720\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ), originada en un 80 % por el *stretching* del grupo C=O con una contribución del 20 % de la deformación (*bending*) C-N, la **amida II** ( $1600\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$ ) originada en un 60 % por el *bending* del N-H y en un 40 % por el *stretching* C-N. A su vez, la combinación de los modos vibracionales de *bending* N-H y *stretching* C-N, junto con contribuciones menores de otros modos vibracionales originan la banda de **amida III**. Esta última es generalmente menos intensa que las bandas de amida I y amida II y se observa en el rango de  $1300\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4:** Espectro FTIR de una glicoproteína, indicando algunas de las bandas características más comúnmente utilizadas en análisis estructurales de proteínas. En el recuadro se destacan los enlaces cuyas vibraciones originan las bandas de amida.

La banda de **amida I** es la más útil para el estudio de la estructura secundaria de proteínas y péptidos ya que proviene fundamentalmente de un solo tipo de vibración (*stretching* del grupo C=O), la cual es sensible a cambios de conformación. Además, la banda amida I está fuertemente influenciada por los puentes de hidrógeno que originan los diferentes elementos de estructura secundaria. Usualmente cada proteína contiene varias regiones con diferentes tipos de estructura secundaria tales como  **$\alpha$ -hélice**, **hojas- $\beta$**  y **regiones desordenadas**, por lo tanto el contorno de la banda de amida I se origina de la superposición de los diferentes componentes individuales, cada uno de ellos absorbe a un número de onda específico.

A partir de estudios de proteínas de estructura secundaria conocida, polímeros modelo y cálculos teóricos, se han asignado las bandas de absorción IR específicas para diferentes tipos de estructura secundaria (**Tabla 3.1**) (Souillac *et al.*, 2002; Costantino *et al.*, 1998; Torii & Tasumi, 1996; Dong *et al.*, 1990).

**Tabla 3.1** Asignación empírica de las distintas componentes de la banda de amida I a elementos de estructura secundaria en las proteínas

<b>Estructura secundaria asignada*</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
hoja $\beta$ -intermolecular	1620-1630
hoja $\beta$ -intramolecular	1620-1640
estructuras desordenadas	1640-1650
$\alpha$ -hélice	1650-1660
giro $\beta$	1660-1695
hoja $\beta$ -intramolecular	1675
hoja $\beta$ -intermolecular	1690-1700

\*según Souillac *et al.*, 2002; Costantino *et al.*, 1998; Torii & Tasumi, 1996; Dong *et al.*, 1990

El primer paso en el análisis de proteínas consiste en el pre-procesamiento de los espectros, cuyo objetivo es obtener o aprovechar, la mayor cantidad de información contenida en los mismos. Sin embargo, si el

tratamiento espectral no es el adecuado, la información obtenida será incorrecta, pudiendo alterar parcial o totalmente la integridad de los datos (Stuart, 2004). A continuación se detallan métodos y técnicas para el procesamiento matemático de los espectros:

El **suavizado**, es utilizado para reducir el nivel de ruido en los espectros. El fin es, amplificar la información contenida en los mismos, y que debido al ruido, es difícil de observar.

La **diferencia de espectros**, es utilizado cuando se desea obtener el espectro de una componente, en una mezcla. Los espectros deben estar dados en unidades que sean linealmente proporcionales a la concentración. Este método esta basado en la siguiente ecuación, que describe el proceso para la resta o substracción de espectros:

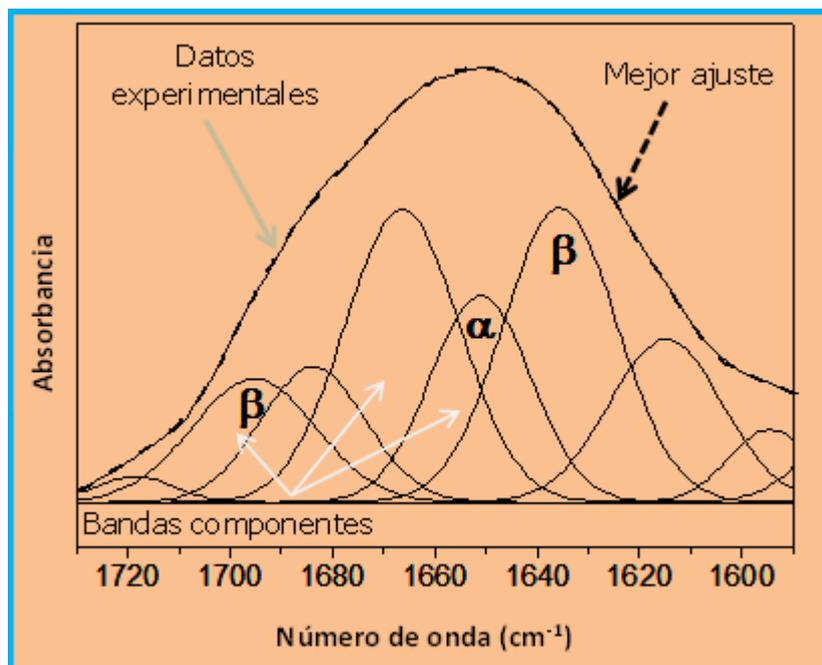
$$S_{mezcla} - f(S_{referencia}) = S_{resultado} \quad (III.2)$$

donde  $S_{mezcla}$ , representa el espectro de la mezcla de componentes;  $S_{referencia}$ , es el espectro de la componente a restar del espectro de la mezcla;  $f$ , es una cantidad adimensional conocida como factor de escala o factor de substracción, y tiene como propósito, escalar el espectro de referencia, y eliminar en un alto porcentaje, la contribución de la componente de referencia en el espectro de la mezcla. Finalmente,  $S_{resultado}$ , es el espectro resultante, sin la contribución de la componente de referencia.

La **derivación** de un espectro, provee información que puede ser útil para su análisis e interpretación. Por ejemplo, la segunda derivada de la banda amida I nos proporciona la posición de cada máximo en el espectro original, y es muy útil para identificar el número de bandas superpuestas en una región del espectro.

El proceso de **deconvolución** tiene como principal objetivo, la resolución de bandas superpuestas en un espectro. Esta técnica permite obtener espectros con bandas más estrechas, y discriminar bandas que se encuentran relativamente cercanas. Mediante el *peak-fitting* se realiza el

ajuste teórico a un espectro experimental. Los métodos para el *peak-fitting*, generalmente se basan en un ajuste por mínimos cuadrados, asegurando así, que la diferencia entre el espectro experimental y el generado teóricamente, sea mínima. En el caso de la banda de amida I, el ajuste se realiza generalmente utilizando la función resultante de la suma de funciones Gaussianas o Lorentzianas o una combinación de ambas (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5:** Espectro FTIR en la región amida I para proteína de capa S de *L. kefir* JCM 5818 y ajuste de picos de los mismos. Se representan los datos experimentales (línea continua) y las bandas componentes (líneas negras llenas) que originan el mejor ajuste o *peak-fitting* (líneas cortadas). También se muestran las asignaciones de estructura secundaria para algunas bandas componentes (Mobili *et al.*, 2009).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1- Extracción y preparación de proteínas de capa S de las células bacterianas**

Los microorganismos fueron crecidos hasta alcanzar la fase estacionaria, cosechados por centrifugación (10000 *g* a 10 °C durante 10 min), lavados dos veces con buffer PBS (pH=7), y resuspendidos a una DO<sub>550nm</sub> de 10 en el mismo buffer. Como agente de extracción se utilizó LiCl 5 M (JT Baker, Mallinckrodt Baker S.A., México). Un mL de la suspensión bacteriana se mezcló con 4 mL de LiCl 5 M y se incubaron durante 1 h en un agitador (Environ shaker, Lab-line instruments Inc. Melrose Park, IL, USA) a 37 °C y 200 rpm, para extraer las proteínas unidas no covalentemente. Luego la mezcla de extracción se centrifugó a 10000 *g* durante 10 minutos y se separó el sobrenadante, que contenía las proteínas de capa S.

El sobrenadante de la extracción se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 6000-8000, Spectrum Medical Industries, California, US) contra buffer PBS (en el caso de los estudios de AFM) y agua bidestilada (en el caso de los experimentos de FTIR), a 4 °C y con agitación, durante 48 horas. El sobrenadante se concentró mediante ultrafiltración en un equipo Amicon (Amicon Ultrafiltration Stirred Cell 8050, Millipore Corporation US) equipado con una membrana de celulosa regenerada (Ultracell PLGC04310, MWCO 10000, Millipore Corporation, US). Se utilizó una celda de ultrafiltración de 50 mL de capacidad.

#### **1.1- Determinación de la concentración de proteínas**

Las proteínas se cuantificaron utilizando el método colorimétrico de Bradford. Se realizó una curva de calibración con patrones de seroalbúmina bovina (BSA) en agua. Se graficó DO vs mg/mL de proteína *standard*, y a partir de los datos de la regresión lineal se calcularon las concentraciones de proteína de las distintas fracciones analizadas.

## **Método de Bradford**

El colorante Coomassie Blue G-250 libre (rojo), cuya absorción máxima se produce a 465 nm es capaz de unirse a proteínas formando un complejo de color azul con absorción máxima a 595 nm. Esta modificación en el máximo de absorbancia del colorante permite correlacionar la concentración de proteínas en una muestra.

*Solución colorante:* 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Alemania) disueltos en una mezcla de 100 mL de ácido fosfórico 85 % y 50 mL de etanol 95 %, y luego llevado a 1 litro con agua destilada fría. Se colocaron 20 mL de muestra en un tubo de hemólisis y luego se agregaron 50 mL de NaOH 1 M y 1 mL de solución colorante. Se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente y se midió la  $DO_{595}$  nm en cubetas de vidrio o poliestireno en un espectrómetro (Metrolab, Argentina)

## **2- Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)**

Se realizaron estudios topográficos de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 mediante Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). La labor experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biofísica y Centro de Nanociencia, Facultad de Ciencias, Universidad de Tuscia, Viterbo, Italia a cargo del Dr. Salvatore Cannistraro.

### **2.1- Preparación de las muestras para AFM**

Como soporte para la deposición de las proteínas de capa S se utilizó mica (muscovite), previamente limpiada. Para ello, se pegó una cinta adhesiva de papel sobre su superficie y luego al retirarla se eliminó con ella una capa de la misma, dejando así una capa de mica limpia lista para utilizar.

Se usaron soluciones de proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 de concentraciones 0.1 mg/L en buffer PBS. Se colocó 50  $\mu$ L de proteínas de capa S sobre el sustrato de mica y se incubó 16 hs a 4 °C para que se produzca la deposición de la proteína. Luego se lavó 10 veces con agua Milli Q

para eliminar restos de buffer PBS que podrían interferir y se procedió a la medición. La exploración se llevó a cabo con un equipo AFM Pico-SPM (Molecular Imaging Inc., Tempe, AZ, USA) con un escáner en el modo CM (modo contacto). Se usó un *cantilever* de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  con una constante de fuerza ( $k$ ) de 0.03 N/m y una fuerza aplicada de 50-150 pN, en modo sumergido (agua Milli Q). La velocidad de escaneado de las imágenes fue de 1 línea/s de datos de 512 puntos por línea. Cada imagen se captó en dos direcciones opuestas simultáneamente y de esta manera se obtuvo la imagen final.

### **3- Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

La labor experimental se desarrolló en el Laboratorio de Crio-espectroscopía y Bioespectroscopía Molecular del Departamento de Química de la Universidade de Coimbra, Portugal, a cargo del Dr. Rui Fausto Martins Ribeiro Da Silva Lourenço.

#### **3.1- Obtención de los espectros de FTIR**

Aprovechando la capacidad de las proteínas de capa S para autoagregar en ausencia del agente caotrópico, luego del dializado se centrifugó 4 min a 6600  $g$  y el pellet (correspondiente a 1 mg de proteínas de capa S) se resuspendió en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q. Luego se las hizo interaccionar con plomo, cadmio, níquel y zinc (concentración final de metal= 0.3 mM) y se incubó a 30 °C durante 24 h. Se centrifugó la mezcla a 6600  $g$  durante 4 min. y se conservó el pellet húmedo.

Para el registro de espectros se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de pellet húmedo sobre una ventana de  $\text{CaF}_2$  y se secó bajo corriente de aire a 45 °C durante 15 min hasta obtener un film transparente y eliminar la interferencia del agua.

Los espectros se registraron de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , usando 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y 128 escaneos, con el sistema purgado continuamente con nitrógeno seco para eliminar la contribución del  $\text{CO}_2$  y el vapor de  $\text{H}_2\text{O}$  en los espectros. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro BOMEM MB40 (Suiza), con un divisor de haz de ZnSe y un detector DTGS (deuterated triglyceride sulfate).

### 3.2- Análisis de los espectros de FTIR

El análisis de los espectros IR registrados se realizó mediante el programa OMNIC (Nicolet Instrument Co., Madison, WI, USA). En los casos que así lo requirieron, las contribuciones atmosféricas del CO<sub>2</sub> y el vapor de H<sub>2</sub>O fueron eliminadas por sustracción de los espectros correspondientes, hasta obtener una línea de base plana entre 2300 y 1850 cm<sup>-1</sup> (van de Weert *et al.*, 2001). Los espectros de resultantes se suavizaron mediante una función Savitzky-Golay de 7 puntos (13 cm<sup>-1</sup>). Se analizaron las componentes de la región amida I de los espectros mediante la realización de las derivadas segundas. Se utilizaron los espectros de la inversa de la derivada segunda para estimar el número, posición y contribución relativa de los elementos individuales que componen la banda de amida I. El *peak-fitting* de las curvas originales, se realizó con el programa OMNIC (versión 8.1 Thermo Fisher Scientific Inc., USA) considerando funciones Gaussianas, y usando el número de bandas y las frecuencias de los centros de bandas en los espectros de derivada segunda invertidos como guías en la posición de las bandas componentes del espectro original. La asignación de las estructuras secundarias correspondientes a las principales bandas componentes de la banda amida I se realizó de acuerdo a lo previamente descrito en literatura (Souillac *et al.*, 2002; Costantino *et al.*, 1998; Torii & Tasumi, 1996; Dong *et al.*, 1990).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Como se describió anteriormente la biosorción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  involucra moléculas superficiales bacterianas. En *L. kefir*, las proteínas de capa S representan la estructura más externa que cubre la envoltura celular, con masas moleculares relativas que van desde 61 a 77 kDa (Garrote *et al.*, 2004). En cuanto a su estructura, Mobili *et al.* 2009 han descripto la presencia de altos porcentajes de residuos glicosilados (37 %) y la ausencia de puentes disulfuro intercatenarios. Mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF se observó que las proteínas de capa S de cepas agregantes y no agregantes poseen perfiles de huella peptídica diferentes (Mobili *et al.*, 2009). Asimismo, las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 poseen un patrón diferencial en cuanto a sus propiedades superficiales (capacidad de agregación y co-agregación) y reconocimiento por los anticuerpos monoclonales, que se correlaciona con su propiedades funcionales (Golowczyk *et al.*, 2007; Mobili *et al.*, 2009). A partir de estos antecedentes, y de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo I y II se estudió las proteínas de capa S a nivel estructural y su interacción con  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ .

### Microscopía de Fuerza Atómica

Para el estudio topográfico de proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818, en primer lugar se determinó la condición más adecuada para la fijación al soporte. Para ello se ajustaron las condiciones de concentración de las proteínas de capa S, la fuerza iónica y el tiempo de incubación. Como soporte de deposición se eligió mica, ya que es hidrofílica y está negativamente cargada, lo que es sumamente importante teniendo en cuenta que las proteínas de capa S de lactobacilos tienen un PI de 9 con un elevado número de sitios cargados positivamente (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005, Hollmann, 2010).

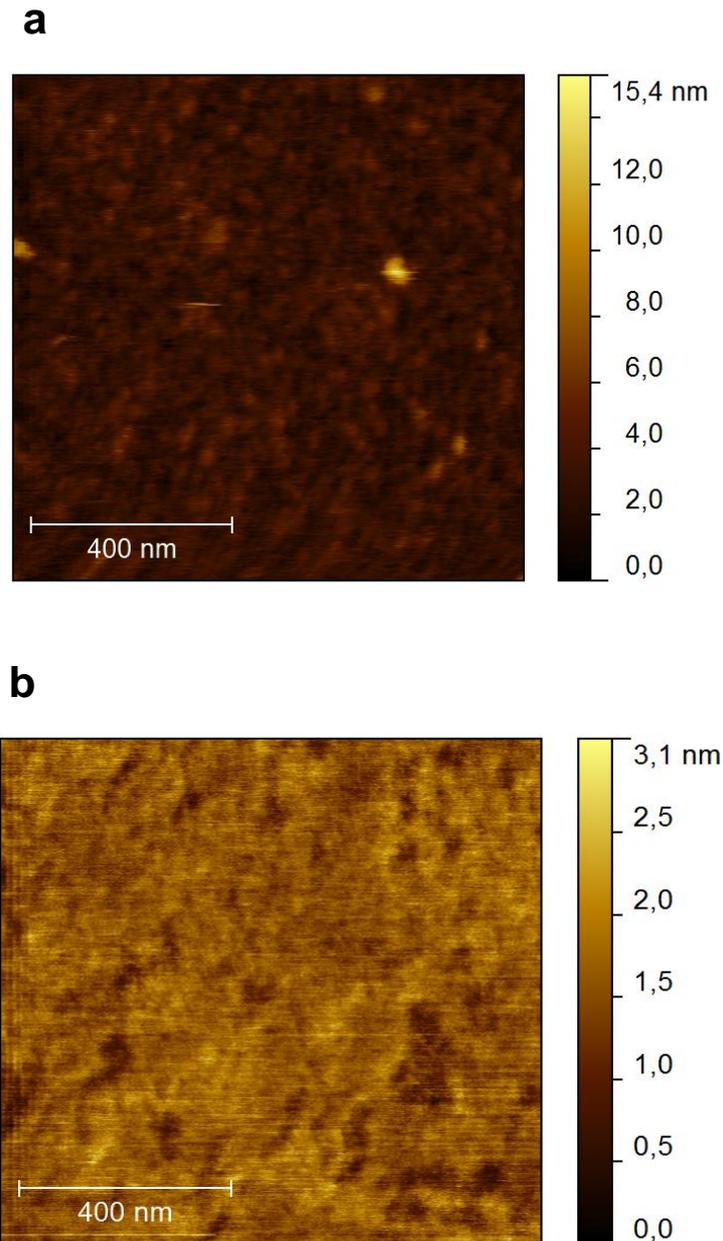
En la **Tabla 3.2** se muestran las diferentes condiciones ensayadas para ambas proteínas de capa S de *L. kefir*. Las imágenes por AFM pudieron ser registradas cuando el tiempo de incubación de proteína de capa S CIDCA 8348

en mica fue de 16 h, la concentración de proteína de capa S de 0.1 mg/mL y la fuerza iónica del buffer PBS usado durante la fijación, de 2.7 KCl, 137 NaCl, 10 NaHPO, 2 KH<sub>2</sub>PO mM.

**Tabla 3.2:** Condiciones ensayadas durante la fijación de las proteínas de capa S CIDCA 8348 y JCM 5818 sobre mica.

		<b>Capa S <i>L. kefir</i></b>	
		<b>CIDCA 8348</b>	<b>JCM 5818</b>
<b>Concentración (mg/mL)</b>	0.10	+	-
	0.05	-	-
<b>Fuerza iónica del buffer PBS (mM)</b>	2.7 KCl	+	-
	137 NaCl	+	-
	10 NaHPO	+	-
	2 KH <sub>2</sub> PO	+	-
	1.35 KCl	-	-
	68.5 NaCl	-	-
	5 NaHPO	-	-
	1 KH <sub>2</sub> PO	-	-
<b>Tiempo de incubación (h)</b>	24	-	-
	16	+	-

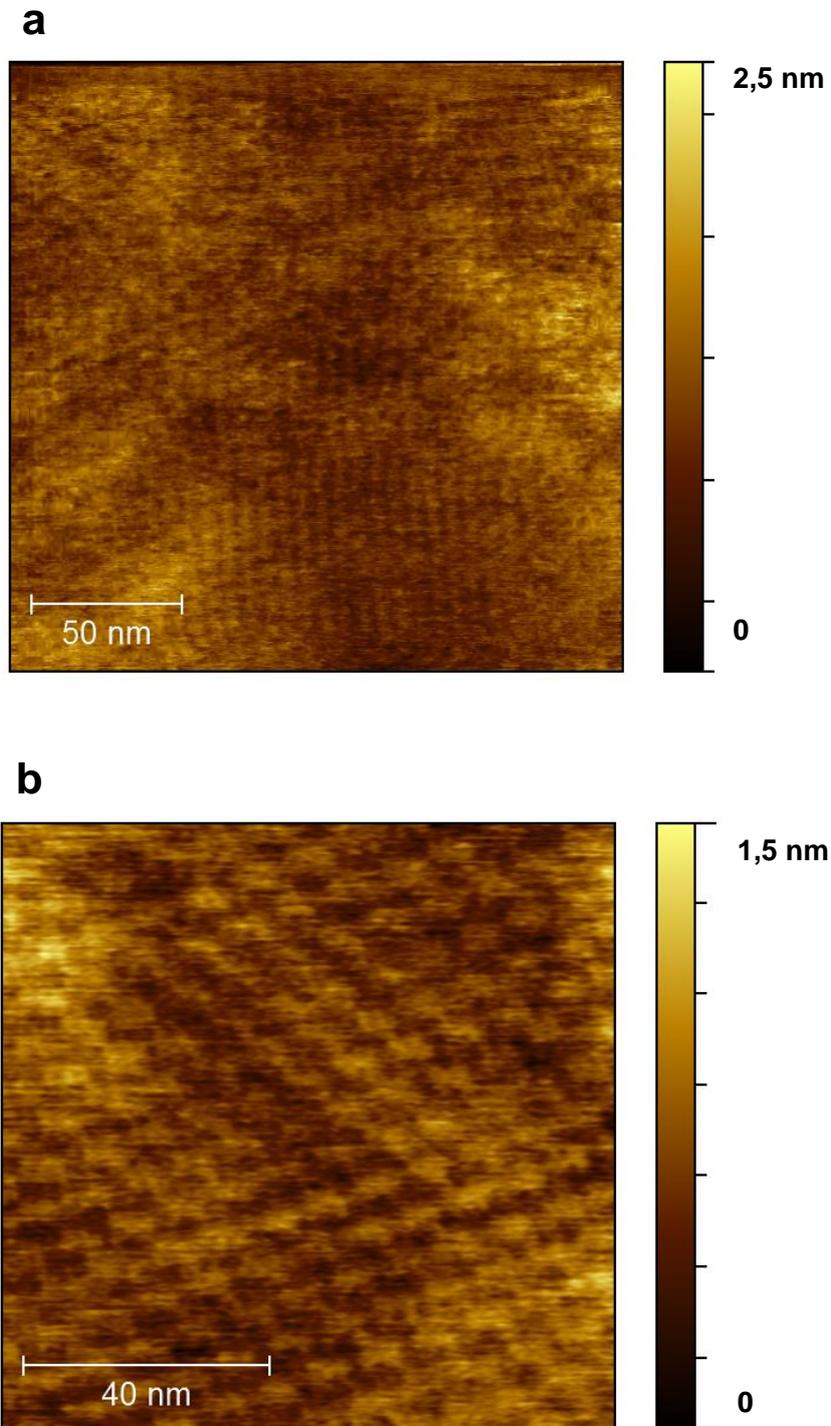
Para las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 se observó la aparición de superficies no regulares cuando las mismas se incubaron 24 horas (**Figura 3.6a**). Sin embargo, la reducción del tiempo de incubación de las proteínas de capa S en mica de 24 a 16 h permitió la observación de superficies más llanas, indicando posibles zonas de distribución de proteína más uniforme, lo cual es compatible con el arreglo bidimensional característico de las proteínas de capa S (**Figura 3.6b**).



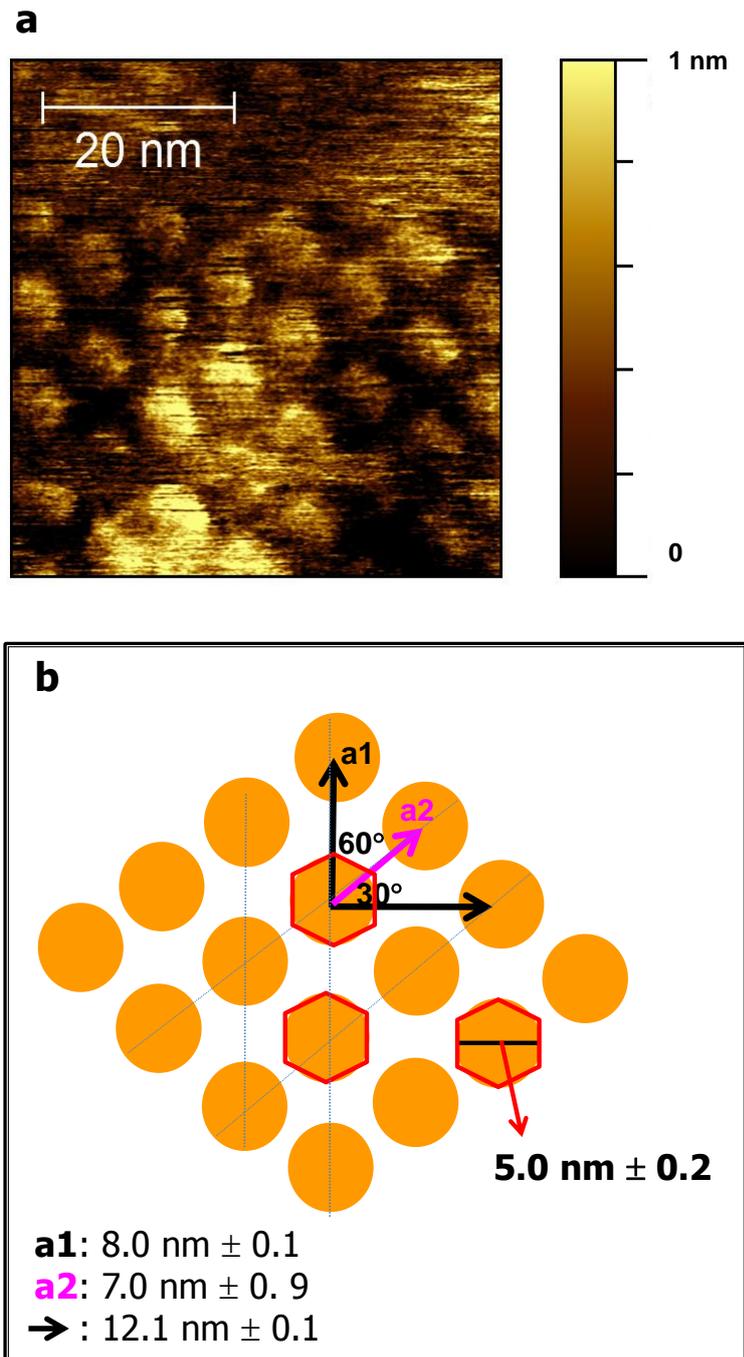
**Figura 3.6:** Imagen de AFM (modo contacto, en agua) de las proteínas de capa S *L. kefir* CIDCA 8348 incubada sobre mica en buffer PBS durante 24 h (a) y 16 h (b). Tamaño imagen:  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ .

Por esta razón, en los ensayos posteriores, las observaciones topográficas de la proteína de capa S CIDCA 8348 fueron realizadas incubando la proteína 16 horas con la mica. Esto permitió observar arreglos regulares con resoluciones de 200, 100 y 50 nm (**Figura 3.7 y 3.8a**). Esto concuerda con los resultados observados por Györvary *et al.* (2003) para las proteínas de capa S de *Bacillus*

*sphaericus* CCM 2177. Dichas proteínas se depositan sobre el soporte a los 30 min, indicando que la nucleación y formación de interacciones proteína-proteína ocurre simultáneamente.



**Figura 3.7:** Imagen de AFM (modo contacto, en agua) de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 incubadas sobre mica en buffer PBS 16 h. Tamaño de imagen: a) 200 nm x 200 nm y b) 100 nm x 100 nm.

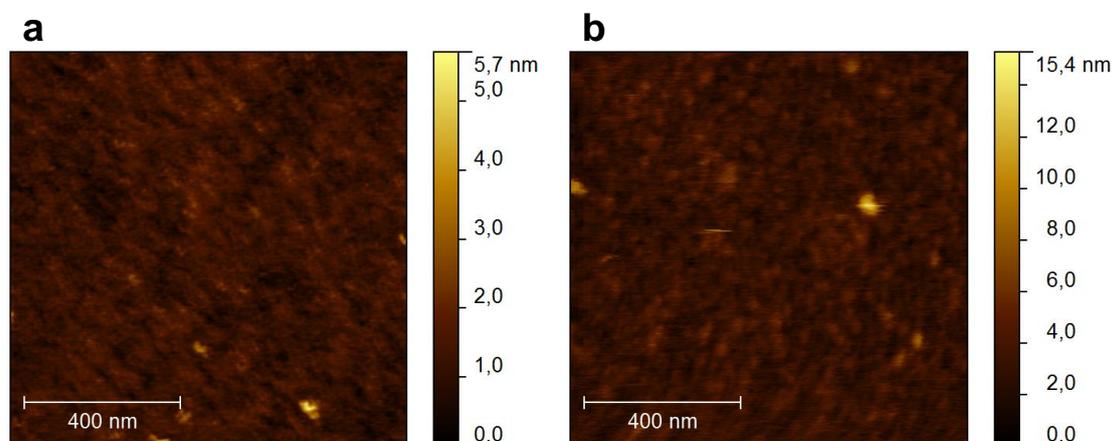


**Figura 3.8: a)** Imagen de AFM (modo contacto, en agua) de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 incubadas sobre mica en buffer PBS 16 h. Tamaño de imagen: 50 nm x 50 nm **b)** Diagrama de simetría hexagonal de las proteínas de capa S CIDCA 8348.

Las proteínas de capa S CIDCA 8348 mostraron un arreglo regular con una simetría hexagonal, con parámetros calculados de distancia a1 y a2 de

aproximadamente 7-8 nm, ángulo de 60° (Sleytr *et al.*, 2007) y un tamaño de unidad de proteína de 5 nm (**Figura 3.8 b**). Este resultado es de gran importancia ya que es la primera vez que se obtiene una imagen de proteínas de capa S de *L. kefir* de tan alta resolución, lo cual constituye un sólido soporte para estudios posteriores relacionados con estas proteínas.

Con respecto a las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818 que se sabe tienen una masa molecular de 69 KDa y punto isoeléctrico de 9 (Garrote *et al.*, 2004, Hollmann, 2010) sólo se pudieron obtener imágenes a las 16 h de incubación en mica. En dichas imágenes no se observaron zonas planas, es decir fueron imágenes similares a las obtenidas para las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 a las 24 h de deposición. En otras palabras, en el caso de las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818 no se pudo obtener imágenes que muestren un arreglo regular (**Figura 3.9a**).



**Figura 3.9:** Imágenes de AFM (modo contacto, en agua) de las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818 incubadas sobre mica en buffer PBS durante 16 h **a**) y proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 incubadas sobre mica en buffer PBS durante 24 h **b**). Tamaño de imagen: 1µm x 1µm.

De acuerdo a la imagen obtenida a las 16 h de incubación, es posible que el arreglo regular de las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818 sea similar al de las proteínas de capa S de la cepa CIDCA 8348. Sin embargo, la optimización de factores como el pH, fuerza iónica, concentración de proteínas de capa S y tiempo de incubación sobre el sustrato mica son claves para la obtención y

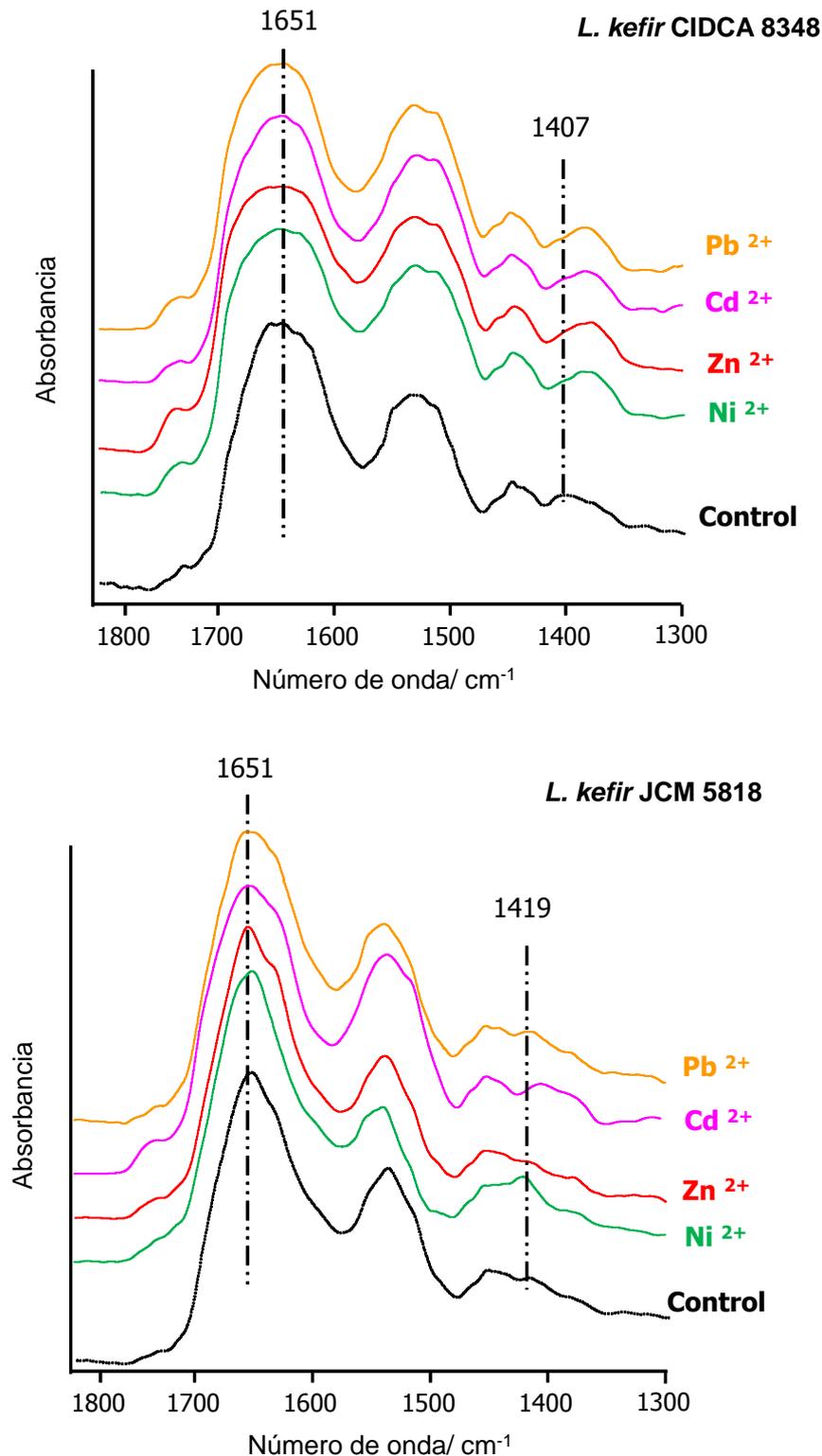
caracterización de imágenes en AFM (Tsapikouni *et al.*, 2007; Györvary *et al.*, 2003; Scheuring *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 1996).

### **Análisis espectral FTIR de proteínas de capa S *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 con $Pb^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Zn^{2+}$ y $Ni^{2+}$**

Todos los espectros FTIR obtenidos para las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 antes y después del tratamiento con los diferentes metales se ajustan a un perfil típico de proteínas en el infrarrojo (**Figura 3.10**). Las bandas de amida I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) y amida II ( $1580-1480\text{ cm}^{-1}$ ), que corresponden a los modos vibracionales relacionados con el enlace peptídico, aparecen como las características más destacadas (**Figura 3.10**).

Se sabe que el *stretching* asimétrico de los grupos carboxilatos de los residuos laterales de aspartato y de glutamato ( $\nu\text{COO}^-$ s.) da lugar a una banda de elevado número de onda en el ala de la banda de amida II (región  $1580-1560\text{ cm}^{-1}$ ) (Fahmy, *et al.* 2006; Nara, *et al.* 2008). Por otro lado, el *stretching* simétrico de los mismos grupos ( $\nu\text{COO}^-$ s.), da lugar a una banda característica observada en  $1430-1360\text{ cm}^{-1}$ . Por último, la banda que aparece en el rango de  $1480-1430\text{ cm}^{-1}$  es debida principalmente a los *bendings* CH de la cadena peptídica ( $\delta\text{CH}$ ). Este modo vibracional resultó poco afectado tanto por los efectos directos de unión del metal como por los efectos indirectos resultantes de las alteraciones en la estructura secundaria derivados de la interacción proteína/metal. Por esta razón, esta última banda puede ser considerada como una buena referencia interna en términos cuantitativos. Como se explicará en la siguiente sección, esta banda fue utilizada para la normalización de las intensidades espectrales.

La lista completa de los números de onda máximos de absorción (en el rango de  $1800-1300\text{ cm}^{-1}$ ), para los diferentes sistemas estudiados y sus correspondientes atribuciones se muestran en la **Tabla 3.3**.



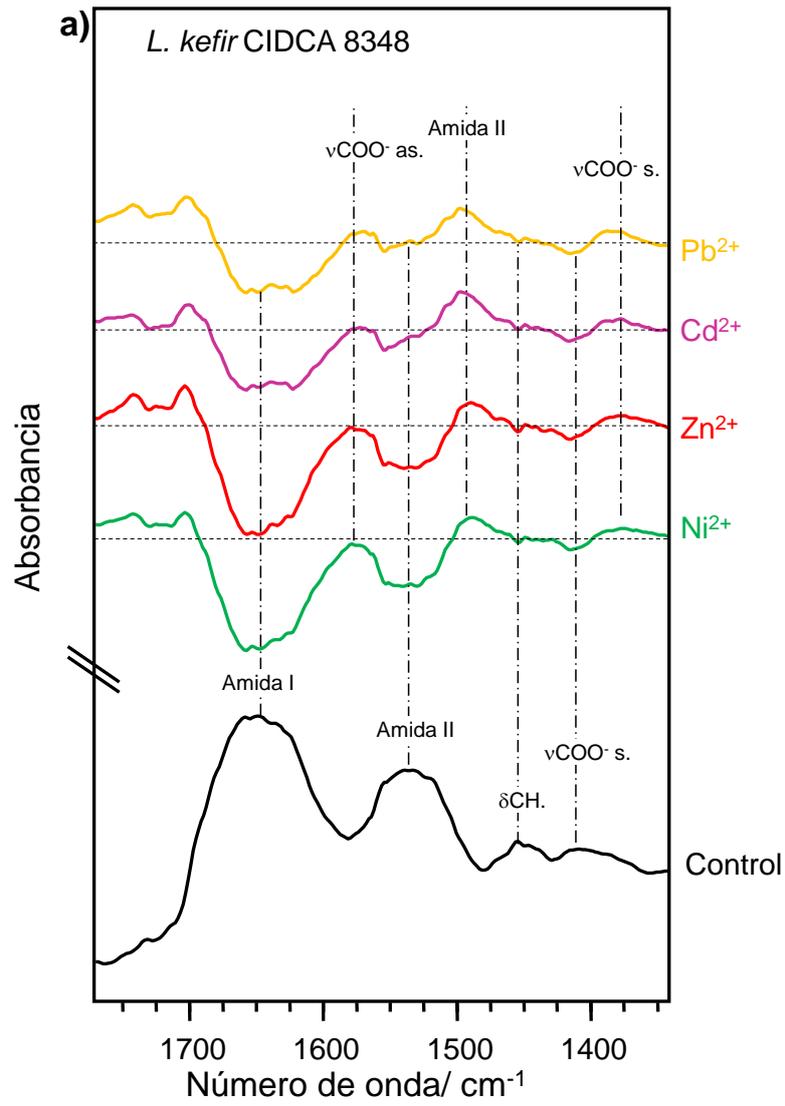
**Figura 3.10:** Espectros FTIR de proteínas de capa S de las cepas de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 incubadas con: Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>. Control: proteínas de capa S no tratadas con metal. Las líneas de puntos verticales indican los números de onda de las bandas atribuidas a amida I y νCOO<sup>-</sup>s. en el espectro control.

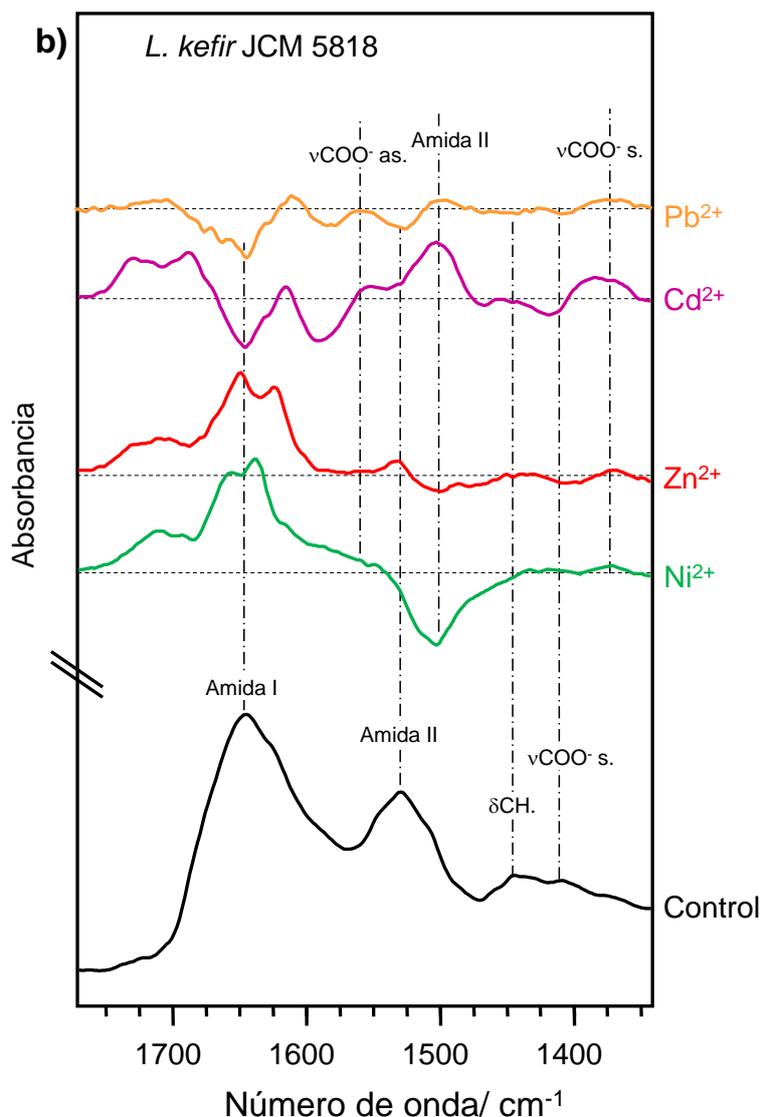
**Tabla 3.3.** Números de onda experimentales de las bandas observadas en el rango de 1800-1300  $\text{cm}^{-1}$  para los diferentes sistemas analizados

Capa S		Amida I/ $\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{COO}^-$ s./ $\text{cm}^{-1}$	Amida II/ $\text{cm}^{-1}$	$\delta\text{CH}/\text{cm}^{-1}$	$\nu\text{COO}^-$ s./ $\text{cm}^{-1}$
CIDCA 8348	Control	1651	-	1539	1454	1407
	$\text{Ni}^{2+}$	1651	1577	1537/1493	1454	1387
	$\text{Zn}^{2+}$	1649	1575	1573/1494	1454	1386
	$\text{Cd}^{2+}$	1648	1562	1573/1496	1454	1389
	$\text{Pb}^{2+}$	1647	1562	1573/1496	1454	1389
JCM 5818	Control	1651	-	1540	1454	1419
	$\text{Ni}^{2+}$	1651	-	1541/1496	1454	1380
	$\text{Zn}^{2+}$	1653	-	1541/1496	1454	1380
	$\text{Cd}^{2+}$	1654	1564	1538/1496	1454	1386
	$\text{Pb}^{2+}$	1654	1576	1542/1496	1454	1382

### Coordinación de iones metálicos a proteínas de capas S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818

En las **Figuras 3.11 a y b** pueden observarse las alteraciones espectrales resultantes de la interacción de las proteínas de capa S con los metales. En dichas figuras, se muestran los espectros diferencia resultantes de la sustracción del espectro de las proteínas de capa S (controles) a los espectros correspondientes a las proteínas de capa S luego de la interacción con los metales (espectro de la proteína/metal – espectro de la proteína control). Las sustracciones espectrales se llevaron a cabo después de la normalización de los espectros por la intensidad de banda de deformación (*bending*)  $\delta\text{CH}$  estándar, observada a 1480-1430  $\text{cm}^{-1}$ .





**Figura 3.11:** Espectros de diferencia FTIR de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 (a) y JCM 5818 (b) unidos a Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>. Control: espectro FTIR de las proteínas de capa S no tratadas. Para la obtención de los espectros de diferencia, el espectro original se normalizó utilizando el modo vibracional δCH como estándar interno. Las líneas discontinuas horizontales definen el cero de la escala ordinaria del espectro de diferencia. Las líneas de puntos verticales indican los números de onda de bandas en el espectro control o bien, facilitan la visualización del número de onda promedio atribuido a un determinado modo vibracional del espectro proteína/metal (por ejemplo, líneas de puntos a 1380 y 1575 cm<sup>-1</sup> para las bandas debidas a vCOO<sup>-</sup>s. y vCOO<sup>-</sup> as., respectivamente. Nótese que la banda atribuida a este último modo está enmascarada por las bandas de amida I y II en el espectro control).

En el caso de las proteínas de capa S de la cepa agregante *L. kefir* CIDCA 8348 (**Figura 3.11 a**), el patrón de los espectros de diferencia es idéntico para todos los metales. En lo que respecta a las alteraciones inducidas por la interacción con el metal existen dos que merecen destacarse:

(a) la frecuencia correspondiente al modo vibracional  $\nu\text{COO}^-$  s. disminuye desde alrededor de  $1407\text{ cm}^{-1}$  a  $1380\text{ cm}^{-1}$  y

(b) el máximo de la banda de amida II se desplaza desde  $1535\text{ cm}^{-1}$  a  $1495\text{ cm}^{-1}$ .

Estos corrimientos ocurren simultáneamente con una disminución en las intensidades de la bandas  $\nu\text{COO}^-$  s. y amida II en relación a los controles (**Figura 3.11 a**). Es importante destacar que en los espectros de diferencia, la banda correspondiente a  $\nu\text{COO}^-$  as. de carboxilatos de cadena lateral de aspartato y glutamato puede observarse claramente, con un máximo alrededor de  $1575\text{ cm}^{-1}$ . Las alteraciones observadas en la banda de amida I, principalmente disminución de la intensidad y modificaciones en la forma de la banda indican que la interacción metal/proteína afecta a la estructura secundaria de las proteínas de capa S.

La primera afirmación que puede extraerse de los datos descritos es que la interacción de las proteínas de capa S/metal se produce principalmente a través de la coordinación de los metales con los carboxilatos de las cadenas laterales de los residuos de aspartato y glutamato. Se han realizado numerosos estudios de FTIR que correlacionan los números de onda del *stretching*  $\text{COO}^-$  ( $\nu\text{COO}^-$ ) con el tipo de coordinación del metal (Nara, *et al.* 2008; Ramos Moita, *et al.* 1994). En este sentido, Deacon & Phillips (1980) encontraron una correlación general entre los números de onda de separación entre los modos vibracionales  $\nu\text{COO}^-$  antisimétrico y simétrico ( $\Delta\nu_{\text{as-s}}$ ) y el tipo de coordinación entre el grupo carboxilato y los iones metálicos. Así, la frecuencia del  $\nu\text{COO}^-$  as. en especies unidentadas es mayor que en especies iónicas (libres de metal), la cual a su vez es mayor que en especies bidentadas. En el caso del modo vibracional  $\nu\text{COO}^-$  s, ocurre lo contrario. De esta manera, los valores de  $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  para las

coordinaciones unidentadas, puentes, bidentadas y las especies iónicas siguen el orden:  $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  (unidentada) >  $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  (iónico)  $\sim$   $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  (puente) >  $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  (bidentada), donde  $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  (iónico) es de aproximadamente 160-170  $\text{cm}^{-1}$  (Nara, *et al.* 2008; Ramos Moita *et al.*, 1994). En el caso de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y los metales,  $\Delta\nu_{\text{as-s}}$  es de aproximadamente 190  $\text{cm}^{-1}$ , lo que sugiere que la coordinación es predominantemente unidentada. Las proteínas de capa S de *L. kefir* muestran un comportamiento diferente al observado en *B. sphaericus* JG-A12, donde se encontró que la coordinación con el  $\text{Pd}^{2+}$  es predominantemente bidentada (Fahmy, *et al.* 2006). Tales resultados parecen indicar que las interacciones de proteínas de capa S/metal dependen en gran medida de la estructura de las proteínas de capa S no tratadas (controles), lo cual indica la importancia de extender este tipo de estudios a proteínas de capa S de diferente estructura o género bacteriano.

Las alteraciones observadas en la región amida II de las proteínas de capa S *L. kefir* CIDCA 8348 tras la unión de metales no siguen el patrón previamente encontrado para *B. sphaericus* JG-A12. En el caso de *B. sphaericus* JG-A12, no se observaron cambios en esa región, y la evidencia de esto es la no participación de los átomos de nitrógeno del esqueleto peptídico en la coordinación a los iones metálicos. En cambio, los átomos de nitrógeno de la cadena lateral que proceden principalmente de residuos de lisina y asparragina de las proteínas de capa S de *B. sphaericus* JG-A12 demostraron estar involucrados en una coordinación adicional con iones metálicos (Fahmy, *et al.*, 2006). En el caso de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348, sin embargo, las alteraciones en la banda amida II resultantes de la interacción con el metal son importantes (**Figura 3.11 a**), con un corrimiento máximo (hacia menores números de onda) de aproximadamente 40  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual indicaría que los átomos de nitrógeno del enlace peptídico están jugando un papel activo en la coordinación al metal.

Para las proteínas de capa S de la cepa no agregante *L. kefir* JCM 5818 (**Figura 3.11 b**), el patrón de los espectros diferencia resultantes de restar el espectro de los controles a los de proteína de capa S luego de la interacción con el metal es diferente para los cuatro metales estudiados. Las alteraciones

espectrales inducidas por los metales más grandes,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ , siguen la misma tendencia que para *L. kefir* CIDCA 8348, y pueden interpretarse de la misma manera. Sin embargo, las alteraciones espectrales inducidas por las especies más pequeñas,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , siguen un patrón diferente. En estos casos:

(a) se produce un corrimiento de la banda  $\nu\text{COO}^-$  s. desde alrededor de  $1419\text{ cm}^{-1}$  a  $1380\text{ cm}^{-1}$ , lo que sugiere un predominio de la coordinación unidentada en estos sistemas. Sin embargo, como el modo vibracional  $\nu\text{COO}^-$  as. no pudo ser identificado inequívocamente, no puede afirmarse que el tipo de coordinación prevalente en estos casos sea unidentado,

(b) la banda de amida II exhibe un aumento de la intensidad en su componente de mayores números de onda y una disminución en la región de menor número de onda. Este comportamiento sigue una tendencia opuesta a la observada en los demás casos estudiados en este capítulo, y podría indicar que estos dos iones metálicos (más pequeños) son capaces de penetrar más ampliamente en el interior de las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818 y perturbar su entorno local haciendo que sea más hidrofóbico (por ejemplo, reemplazando moléculas de agua residuales o formando nuevas uniones específicas en las que participen los grupos NH del enlace peptídico) (Halttunen, *et al.* 2007), y

(c) las alteraciones en la intensidad de las bandas de amida I también siguen un patrón contrario al observado para los otros sistemas proteína/metal investigados.

Entre los dos tipos de proteínas de capa S, se sabe que las de la cepa agregante *L. kefir* CIDCA 8348 tiene una menor capacidad de captar a los metales que la de la cepa no agregante JCM 5818 (Alves, 2010). El número de sitios de unión a metales disponibles en esta última, es mayor y de acuerdo con los obtenidos en este trabajo de tesis, el acceso de los iones metálicos pequeños ( $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) al interior de las proteínas parece ser más fácil, lo que conduce al diferente comportamiento encontrado para estos iones metálicos en relación a los observados para otras interacciones capa S/metal.

### Efecto de la unión de metal sobre la estructura secundaria de proteínas de capa S de *L. kefir* CIDC 8348 y JCM 5818.

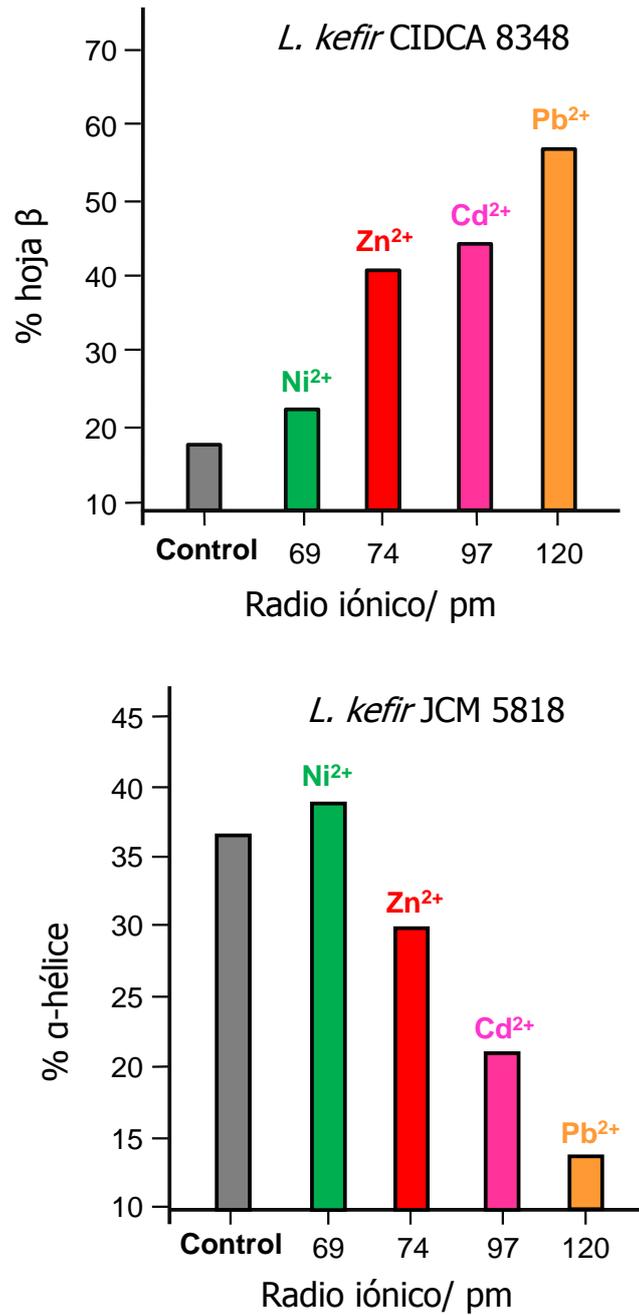
Como ya se mencionó en la sección anterior, la unión de iones metálicos a proteínas de capa S también produce alteraciones en la estructura secundaria. Estos cambios son particularmente evidentes en la región espectral amida I. El conjunto de resultados obtenidos para la composición de la estructura secundaria en ambas proteínas de capas S se muestran en la **Tabla 3.4**.

**Tabla 3.4.** Composición de la estructura secundaria (%) de las proteínas de capa S *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818.

Capa S		Estructura secundaria (%)		
		$\alpha$ -Hélice	Hoja $\beta$	Otras <sup>a</sup>
CIDCA 8348	Control	28.0	19.1	52.9
	Ni <sup>2+</sup>	10.8	23.8	65.4
	Zn <sup>2+</sup>	34.0	42.1	23.9
	Cd <sup>2+</sup>	23.9	45.8	30.3
	Pb <sup>2+</sup>	14.3	57.9	27.8
JCM 5818	Control	36.0	15.3	48.7
	Ni <sup>2+</sup>	38.7	25.3	36.0
	Zn <sup>2+</sup>	29.9	30.2	39.9
	Cd <sup>2+</sup>	21.0	27.9	51.1
	Pb <sup>2+</sup>	13.7	21.9	64.4

<sup>a</sup> Incluye estructuras no ordenadas y giros  $\beta$ , así como las vibraciones de la cadena lateral.

La interacción con iones metálicos produce alteraciones evidentes en estructuras secundarias de ambas proteínas de capas S. En particular, se observa una tendencia general a aumentar la proporción de estructuras hoja- $\beta$  y reducir las  $\alpha$ -hélice. Además, la disminución observada en el contenido de  $\alpha$ -hélice para JCM 5818 y el aumento de estructuras hoja- $\beta$  en CIDCA 8348 es proporcional al radio de los iones metálicos (**Figura 3.12**). Esto indica que los iones metálicos más grandes inducen alteraciones estructurales tendientes a aumentar el contenido de hoja- $\beta$  a expensas de las  $\alpha$ -hélice. La disminución del contenido de las estructuras de  $\alpha$ -hélice, y aumento de hojas- $\beta$  se ha observado frecuentemente en diferentes tipos de proteínas como resultado de variaciones de pH (Koga, *et al.*, 2003), temperatura (Ding, *et al.*, 2003), composición del solvente (Meier, *et al.*, 2008), y de la deformación mecánica (Church, *et al.*, 1998; Kreplak, *et al.*, 2004). Estos cambios estructurales contribuyen a un aumento significativo de la rigidez, la fuerza, y la capacidad de disipación de energía a la deformación de la proteínas (Qin and Buehler, 2010). Entonces, es probable que la disminución del contenido en las estructuras de  $\alpha$ -hélice, y aumento de las hoja- $\beta$  observado para las proteínas de capa S *L. kefir* JCM 5818 y CIDCA 8348 luego de la interacción con metales sea la forma que las proteínas encuentran para adaptar su estructura a la presencia de metales con un mínimo gasto de energía. Esta interpretación también explica por qué los efectos de la interacción del metal sobre la estructura secundaria de las proteínas tienden a ser más pronunciados para los iones grandes.



**Figura 3.12:** Efecto de los radios iónicos de metales divalentes en la estructura secundaria de proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818. Control: proteínas de capa S no tratadas.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. La proteína de capa S CIDCA 8348 presenta una simetría hexagonal con tamaños de unidad proteica de 5 nm.
2. La interacción proteína/metal induce cambios importantes en la estructura de las proteínas de capa S, claramente evidenciadas a través espectroscopia FTIR.
3. En ambas proteínas de capa S estudiadas, la interacción proteína/metal se produce principalmente mediante la coordinación con grupos carboxilato de cadena lateral de los residuos aspartato y glutamato. Esta coordinación es predominantemente unidentada y existen coordinaciones adicionales que involucran grupos NH de la cadena péptidica.
4. En el caso de las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818, la interacción con  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  parece no seguir el mismo patrón como el de la interacción con  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  (y el encontrado para la interacción de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 con todos los metales estudiados). De hecho, aun cuando la interacción con iones  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  es, muy probablemente, unidentada, el aumento en la intensidad de la banda amida I luego de la interacción de las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818 con estos metales indica que su menor tamaño les permite penetrar en mayor grado dentro de las proteínas y perturbar su entorno local, haciéndolo más hidrofóbico.
5. La interacción con los metales también induce alteraciones en la estructura secundaria de las proteínas de capa S. Pudo observarse que estos cambios obedecen a una tendencia general de aumentar la cantidad de estructuras hojas- $\beta$  a expensas de las  $\alpha$ -hélice, lo que permite a las proteínas adaptar su estructura a la presencia de iones metálicos con un mínimo gasto de energía. En consecuencia, los iones más grandes producen cambios más significativos en la estructura secundaria de las proteínas estudiadas.



# Discusión General

## DISCUSIÓN GENERAL

Las bacterias lácticas tienen estatus GRAS, es decir son generalmente reconocidas como seguras, por lo cual pueden ser utilizadas en la producción y preservación de alimentos, y también, en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la salud (medicina, industria farmacéutica, nutracéuticos).

La tolerancia de microorganismos de diferentes géneros y especies a metales pesados ha sido ampliamente investigada, como así también la adsorción de estos metales a la superficie bacteriana en condiciones de no crecimiento (biosorción). Sin embargo, tanto la tolerancia como la biosorción han sido poco exploradas en el campo de las bacterias lácticas. Es por esto que el tema abordado en este trabajo de tesis adquiere relevancia, especialmente si se piensa en potenciales aplicaciones en procesos de detoxificación de metales pesados en alimentos o en el agua de bebida.

*L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818 fueron tolerantes a diferentes concentraciones de plomo, cadmio, zinc y níquel (Figura 1.7). La tolerancia a metales pesados requiere la activación de diversos mecanismos y vías de resistencia que están bien definidas en bacterias ambientales e incluyen: alteración de los componentes de la pared celular, bombas de eflujo y secuestro intracelular o unión de metales sobre partículas de la pared celular (Cervantes *et al.*, 2006). La activación de dichos mecanismos sería probablemente compatible con las evidentes alteraciones morfológicas observadas para *L. kefir* en este trabajo de tesis.

La toxicidad de los metales, determinada a partir de la EC50, fue similar en ambas cepas estudiadas para todos los metales menos para el níquel. El níquel resultó ser alrededor de un 40 % más tóxico para la cepa JCM 5818 que para la cepa CIDCA 8348 ( $EC_{50_{CIDCA\ 8348}}=7.09\text{ mM}$  vs  $EC_{50_{JCM\ 5818}}=4.02\text{ mM}$ ; Tabla 1.3). Esto indicaría que los requerimientos de níquel de la cepa CIDCA 8348 probablemente sean mayores que los de la cepa JCM 5818.

Por otra parte, es importante destacar que los valores de EC50 obtenidos en este trabajo (Tabla 1.3) superan ampliamente los niveles admitidos de plomo

(10 u/L), cadmio (3 ug/L), zinc (3 mg/L) y níquel (0.02 mg/L) para aguas de consumo humano (OMS, 2006). Esta tolerancia a los metales pesados, aun en concentraciones perjudiciales para el ser humano, representa una ventaja si se piensa en aplicaciones relacionadas con la salud.

Los ensayos de biosorción confirmaron que ambas cepas de *L. kefir* son capaces de unir entre 20-40 % de plomo, cadmio, zinc y níquel en 1 h de incubación a 30 °C y pH 5.5. Además, los valores de capacidad máxima de unión ( $q_{max}$ ) de ambas cepas para los cuatro iones metales, son similares a los publicados para otras bacterias lácticas y pueden considerarse como moderados si se los compara con los  $q_{max}$  de ciertos géneros y especies de hongos, algas y bacterias (Vijayaraghavan *et al.*, 2006). La obtención de  $q_{max}$  moderados podría inducir a la conclusión de que de que estas biomasas de *L. kefir* no son las más adecuadas para ser utilizadas a niveles de contaminación industrial. Sin embargo, su uso potencial en aplicaciones relacionadas con la salud humana, donde el grado de contaminación al que están expuestas es considerablemente más bajo, y donde otros microorganismos con mayores  $q_{max}$  no pueden ser utilizados por no tener estatus GRAS, resalta la importancia de los resultados obtenidos.

Por otra parte, se correlacionó los valores de afinidad de ambas cepas de *L. kefir* ( $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$ ) con el radio iónico, observándose que cuanto mayor es el radio iónico, mayor es la afinidad. Esto adquiere importancia si se piensa en potenciales aplicaciones tales como la detoxificación a nivel humano. Así, las cepas con un alto valor de  $b$ , serían más eficientes para remover bajas concentraciones de iones en el tracto gastrointestinal. El plomo y cadmio (los de mayor radio iónico) son altamente tóxicos para la salud humana. La mayor afinidad de las cepas de *L. kefir* para estos metales permitiría una remoción más eficiente en el tracto gastrointestinal, aun en concentraciones bajas.

La interacción bacteria/metal fue posteriormente investigada a nivel molecular. Así, se determinó que luego de la interacción de ambas cepas de *L. kefir* con metales, las bandas correspondientes a los grupos carboxilato, polisacáridos y fosfatos de la pared celular se ven alteradas. De acuerdo a la

información publicada por varios autores (Halttunen *et al.*, 2008a; Mrvčić *et al.*, 2009a), estos grupos funcionales son los responsables de la unión de metales como plomo, cadmio y zinc a la superficie de bacterias lácticas. Sin embargo, estos autores confirmaron la participación de estos grupos funcionales en la interacción con metales, bloqueándolos mediante reacciones químicas (Halttunen *et al.*, 2008a; Mrvčić *et al.*, 2009a). En este sentido, los métodos espectroscópicos utilizados en este trabajo de tesis permitieron una determinación directa de los grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria/metal, sin necesidad de utilizar agentes externos, lo cual puede ser considerado como una ventaja.

El desarrollo del modelo de cuantificación basado en métodos de análisis multivalente merece una mención especial. De acuerdo a nuestro conocimiento, es la primera vez que se usa espectroscopia Raman y análisis multivariante para cuantificar la adsorción de metales pesados a la superficie de microorganismos. Esto permitió obtener un modelo robusto para predecir la concentración removida de metal de muestras desconocidas, como por ejemplo aguas de consumo contaminadas.

En un paso siguiente, se decidió estudiar la estructura más superficial de las cepas de *L. kefir*, las proteínas de capa S aisladas. Este estudio permitió determinar de manera directa y sin la interferencia de otras estructuras superficiales, la participación de estas proteínas en la interacción con metales pesados. En este sentido, el análisis exhaustivo de su estructura y de las alteraciones resultantes de su interacción con cationes metálicos, representa una base sólida para comprender mejor el rol de estas proteínas en las diversas funciones potenciales que le han sido atribuidas en la bibliografía [tamices moleculares (Sára & Sleytr, 1987), determinantes de la forma celular (Pum *et al.*, 1991), estructuras de protección frente a factores ambientales o a la predación por protozoos (Koval & Hynes, 1991) y matriz para la deposición de minerales (Schultze-Lam *et al.*, 1992)].

Finalmente, mediante microscopia de fuerza atómica se pudo obtener por primera vez una imagen de proteínas de capa S de *L. kefir* y mediante FTIR determinar que estructuras componentes de la estructura secundaria de la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y JCM 5818 están involucradas en la interacción con los metales. Los cambios observados en la estructura secundaria en función del radio iónico del catión tienen la misma tendencia observada para la afinidad (b) en bacterias enteras (Figuras 1.11 y 3.12), lo que fortalece la hipótesis del rol de las proteínas de capa S en la remoción de metales pesados.

En resumen, este trabajo de tesis realizó aportes significativos en cuanto a la interacción de metales pesados con cepas de *L. kefir*. Los resultados obtenidos representan un avance importante en la comprensión de las interacciones bacterianas con iones metálicos. Teniendo en cuenta el estatus GRAS de las bacterias lácticas y las aplicaciones nanotecnológicas de las proteínas de capa S, estos resultados constituyen un sólido soporte teórico para futuras aplicaciones en el ámbito de la seguridad alimentaria y la bionanotecnología.

# Bibliografía

## BIBLIOGRAFÍA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2005a)**  
Toxicological profile for Zinc. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov> – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Zinc.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2005b)**  
Toxicological profile for Nickel. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.epa.gov> – US Environmental Protection Agency. Toxicological Profile for Nickel.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2007)**  
Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov>- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2008)**  
Toxicological profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov> – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium.
- Akar, T. and Tunali, S. (2005)** Biosorption performance of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd(II) and Cu(II) ions from aqueous solutions. *Minerals Engineering*. 18: 1099-1109.
- Akar, T. and Tunali, S. (2006)** Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. *Bioresources Technology*. 97: 1780-1787.
- Aksu, Z. and Çağatay, S.S. (2006)** Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems. *Separation and Purification Technology*. 48: 24-35.

- Alexandrakis, D., Downey, G. and Scannell, A.M.** (2008) Detection and identification of bacteria in an isolated system with near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 3431-3437.
- Al-Khaldi, S.F. and Mossoba, M.M.** (2004) Gene and bacterial identification using high throughput technologies: genomics, proteomics, and phenomics. *The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences*. Nutrition. 20: 32-38.
- Alves, A.** (2010) Tesina de licenciatura Universidad de Coimbra, Portugal.
- Andrade, S., Pucci, A. and Marcovecchio, J.** (2000) Cadmium concentrations in the Bahía Blanca Estuary (Argentina). Potential effects of dissolved cadmium on the diatom *Thalassiosira curviseriata*. *Oceanología*. 42: 505-520.
- Araujo-Andrade, C., Campos-Cantón, I., Martínez, J.R., Ortega, G. and Ruiz, F.** (2005) Prediction model based on multivariate analysis to determine concentration of sugar in solution. *Revista Mexicana de Física*. 51: 67-73.
- Adarsh, V.K., M. Mishra, S. Chowdhury, M. Sudarshan and A.R. Thakur et al.** (2007). Studies on Metal Microbe Interaction of Three Bacterial Isolates from East Calcutta Wetland. *OnLine J. Biol. Sci.*, 7: 80-88
- Aremu, D.A., Olawuyi, J.F., Meshitsuka, S., Sridhar, M.K. and Oluwande, P.A.** (2002) Heavy metal analysis of groundwater from Warri, Nigeria. *International Journal of Environmental Research*. 12: 261-267.
- Arica, M.Y., Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Bektas, S. and Genc, O.** (2004) Biosorption of  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$  by Ca-alginate and immobilized woodrotting fungus *Funalia troglia*. *Journal of Hazardous Matererials*. 109: 191-199.
- Avall-Jääskeläinen, S. and Palva, A.** (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 511-529.

- Axelsson, L.** (2004) Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria, microbiological and functional aspects. 3<sup>rd</sup> edition. Editors: Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. pp. 1-67, New York, Marcel Decker Inc.,USA.
- Baena, J.R. and Lendl, B.** (2004) Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 8: 534-539.
- Balls, P.W.** (1988) The control of trace metal concentrations in coastal seawater through partition onto particulate suspended matter. *Netherlands Journal of Sea Research*. 22: 213-218.
- Barton, H.** (2005) Predicted intake of trace elements and minerals via household drinking water by 6-year-old children from Krakow, Poland. Part 2: Cadmium, 1997-2001. *Food Additives and Contamination*. 22: 816-828.
- Basaga H.S.** (1990) Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology*. 68: 989-998.
- Batista, R. and Oliveira, M.M.** (2009) Facts and fiction of genetically engineered food. *Trends in Biotechnology*. 27: 277-286.
- Beveridge, T.J.** (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*. 181: 4725-4733.
- Beveridge, T. J. and Murray, R. G. E.** (1980) Site of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 141, 876-887.
- Blackwell, K.J., Singleton, I. and Tobin, J.M.** (1995) Metal cation uptake by yeast: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 579-584.
- Blanusa, M., Varnai, V.M., Piasek, M. and Kostial, K.** (2005) Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 2771-2794.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstram, A., Kozarich, J.W. and Mannervik, B.** (1994) Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proceedings of the*

National Academy of Science of the United States of America. 91: 1480-1484.

**Bhakta, J.N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K. and Wei, M.Q.**

(2012) Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology*. 112: 1193-1206.

**Boever, P.D., Deplancke, B. and Verstraete, W.** (2000) Fermentation by

gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition*. 130: 2599-2606.

**Boonaert, C.J.P. and Rouxhet, P.G.** (2000) Surface of lactic acid bacteria:

Relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2548-2554.

**Boot, H.J., Kolen, C.P.A.M., Van Noort, J.M., Pouwels, P.H.** (1993) S-layer

protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology*. 175: 6089-6096.

**Borowitzka, M.A.** (1988) Algal media and sources of algal cultures. In: Micro-

algal biotechnology. Editors: Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J. pp. 456-465. Cambridge University Press, UK.

**Borrok, D.M. and Fein, J.B.** (2005) The impact of ionic strength on the

adsorption of protons, Pb, Cd, and Sr onto the surfaces of Gram negative bacteria: testing nonelectrostatic, diffuse, and triple-layer models. *Journal of Colloid Interface Science*. 286: 110-126.

**Bosch, A., Golowczyc, M., Abraham, A.G., Garrote, G.L., De Antoni, G.L.**

**and Yantorno, O.** (2006) Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 280-287.

**Bowman, S.M. and Free, S.J.** (2006) The structure and synthesis of the

fungal cell wall. *BioEssays*. 28: 799-808.

- Brökl, G., Behr, M., Fabry, S., Hensel, R., Kaudewitz, Biendl, E. and König, H.** (1991) Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermus fervidus* and *Methanothermus sociabilis*. European Journal of Biochemistry. 199: 147-152.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W.** (2000) Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 45: 198-207.
- Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J.F., Rodríguez-Zavala, J.S. and Moreno-Sánchez, R.** (2006) Interacciones microbianas con metales pesados. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48: 203-210.
- Chojnacka, K., Chojnacki, A. and Górecka, H.** (2005) Biosorption of  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. Chemosphere 59: 75-84.
- Chrastný, V., Komárek, M., Tlustos, P. and Svehla, J.** (2006) Effects of flooding on lead and cadmium speciation in sediments from a drinking water reservoir. Environmental Monitoring and Assessment. 118: 113-123.
- Church, J.S., Corino, G.L. and Woodhead, A.L.** (1998) The effects of stretching on wool fibres as monitored by FT-Raman spectroscopy. Journal of Molecular Structure. 440: 15-23.
- Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A. and Palmer, L.M.** (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. Nature Biotechnology. 3: 817-820.
- Coolon, J.D., Jones, K.L., Narayanan, S. and Wisely, S.M.** (2010) Microbial ecological response of the intestinal flora of *Peromyscus*

*maniculatus* and *P. leucopus* to heavy metal contamination. *Molecular Ecology*. 19: 67-80.

**Costantino, H.R., Carrasquillo, K.G., Cordero, R.A., Mumenthaler, M., Hsu, C.C. and Griebenow, K.** (1998) Effect of excipients on the stability and structure of lyophilized recombinant human growth hormone. *Journal of Pharmaceutical Science* 87: 1412-1420.

**Daughney, C.J. and Fein, J.B.** (1998) The effect of ionic strength on the adsorption of  $H^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: a surface complexation model. *Journal of Colloid and Interface Science*. 198: 53-77.

**Davis, T.A., Volesky, B. and Mucci, A.** (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*. 37: 4311-4330.

**de Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.** (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23: 130-135.

**Deacon, G.B. and Phillips, R.J.** (1980) Relationships between the carbon-oxygen stretching frequencies of carboxylato complexes and the type of carboxylate coordination. *Coordination Chemistry Reviews*. 33: 227-250.

**Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. and Hols, P.** (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General Microbiology* 76: 159-184.

**Devirgiliis, C., Barile, S. and Perozzi, G.** (2011) Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes and Nutrition*. 6: 275-284.

**Diamond, G.L., Goodrum, P.E., Felter, S.P. and Ruoff, W.L.** (1998) Gastrointestinal absorption of metals. *Drug and Chemical Toxicology*. 21: 223-251.

- Ding, F., Borreguero, J.M., Buldyrey, S.V., Stanley, H.E. and Dokholyan, N.V.** (2003) Mechanism for the alpha-helix to beta-hairpin transition. *Proteins*. 53: 220-228.
- Dönmez, G. and Aksu, Z.** (2002) Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochemistry*. 38: 751-762.
- Dong, A., Huang, P., Caughey, W.S.** (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29: 3303-3308.
- Esbensen, K.H.** (2005) *Multivariate Data Analysis - In Practice*, 5<sup>th</sup> edition, Esbjerg, Denmark: CAMO Process AS.
- Esposito, A., Pagnanelli, F., Lodi, A., Solisio, C. and Vegliò, F.** (2001) Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations. *Hydrometallurgy* 60: 129-141.
- Fahmy, K., Merroun, M., Pollmann, K., Raff, J., Savchuk, O., Hennig, C. and Selenska-Pobell, S.** (2006) Secondary structure and Pd(II) coordination in S-layer proteins from *Bacillus sphaericus* studied by infrared and x-ray absorption spectroscopy. *Biophysical Journal*. 91: 996-1007.
- Fierens, S., Mairesse, H., Heilier, J.F., Focant, J.F., Eppe, G., Pauw, E. and Bernard, A.** (2007) Impact of iron and steel industry and waste incinerators on human exposure to dioxins, PCBs, and heavy metals: results of a cross-sectional study in Belgium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*. 70: 222-226.
- Fotiadis, D., Scheuring, S., Müller, S.A., Engel, A. and Müller, D.J.** (2002) Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron*. 33: 385-397.
- Frece, J., Kos, B., Beganovic, J., Vukovic, S. and Suskovic, J.** (2005) *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 1401-1408.

- Gadd, G.M., White, C. and De Rome, L.** (1988) Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeasts. In: Biohydrometallurgy: Proceedings of an International Symposium, Science Technology Letters, Editors: Norri, P.R., Kelly, D.P. Kew Surrey, UK. pp 421-436.
- Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pérez, P.F., Semorile, L. and De Antoni, G.L.** (2004) Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*. 71: 222-230.
- Ghiamati, E., Manoharan, R., Nelson, W.H. and Sperry, J.F.** (1992) UV resonance Raman spectra of *Bacillus* spores. *Applied Spectroscopy*. 46: 357-364.
- Goicoechea, H.C. and Olivieri, A.C.** (2003) A new family of genetic algorithms for wavelength interval selection in multivariate analytical spectroscopy. *Journal of Chemometrics*. 17: 338-345.
- Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Abraham, A.G. and De Antoni, G.L.** (2007) Protective activity of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*. 118: 264-273.
- Golowczyc, M.A.** (2008) Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Gómez-Zavaglia, A.** (2000) Quimiotaxonomía de bacterias lácticas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Györvary, E.S., Stein, O., Pum, D. and Sleytr, U.B.** (2003) Self-assembly and recrystallization of bacterial S-layer proteins at silicon supports imaged in real time by atomic force microscopy. *Journal of Microscopy*. 212: 300-306.
- Halttunen, T., Kankaanpää, P., Tahvonen, R., Salminen, S. and Ouwehand, A.C.** (2003) Cadmium removal by lactic acid bacteria. *Bioscience Microflora*. 22: 93-97.

- Halttunen, T., Salminen, S. and Tahvonen, R.** (2007) Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 114: 30-35.
- Halttunen, T., Salminen, S., Meriluoto, J., Tahvonen, R. and Lertola, K.** (2008a) Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125: 170-175.
- Halttunen, T., Collado, M.C., El-Nezami, H., Meriluoto, J. and Salminen, S.** (2008b) Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 160-165.
- Hollmann, A.** (2010) Liposomas recubiertos con proteínas de capa S de lactobacilos como vehículos de entrega oral de antígenos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.
- Huang, W.E., Griffiths, R.I., Thompson, I.P., Bailey, M.J. and Whiteley, A.S.** (2004) Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Analytical Chemistry*. 76: 4452-4458.
- Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R. and Salminen, S.** (2006) Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Canadian Journal of Microbiology*. 52: 877-885.
- Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. and Wilkins, E.** (1999) Biosensors Based on Direct Bioelectrocatalysis for Environmental Monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*. 14: 599-624.
- Jakava-Viljanen, M., Avall-Jaaskelainen, S., Messner, P., Sleytr, U. B. and Palva, A.** (2002) Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology*. 184: 6786-6795.
- Jarvis, R.M. and Goodacre, R.** (2004) Ultraviolet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 232: 127-132.

- Jarvis, R.M. and Goodacre, R.** (2005) Genetic algorithm optimisation for pre-processing and variable selection of spectroscopic data. *Bioinformatics*. 21: 860-868.
- Jin, Y., Duan, L., Lee, S.H., Kloosterboer, H.J., Blair, I.A. and Penning, T.M.** (2009) Human cytosolic hydroxysteroid dehydrogenases of the aldoketoreductase superfamily catalyze reduction of conjugated steroids. *Journal of Biological Chemistry*. 284: 10013-10022.
- Jordan, S., Hutchings, M.I. and Mascher, T.** (2008) Cell envelope stress response in grampositive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 107-146.
- Juárez Tomás, M.S., Ocaña, V.S., Wiese, B. and Nader-Macías, M.E.** (2003) Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology* 52: 1117-1124.
- Kasan H.** (1993) The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 23: 79-117.
- Kiely, G. and Veza, J.M.** (1999) Ingeniería ambiental, fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. McGraw-Hill, Interamericana de España. 1331 pp.
- Koga, T., Taguchi, K., Kobuke, Y., Kinoshita, T. and Higuchi, M.** (2003) Structural regulation of a peptide-conjugated graft copolymer: a simple model for amyloid formation. *Chemistry: A European Journal*. 9: 1146-1156.
- Koller, V.J., Marian, B., Stidl, R., Nersesyan, A., Winter, H., Simić, T., Sontag, G. and Knasmüller, S.** (2008) Impact of lactic acid bacteria on oxidative DNA damage in human derived colon cells. *Food Chemistry and Toxicology*. 46: 1221-1229.

- Koval, S. F. & Hynes, S. H. (1991)** Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology* 173: 2244-2249.
- Krafft, C. (2004)** Bioanalytical applications of raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378: 60-62.
- Kreplak, L., Doucet, J., Dumas, P. and Briki, F. (2004)** New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibres. *Biophysical Journal*. 87: 640-647.
- Krimm, S., Bandekar, J. (1986)** Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 38: 181-364.
- Koga, K., Hauri, E., Hirschmann, M., Bell, D. (2003)** Hydrogen concentration analyses using SIMS and FTIR: Comparison and calibration for nominally anhydrous minerals. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 4: 1019.
- Lee, J.Y., Choi, J.C. and Lee, K.K. (2005)** Variations in heavy metal contamination of stream water and groundwater affected by an abandoned lead-zinc mine in Korea. *Environmental Geochemistry and Health*. 27: 237-257.
- Lefier, D., Lamprell, H. and Mazerolles, G. (2000)** Evolution of *Lactococcus* strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. *Lait* 80: 247-254.
- Lin, Z., Zhou, C., Wu, J., Zhou, J., Wang, L. (2005)** A further insight into the mechanism of  $\text{Ag}^+$  biosorption by *Lactobacillus* sp. strain A09. *Spectrochimica Acta A*. 61: 1195-1200.
- Linnik, P.N. (2003)** Complexation as the most important factor in the fate and transport of heavy metals in the Dnieper water bodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 376: 402-412.

- Lomax, A.R. and Calder, P.C.** (2009) Prebiotics, immune function, infection and inflammation: A review of the evidence. *British Journal of Nutrition*. 101: 633-658.
- López Díez, E.E. and Goodacre, R.** (2004) Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics. *Analytical Chemistry*. 76: 585-591.
- Lu, W.B., Shi, J.J., Wang, C.H. and Chang, J.S.** (2006) Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazard Mater*. 134: 80-86.
- Luo, F., Liu, Y.H., Li, X.M., Xuan, Z.X. and Ma, J.T.** (2006) Biosorption of lead ion by chemically-modified biomass of marine brown algae *Laminaria japonica*. *Chemosphere*. 64: 1122-1127.
- Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H. and Pauss, A.** (1999) Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Water Research*. 33: 1347-1354.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Coo-Smith, L.P., Ngo-Thi, N.A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H.P., Bruining, H.A., Naumann and D., Puppels, G.J.** (2003) Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 324-329.
- Martens, H. and Næs, T.** (1989) Methods for calibration. In: *Multivariate Calibration*. Chichester, England, Wiley and Sons Ltd: Chapter 3, pp. 97-112.
- Martens, H., Nielsen, J.P. and Engelsen, S.B.** (2003) Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Analytical Chemistry*. 75: 394-404.

- Martens, E.C., Lowe, E.C., Chiang, H., Pudlo, N.A., Wu, M., McNulty, N.P., Abbott, D.W., Henrissat, B., Gilbert, H.J., Bolam, D.N. and Gordon, J.I.** (2011) Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biology*. 9: 1-16.
- Matheus, S., Friess, W. and Mahler, H.C.** (2006) FTIR and DSC as analytical tools for high-concentration protein formulations. *Pharmaceutical research*. 23: 1350-1363.
- Mehta, S.K. and Gaur, J.P.** (2005) Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25: 113-152.
- Meier, M. and Seelig, J.** (2008) Length dependence of the coil beta-sheet transition in a membrane environment. *Journal of the American Chemical Society*. 130: 1017-1024.
- Messner, P. and Sleytr, U.B.** (1992) Crystalline bacterial cell surface layers. *Advances in Microbiology and Physiology*. 33: 213-275.
- Miller, J.R., Hudson-Edwards, K.A., Lechler, P.J., Preston, D. and Macklin, M.G.** (2004) Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Rio Pilcomayo basin, Bolivia. *Science of the Total Environment*. 320: 189-209.
- Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile, L., Pérez, P.F.** (2007) Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 116: 197-206.
- Mobili P., Londero A., Maria T.M.R., Eusebio M.E.S., De Antoni G.L., Fausto R. and Gómez-Zavaglia A.** (2009) Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Vibrational Spectroscopy* 50: 68-77.
- Mobili, P., Gerbino, E., Tymczyszyn, E.E. and Gómez-Zavaglia, A.** (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. In: *Current Research*,

Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Editor: Méndez-Vilas, A. Vol. 2, pp 1224-1234. Badajoz, Spain: Formatex Research Center.

**Mobili, P., Araujo-Andrade, C., Londero, A., Frausto-Reyes, C., Ivanov-Tzonchev, R., De Antoni, G.L. and Gómez-Zavaglia, A.** (2011) Development of a method based on chemometric analysis of Raman spectra for the discrimination of heterofermentative lactobacilli. *Journal of Dairy Research*. 78: 233-241.

**Mohamed, M.A.M., Osman, M.A., Potter, T.L. and Levin, R.E.** (1998) Lead and cadmium in Nile River water and finished drinking water in greater Cairo, Egypt. *Environmental International*. 24: 767-772.

**Monachese, M.**, Thesis (2012a) Sequestration of lead, cadmium and arsenic by *Lactobacillus* species and detoxification potential. University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

**Monachese, M., Burton, J.P. and Reid, G.** (2012b) Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: A potential role for probiotics? *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 6397-6404.

**Morris, V.J., Kirby, A.R. and Gunning, A.P.** (1999) Atomic Force Microscopy for biologists. London: Imperial College Press 352 pp.

**Möschl, A., Schäffer, C., Sleytr, U.B., Messner, P., Christian, R. and Schulz, G.** (1993) Characterization of the S-layer glycoproteins of two lactobacilli. In: *Advances in bacterial paracrystalline surface layers* Editors: Beveridge, T.J. and Koval, S.F. pp. 281-284. Plenum, New York, USA.

**Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E.M., Van der Meulen, R., Foulquié Moreno, M.R., Font de Valdez, G. and De Vuyst, L.** (2006) Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4431-4435.

- Mrvčić, J., Prebeg, T., Barišić, L., Stanzer, D., Bacun-Druzina, V. and Stehlik-Tomas, V** (2009a) Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 47: 381-388.
- Mrvčić, J., Stanzer, D., Bacun-Druzina, V. and Stehlik-Tomas, V.** (2009b) Copper binding by lactic acid bacteria. *Bioscience Microflora*. 28: 1-6.
- Mrvčić, J., Stanzer, D., Šolić, E., & Stehlik-Tomas, V.** (2012) Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-12.
- Mudgal, V., Madaan, N., Anurag Mudgal, R.B. and Mishra, S.S.** (2010) Effect of toxic metals on human health. *Open Nutraceuticals Journal*. 3: 94-99.
- Müller, D.J., Baumeister, W. and Engel, A.** (1996) Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology*. 178: 3025-3030.
- Mulvaney, S.P. and Keating, C.D.** (2000) Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 72: 153-161.
- Nara, M. and Tanokura, M.** (2008) Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 369: 225-239.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. and Giesbrecht, P.** (1991) Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. In: *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*. Editor: Nelson W.H. pp. 43-96. VCH Publishers. N.Y., USA.
- Naumann, D.** (2000) Infrared spectroscopy in microbiology. In: *Encyclopedia of analytical chemistry*. Editor: Meyers R.A. pp. 102-131. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom

- Neuhaus, F.C. and Baddiley, J.** (2003) A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 67: 686-723.
- Nies, D.H. and Silver, S.** (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14: 186-99.
- Nies, D.H.** (1999) Microbial heavy-metal resistance *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 730-750.
- Nies, D.H.** (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiological Reviews*. 27: 313-339.
- Nybohm, S.M.K., Salminen, S.L. and Meriluoto, J.A.O.** (2007) Removal of microcystin-LR by metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 170: 27-33.
- Organización Mundial de la Salud** (2006) Guidelines for drinking-water quality. Vol. 1, Recomendaciones. – 3rd ed. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/en/index.htm](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.htm)
- Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe, C.J.G., Pereboom, D.P.K.H. and Sips, A.J.A.M.** (2003) Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bio-accessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 281-287.
- Panwichian, S.; Kantachote, D.; Wittayaweerarak, B. and Mallavarapu, M.** (2011). Removal of heavy metals by exopolymeric substances produced by resistant purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 4.
- Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E. and Vega, M.** (2003) Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 376: 26-32.

- Parkes, G.C., Sanderson, J.D. and Whelan, K.** (2009) The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Lancet Infection Diseases*. 9: 237-244.
- Pavasant, P., Apiratikul, R., Sungkhum, V., Suthiparinyanont, P., Wattanachira, S. and Marhaba, T.F.** (2006) Biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresources Technology*. 97: 2321-2329.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P. and Bellon-Fontaine, M.N.** (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1725-1731.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J. and Salminen, S.** (2001) Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. 84: 2152-2156.
- Pérez, P.F., Minnaard, J., Disalvo, E.A. and De Antoni, G.L.** (1998) Surface-properties of bifidobacterial strains of human-origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 21-26.
- Plaza Cazón, J., Bernardelli, C., Viera, M., Donati, E. and Guibal, E.** (2012) Zinc and cadmium biosorption by untreated and calcium-treated *Macrocystis pyrifera* in a batch system. *Bioresource Technology*. 116: 195-203.
- Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K. and Selenska-Pobell, S.** (2006) Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnology Advances*. 24: 58-68.
- Pollmann, K., and Matys, S.** (2007) Construction of an S-layer protein exhibiting modified self-assembling properties and enhanced metal binding capacities. *Applied microbiology and biotechnology*. 75: 1079-1085.

- Pum, D., Messner, P. & Sleytr, U. B.** (1991) Role of the S-layer in morphogenesis and cell division of the archaeobacterium *Methanococcus sinense*. *Journal of Bacteriology* 173: 6865-6873.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.D. and Wang, J.** (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464: 59-65.
- Qin, Z. and Buehler, M.J.** (2010) Cooperative deformation of hydrogen bonds in beta-strands and beta-sheet nanocrystals. *Physical Reviews E* 82: 061906.
- Rajaratnam, G., Winder, C. and An, M.** (2002) Metals in drinking water from new housing estates in the Sydney area. *Environmental Research*. 89: 165-170.
- Raibaud, P. Caulet, M. Galpín, J.V. and Mocquot, G.** (1961) Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs, II Streptococci: selective enumeration of the dominant groups *Journal of Applied Bacteriology*. 24: 285-291.
- Ramos Moita, M.F., Duarte, M.L.T.S. and Fausto, R.** (1994) Investigation of the structure of the columnar liquid-crystalline phase of copper(II) carboxylates. An FTIR spectroscopic study. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*. 90: 2953-2960.

- Rial, D., Vázquez, J. A., & Murado, M. A.** (2011) Effects of three heavy metals on the bacteria growth kinetics: a bivariate model for toxicological assessment. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), 1095-1109.
- Robinson, J.B. and Tuovinen, O.H.** (1984) Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiological Reviews*. 48: 95-124.
- Rodriguez, R.R., Basta, N.T., Casteel, S.W. and Pace, L.W.** (1999) An *in vitro* gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. *Environmental Science and Technology*. 33: 642-649.
- Rojas, M., Ascencio, F. and Conway, P.L.** (2002) Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2330-2336.
- Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M.L. and Munoz, J.A.** (2006) Biosorption with algae: A statistical review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 26: 223-235.
- Rosborg, I., Nihlgard, B. and Gerhardsson, L.** (2003) Inorganic constituents of well water in one acid and one alkaline area of south Sweden. *Water Air Soil Pollution*. 142: 261-277.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P.** (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 12: 163-171.
- Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S. and Sellstone, C.M.** (1996) Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction Test. *Environmental Sciences and Technology*. 30: 422-430.
- Ruemmele, F.M., Bier, D., Marteau, P., Rechkemmer, G., Bourdet-Sicard, R., Walker, W.A. and Goulet, O.** (2009) Clinical evidence for

immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*. 48: 126-141.

**Ryan, P.B., Huet, N. and MacIntosh, D.L.** (2000) Longitudinal investigation of exposure to arsenic, cadmium, and lead in drinking water. *Environmental Health Perspectives*. 108: 731-735.

**Sağ, Y., Atacoglu, I. and Kutsal, T.** (2000) Equilibrium parameters for the single- and multicomponent biosorption of Cr(VI) and Fe(III) ions on *R. arrhizus* in a packed column. *Hydrometallurgy*. 55: 165-179.

**Sára M & Sleytr U B.** (1987) Molecular sieving through S-layers of *Bacillus stearothermophilus* strains. *Journal of Bacteriology* 169: 4092-4098.

**Sára, M. and Sleytr, U.B.** (2000) S-layer proteins. *Journal of Bacteriology*. 182: 859-868.

**Sára, M., Egelseer, E.M., Huber, C., Ilk, N., Pleschberger, M., Pum, D., Sleytr, U.B.** (2006) S-layer proteins: Potential application in nano(bio)technology. In: *Microbial Bionanotechnology: Biological Self-Assembly Systems and Biopolymer-Based Nanostructures*. Editor: Rehm, B. pp. 307-338, Horizon Bioscience, Palmerston North, New Zealand.

**Schar-Zammaretti, P. and Ubbink, J.** (2003) The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations. *Biophysical Journal*. 85: 4076-4092.

**Schar-Zammaretti, P., Dillmann, M.L., D'Amico, N., Affolter, M. and Ubbink, J.** (2005) Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 8165-8173.

**Scheuring, S., Stahlberg, H., Chami, M., Houssin, C., Rigaud, J. L. and Engel, A.** (2002) Charting and unzipping the surface layer of *Corynebacterium glutamicum* with the atomic force microscope. *Molecular microbiology*. 44: 675-684.

- Schultze-Lam, Harauz G & Beveridge T. J.** (1992) Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *Journal of Bacteriology* 174: 7971-7981.
- Schut, S., Zauner, S., Hampel, G., König, H. and Claus, H.** (2011) Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli. *International Journal Food Microbiology*. 145: 126-131.
- Schryvers, A.B. and Stojiljkovic, I.** (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Molecular Microbiology*. 32: 1117-1123.
- Seifert, B., Becker, K., Helm, D., Krause, C., Schulz, C. and Seiwert, M.** (2000) The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*. 10: 552-565.
- Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Berga, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J., Klopp, C., Mariette, J., Bouchez, O., Lluch, J., Ouarné, F., Monsan, P., Valet, P., Roques, C., Amar, J., Bouloumia, A., Thaodorou, V. and Burcelin, R.** (2011) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*. 61: 543-553.
- Silver, S. and Misra, T.** (1988) Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annual Reviews on Microbiology* 42: 717-43.
- Silver, S.** (1998) Genes for all metals. A bacterial view of Periodic Table. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 1-12.
- Silver, S. and Phung, L.T.** (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 587-605.
- Sleytr, U.B., Messner, P.** (1988) Crystalline surface layers in procaryotes. *Journal of Bacteriology*. 170: 2891-2897.

- Sleytr, U.B. and Beveridge, T.J.** (1999) Bacterial S-layers. Trends in Microbiology. 7: 253-260.
- Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D. and Schuster, B.** (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. Progress in Surface Science 68: 231-278.
- Sleytr, U.B., Egelseer, E.M., Ilk, N., Pum, D. and Schuster, B.** (2007) S-layers as a building block in a molecular construction kit. FEBS Journal. 274: 323-334.
- Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B. and Pouwels, P.H.** (2001) The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. Journal of Molecular Biology. 305: 245-257.
- Souillac, P.O., Middaugh, C.R. and Rytting, J.H.** (2002) Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. 2. Diffuse reflectance FTIR studies. International Journal of Pharmaceutics. 20: 207-218.
- Stidl, R., Sontag, G., Koller, V. and Knasmüller, S.** (2008) Binding of heterocyclic aromatic amines by lactic acid bacteria: results of a comprehensive screening trial. Molecular Nutrition Food Research. 52: 322-329.
- Stuart, B.H.** (2004) Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications, John Wiley and sons. N.Y. USA. 242 pp.
- Suhasini, I.P., Sriram, G., Asolekar, S.R. and Sureshkumar, G.K.** (1999) Biosorptive removal and recovery of cobalt from aqueous systems. Process Biochemistry. 34: 239-247.
- Sun, G., Van de Wiele, T., Alava, P., Tack, F. and Du Laing, G.** (2012) Arsenic in cooked rice: effect of chemical, enzymatic and microbial processes on bio-accessibility and speciation in the human gastrointestinal tract. Environmental Pollution. 162: 241-246.

- Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S.** (2002) Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresearch Technology*. 85: 103-105.
- Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H. and Chen, W.** (2012) *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice. *Biological Trace Element Research*. 150: 264-271.
- Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Bjorkman, Y., Sillanpaa, J., Vartio, T., Kalkkinen, N. and Korhonen, T.K.** (1995) A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2467-2471.
- Torii, H. and Tasumi, M.** (1996) Theoretical analyses of the amide I infrared bands of globular proteins. In: *Infrared spectroscopy of biomolecules*. Editors: Mantsch H. and Chapman D. Chapter 1: pp. 1-18. Wiley-Liss Inc. New York, USA.
- Trajanovska, S., Britz, M.L. and Bhave, M.** (1997) Detection of heavy metal ion resistance genes in grampositive and gramnegative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation*. 8: 113-114.
- Tsapikouni, T.S. and Missirlis, Y.F.** (2007) pH and ionic strength effect on single fibrinogen molecule adsorption on mica studied with AFM. *Colloids and surfaces B Biointerfaces*. 57: 89-96.
- Turbic, A., Ahokas, J. and Haskard, C.** (2002) Selective *in vitro* binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Additives and Contaminants*. 19: 144-152.
- Turroni, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., Cagnasso, P., Bizzarri, B., de'Angelis, G.L., Shanahan, F., van Sinderen, D. and Ventura, M.** (2009) Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 1534-1545.

- Tuzen, M., Soylak, M. and Parlar, K.** (2005) Cadmium and lead contamination in tap water samples from Tokat, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75: 284-289.
- Van de Weert, M., Haris, P.I., Hennink, W.E. and Crommelin, D.J.** (2001) Fourier Transform Infrared Spectrometric Analysis of Protein Conformation: Effect of Sampling Method and Stress Factors. *Analytical Biochemistry*. 297: 160-169.
- Van der Wiele, T.R., Oomen, A.G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, C., Rempelberg, C.J.M., De Zwart, L.L., Klinck, B., Van Wijnen, J., Verstraete, W. and Sips, A.J.A.M.** (2007) Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Sciences and Health Part A*. 42: 1203-1211.
- Vegliò, F. and Beolchini, F.** (1997) Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy*. 44: 301-316.
- Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C., & Vanderleyden, J.** (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS microbiology letters*, 276(2), 140-148.
- Ventura, M., Jankovic, I., Walker, D.C., Pridmore, R.D. and Zink, R.** (2002) Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasserii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 6172-6181.
- Vidgren, G., Palva, I., Pakkanen, R., Lounatmaa, K., Palva, A.** (1992) S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: Cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *Journal of Bacteriology*. 174: 7419-7427
- Vinodhini, R. and Narayanan, M.** (2008) Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (common carp). *International Journal of Environmental Sciences and Technology*. 5: 179-182.

- Vijayaraghavan, K., Palanivelu, K. and Velan, M.** (2006) Biosorption of copper(II) and cobalt(II) from aqueous solutions by crab shell particles. *Bioresource Technology*. 97: 1411-1419.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.S.** (2007) Utilization of fermentation waste (*Corynebacterium glutamicum*) for biosorption of reactive black 5 from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*. 141: 45-52.
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.-S.** (2008) Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*. 26: 266-291.
- Volke, S.T., Velasco, T.J. and de la Rosa, P.D.** (2002) Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología, México. 141 pp.
- Volesky, B. and Holan, Z.R.** (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*. 11: 235-250.
- Vrieze, A., Holleman, F., Zoetendal, E., de Vos, W., Hoekstra, J. and Nieuwdorp, M.** (2010) The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 53: 606-613.
- Virkutyte, J. and Sillanpää, M.** (2006) Chemical evaluation of potable water in Eastern Qinghai Province, China: human health aspects. *Environmental International*. 32: 80-86.
- Vullo, D.** (2003) Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*. 2: 93-104.
- Vullo, D.L., Ceretti, H.M., Daniel, M.A., Ramírez, S.A.M., Zalts, A.** (2008) Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresource Technology*. 99: 5574-5581.
- Wang, J., & Chen, C.** (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195-226.
- Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., DiZio, S. and Wade, M.** (1992) *In vitro* percutaneous absorption of cadmium from

water and soil into human skin. *Fundamental and Applied Toxicology*. 19: 1-5.

**Woo, N.C. and Choi, M.J.** (2001) Arsenic and metal contamination of water resources from mining wastes in Korea. *Environmental Geology*. 40: 305-311.

**Yan, G.Y. and Viraraghavan, T.** (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*. 37: 4486-4496.

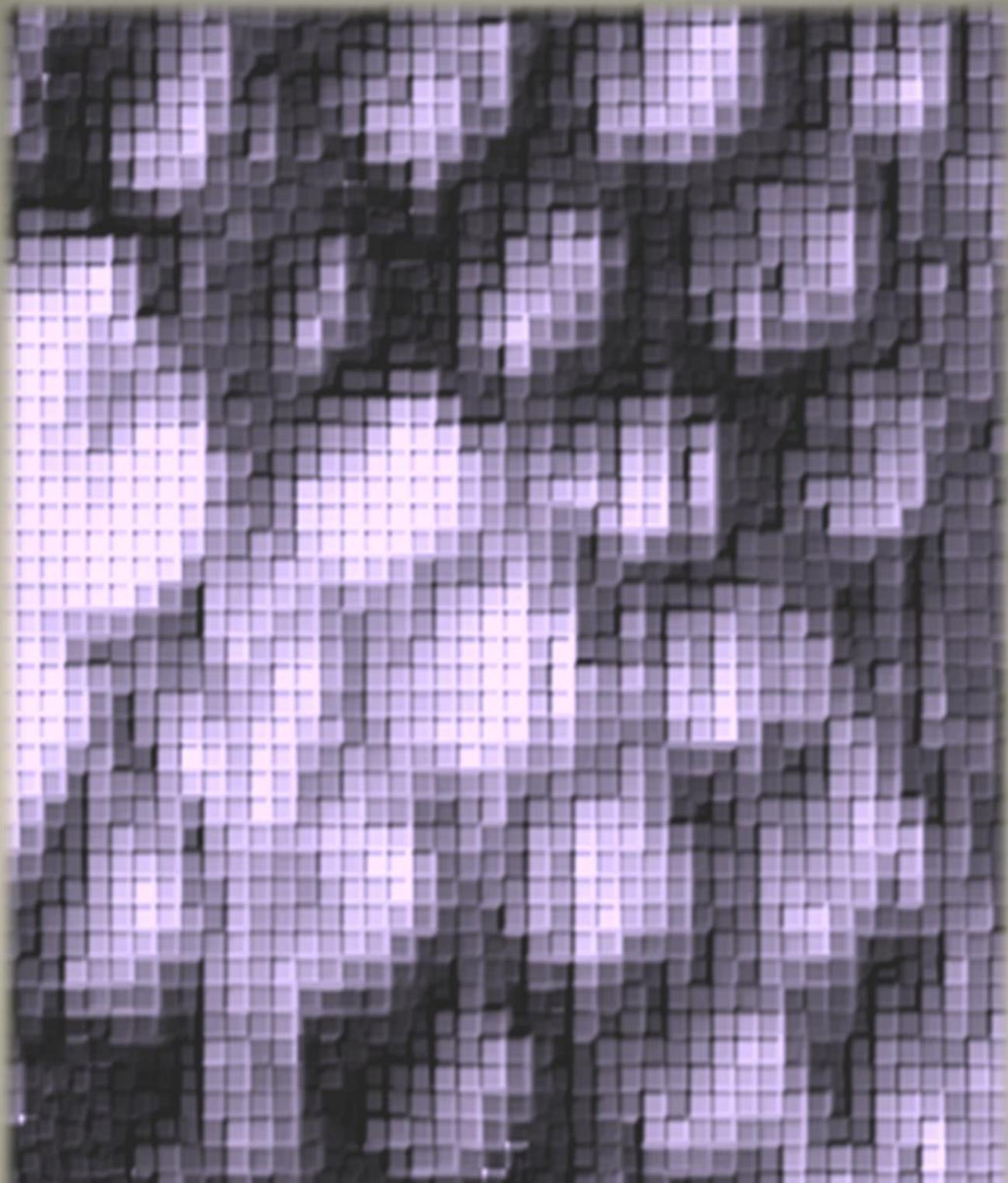
**Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H. and Chen, W.** (2013) Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against Acute Cadmium Toxicity in Mice. *Appl Environ Microbiol*. 79(5):1508-15.

**Zarazua, G., Ávila-Pérez, P., Tejeda, S., Barcelo-Quintal, I. and Martínez, T.** (2006) Analysis of total and dissolved heavy metals in surface water of a Mexican polluted river by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta B*. 61: 1180-1184.

**Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E. and De Vos, W.M.** (2006) A microbial world within us. *Molecular Microbiology*. 59: 1639-1650.

**Zouboulis, A.I., Loukidou, M.X. and Matis, K.A.** (2004) Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*. 39: 909-916.

**Zubero, M.B., Aurrekoetxea, J.J., Ibarluzea, J.M., Arenaza, M.J., Rodríguez, C. and Sáenz, J.R.** (2010) Heavy metal levels (Pb, Cd, Cr and Hg) in the adult general population near an urban solid waste incinerator. *Science of the Total Environment*. 408: 4468-4474.



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas

