

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química

“CARACTERIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE RESISTENCIA Y REDUCCIÓN DE OXOANIONES DE SELENIO PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SELENIO ELEMENTAL POR EL MICROORGANISMO *Klebsiella pneumoniae* AqSCr COMO ALTERNATIVA EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A

DAVID OMAR PAPAQUI HERNÁNDEZ

Director de Tesis:

Dra. Katy Juárez López

Instituto de Biotecnología



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**

\_\_\_\_\_

**VOCAL: HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ**

\_\_\_\_\_

**SECRETARIO: KATY JUÁREZ LÓPEZ**

\_\_\_\_\_

**1er. SUPLENTE: FÉLIX MORALES FLORES**

\_\_\_\_\_

**2º SUPLENTE: EDGAR AXEL DONJUAN GUERRERO**

\_\_\_\_\_

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (IBT), UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. KATY JUÁREZ LÓPEZ**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: DAVID OMAR PAPAQUI HERNÁNDEZ**

\_\_\_\_\_

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. RESUMEN.....   | 1  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....  | 3  |
| 2.1. La química del selenio.....  | 3  |
| 2.2. El selenio como recurso natural .....  | 3  |
| 2.3. El papel del selenio en los sistemas biológicos.....   | 6  |
| 2.4. Explotación y usos del selenio.....  | 6  |
| 2.5. Contaminación por selenio.....   | 8  |
| 2.6. Toxicidad del selenio y mecanismos de resistencia en células bacterianas.....                    | 9  |
| 2.7. Microorganismos reductores de selenio y sus aplicaciones en procesos de<br>biorremediación ..... | 11 |
| 2.8. Metilación y reducción extracelular.....   | 14 |
| 2.9. Procesos de biorremediación.....   | 16 |
| 2.10. Producción de nanopartículas y sus aplicaciones.....  | 17 |
| 3. ANTECEDENTES.....  | 20 |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....   | 22 |
| 5. HIPÓTESIS.....   | 22 |
| 6. OBJETIVO GENERAL.....  | 22 |
| 7. OBJETIVOS PARTICULARES.....  | 22 |
| 8. METODOLOGÍA.....   | 23 |
| 8.1. Generalidades de la cepa utilizada.....  | 23 |
| 8.2. Medios de cultivo.....   | 24 |
| 8.2.1. Medios de cultivo aerobios.....  | 24 |

|  |    |
|--|----|
| 8.2.2. Medios de cultivo anaerobios.....   | 25 |
| 8.3. Preparación de preinoculos.....   | 26 |
| 8.4. Curvas de crecimiento.....  | 27 |
| 8.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria a oxoaniones de selenio..... | 27 |
| 8.6. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes.....                                  | 28 |
| 8.7. Crecimiento de las cepas mutantes en presencia de oxoaniones de selenio.....      | 29 |
| 8.8. Cuenta viable.....  | 30 |
| 8.9. Microscopía óptica.....   | 30 |
| 8.10. Microscopía de fluorescencia.....  | 31 |
| 8.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....                                | 31 |
| 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 32 |
| 9.1. Curvas de crecimiento.....  | 32 |
| 9.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria a oxoaniones de selenio..    | 33 |
| 9.3. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes.....                                  | 40 |
| 9.4. Crecimiento de las cepas mutantes en presencia de oxoaniones de selenio.....      | 42 |
| 9.5. Cuenta viable.....  | 45 |
| 9.6. Microscopía óptica.....   | 46 |
| 9.7. Microscopía de fluorescencia.....   | 47 |
| 9.8. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....                                 | 50 |
| 10. CONCLUSIONES.....  | 53 |
| 11. REFERENCIAS.....   | 55 |

## 1. RESUMEN.

El selenio es un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos, tanto eucariontes como procariontes; las biomoléculas que contienen dicho elemento son esenciales para procesos celulares vitales como la protección contra el estrés oxidativo. Aunque algunos procesos celulares requieren de la presencia de selenio, las distintas especies químicas de este elemento, así como su concentración en el medio ambiente, constituyen factores fundamentales que determinan si dicho elemento puede representar riesgos para las formas de vida nativa. Dependiendo de la composición geológica, el uso de la tierra o la actividad antropogénica, pueden estar presentes y biodisponibles distintas cantidades de selenio en la naturaleza. La toxicidad del selenio está directamente relacionada con su especiación química, siendo los oxoaniones de dicho elemento los más móviles y los que presentan una mayor toxicidad para la mayoría de los organismos, el selenito y selenato se encuentran entre las especies de selenio más contaminantes debido a su alta solubilidad por lo que puede entrar fácilmente a las células.

En los últimos años se han buscado nuevas estrategias para remediar los problemas de contaminación, los cuales crecen al ritmo que crece la población mundial. La contaminación por metales pesados es considerada una de las problemáticas ambientales más graves que sufre nuestro planeta. Los seres humanos se han valido de procesos microbiológicos casi desde el inicio de todas las civilizaciones. El hombre ha utilizado microbios para progresar en la mayor parte de la historia. Por esa razón al buscar soluciones a la problemática ambiental, no es de extrañarse que los científicos centraran su atención en el diverso mundo de los microorganismos. Al ser las especies más antiguas y mejor adaptadas del planeta a condiciones adversas donde ningún otro organismo podría sobrevivir, esta capacidad de resistencia, en especial a altas concentraciones de metales pesados, es la que se ha utilizado en procesos de biorremediación.

El presente estudio se centró en la capacidad de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr aislada de un sitio gravemente contaminado por cromatos, de reducir oxoaniones de selenio, al ser una especie adaptada a concentraciones altas de metales, se espera que

presente las rutas metabólicas necesarias para resistir a estos contaminantes. Para comprobar si presenta la capacidad reductora de oxoaniones de selenio, así como determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) para dichas especies, se realizaron curvas de crecimiento a distintas concentraciones de sales disódicas de selenato y selenito, midiendo espectroscópicamente el crecimiento del microorganismo en el medio, donde se logró observar que la cepa utilizada tolera una concentración máxima de selenato de sodio Se(VI) de 800 mM en condiciones aerobias, y de 100 mM en condiciones anaerobias. Mientras que es capaz de tolerar una concentración máxima de selenito de sodio Se(IV) de 500 mM en condiciones aerobias, y de 20 mM en condiciones anaerobias; de lo cual se concluye que el Se(IV) es más tóxico para las células microbianas que el Se(VI). Tales concentraciones superan considerablemente la tolerancia de otros microorganismos reportados capaces de reducir oxoaniones de selenio. El mismo procedimiento se realizó pero con cepas mutantes en las cuales se suprimieron genes que codifican enzimas reductoras de otras especies de elementos para observar la contribución de estas reductasas a la reducción del selenio. Posteriormente se realizaron análisis de microscopía óptica, electrónica y de fluorescencia para localizar los sitios de reducción del selenio, si esta reducción se efectúa dentro de la célula o en el exopolisacárido secretado, debido a que la excreción de una gran cantidad de exopolisacárido es una característica del género *Klebsiella*, así como corroborar la formación de nanopartículas de selenio elemental. Algunos microorganismos toleran altas concentraciones de metales pesados, pero luego de lograr reducirlos se lisan al no tener mecanismos de expulsión de las partículas de selenio reducido que se acumula dentro de estos. Para corroborar la toxicidad de las especies de selenio utilizadas, se realizaron pruebas de cuenta viable, en donde se determinó la cantidad de microorganismos que logran sobrevivir y formar colonias, después de haber entrado en contacto con las sales de selenio y comenzar la reducción de dichos iones.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1. La Química del Selenio.**

El selenio es un elemento metaloide el cual representa el número atómico 34 y debido a que pertenece a la misma familia que el azufre, comparte ciertas propiedades con dicho elemento. El selenio elemental puede tener distintas formas alotrópicas:

- El selenio gris, es la forma metálica y más común, además de ser la especie termodinámicamente más estable. Está constituido por cadenas helicoidales de átomos de selenio, tiene propiedades semiconductoras y fotoeléctricas, presenta una estructura hexagonal.
- El selenio rojo, es la forma cristalina, no metálico, de color rojo intenso, que presenta una estructura monoclinica.

En su variedad amorfa se presenta como selenio negro, la cual puede ser vítrea o plástica dependiendo de la temperatura de obtención; y selenio rojo coloidal el cual no presenta propiedades metálicas, de apariencia polvorienta, está constituido por anillos de 8 átomos de selenio, generalmente se obtiene por la reducción biológica de oxoaniones de selenio y reducción en condiciones controladas (Gómez, 1999).

Estructuralmente el selenio tiene su orbital  $3d$  lleno, lo cual limita su capacidad de coordinación, pero tiene un nivel  $4p$  incompleto ( $4p^4$ ) lo cual le confiere al elemento una valencia de (II), esto explica la tendencia a formar anillos y largas cadenas cuando se encuentra en su forma elemental, dichas cadenas no pueden ser ramificadas ya que la valencia del elemento restringe sus compuestos a la geometría lineal (Zhang, et al., 2006).

El selenio puede presentarse en cuatro estados de oxidación: Se(VI) en selenatos, Se(IV) en selenitos, Se(0) como selenio elemental y Se(-II) en seleniuros.

### **2.2. El selenio como recurso natural.**

El selenio se encuentra casi exclusivamente como iones seleniuro, como parte de mezclas complejas en los minerales sulfurosos como seleniuros de hierro, níquel, plomo, cobre y zinc principalmente, como la clusthalita ( $PbSe$ ) y la naumanita ( $Hg_2S$ ), también podemos



encontrar al selenio en éste estado de oxidación en biomoléculas como aminoácidos (selenocisteína y selenometionina) y moléculas de organoselenio (seleniuro de dimetilo, diseleniuro de dimetilo, selenoles, selenonas, selenóxidos y haluros de selenilo). Sin embargo, las rocas sedimentarias pueden contener especies oxidadas de selenio como el selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) y el selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), que son también especies de selenio muy comunes en los suelos, además de compuestos orgánicos de selenio, especialmente en materia orgánica viva. Otras fuentes valiosas de selenio son los lodos residuales de electrólisis como subproducto del refinamiento electrolítico de cobre y plata, así como la refinación de hidrocarburos, en la naturaleza, algunas especies de selenio pueden transformarse en otras debido a factores geoquímicos y biológicos según el esquema de la figura 1 (Haug, et al., 2007).

El selenio es uno de los elementos menos abundantes en la corteza terrestre, se encuentra distribuido de manera desigual sobre la superficie de la tierra según la composición geológica de la roca madre variando desde cero hasta 1250 mg/Kg de suelo, aunque en promedio en el lecho rocoso ígneo se encuentra en una concentración aproximada de 0.05 mg/Kg de suelo, dicha abundancia es menor que para cualquier otro elemento considerado

**Figura 1.** Ciclo biogeoquímico del selenio (Stolz, et al., 2006).

micronutriente (Kessy, et al., 1999). Aunque típicamente las formas oxidadas y solubles de selenio suelen encontrarse en la zona óxica de la corteza y de los océanos, mientras que el selenio reducido,  $\text{Se}(0)$  y organoselenio, es más común en las zonas anóxicas. En ambientes marinos bien estratificados, la reducción microbiana de las formas oxidadas de selenio se ha relacionado directamente con la cantidad presente de selenio elemental en varios

sedimentos anóxicos. Por lo tanto, la especiación del selenio en la naturaleza depende fuertemente de la actividad microbiana (Herbel, et al., 2003).

La concentración media de selenio es mucho mayor en las rocas sedimentarias que en las rocas ígneas. Esto se puede explicar como una consecuencia de la transferencia volátil de selenio a la atmósfera y a la hidrósfera durante procesos volcánicos, una prueba de éste hecho es que la concentración de selenio en los suelos cerca de la costa es mucho mayor que en el resto de la masa continental, otro proceso importante que contribuye a la deposición de selenio en los suelos es la lluvia contaminada rica en ácido sulfúrico, la cual también es una fuente importante de selenio. El mecanismo de transferencia de selenio del mar a la atmósfera se produce mediante la evaporación de dimetil selenio y otros compuestos de selenio volátiles, producto del metabolismo del selenio inorgánico por la flora y fauna marina (Krauskopf, 1982).

El selenio como recurso natural en el mundo es muy limitado debido a que no hay minerales de los cuales pueda ser extraído como producto principal, el selenio se extrae como subproducto en la minería de otros metales y actualmente no existen depósitos de donde se pueda extraer el selenio puro (Eswayah, et al., 2017).

La forma en la que el selenio se encuentra en los suelos es muy importante para determinar la cantidad que se encuentra biodisponible: el selenato se adsorbe menos fuertemente a los minerales del lecho rocoso formados principalmente por óxido e hidróxido férrico y es absorbido más fácilmente por las plantas que el selenito, además de que la solubilidad del selenito (0.85 g/mL H<sub>2</sub>O) es mayor que la del selenato (0.70 g/mL H<sub>2</sub>O). Factores como el clima seco, la baja concentración de materia orgánica en el suelo, las altas temperaturas, niveles altos de pH y la poca disponibilidad de agua, pueden aumentar la proporción de selenato en los suelos. El selenito es la forma predominante de selenio inorgánico en suelos con altas concentraciones de materia orgánica, como en los países donde las bajas temperaturas impiden la degradación de la materia orgánica del suelo o en los suelos donde la mayor parte del año se encuentran bajo el agua como en el caso de los pantanos (Stolz, et al., 2006).

### **2.3. El papel del selenio en los sistemas biológicos.**

El selenio se considera un micronutriente esencial para los sistemas vivos ya que es un elemento clave para una serie de reacciones bioquímicas críticas, conformando selenoproteínas, tales como la proteína P (transportador glicoprotéico de permeabilidad membranal) y la proteína W (proteína lactosérica), ambas formadas por aminoácidos como la selenometionina y la selenocisteína en donde se sustituye el átomo de azufre por un átomo de selenio. Hasta la fecha se han identificado catorce selenoproteínas, este grupo de proteínas juega un papel importante en la protección de las células de los daños causados por el estrés oxidativo dañino causado, por ejemplo, por algún metal pesado tóxico u otros contaminantes ambientales; una selenoproteína de gran importancia es la glutatión-peroxidasa, la cual cataliza la reducción de  $H_2O_2$  y de varios peróxidos orgánicos, otras regulan el metabolismo de las hormonas, así como el estado redox de otras biomoléculas presentes en el organismo; los aminoácidos que contienen selenio se encuentran codificados en el genoma de la mayoría de los organismos tanto eucariontes como procariontes y se encuentran incorporados en los centros activos de selenoenzimas incluyendo reductasas, deshidrogenasas, peroxidasas, tiorredoxinas, las cuales juegan un papel clave en el metabolismo celular por su actividad antioxidante (Frost y Ingvaldstad, 1995).

### **2.4. Explotación y usos del selenio.**

El uso de selenio en medicina y agricultura agregado a fertilizantes químicos, alimento para animales, preparaciones veterinarias y suplementos alimenticios representa aproximadamente el 5 % de la demanda total de selenio, aunque se espera que la demanda aumente exponencialmente con el aumento de la población mundial. Las demandas industriales para el selenio acaparan la mayor parte de la producción, incluyendo una amplia variedad de aplicaciones en la industria eléctrica y electrónica, de pigmentos y colorantes, vidrieras y metalúrgicas, entre otras representando un 95 % de la demanda respectivamente (Selenium Tellurium Development Association, 2006).

El selenio tiene propiedades eléctricas únicas, presenta una conductividad asimétrica, es decir, permite conducir la corriente eléctrica en una sola dirección, característica que le da un valor especial en la industria como semiconductor, lo que es muy importante en distintos dispositivos electrónicos. Otra de sus características importantes es que debido a que su conductividad eléctrica es muy baja en la oscuridad y se incrementa varios cientos de veces con su exposición a la luz, también hay grandes demandas de selenio en la industria de colorantes para pinturas y para vidrio ya que es ideal en la producción de pigmentos y fotorreceptores, además puede reducir la transmisión de calor solar. El selenio es también un elemento estratégico para aplicaciones de alta tecnología por lo que la industria produce una gran demanda para el elemento. Debido a que el selenio es un recurso no renovable se produce un enorme desperdicio asociado con la minería a gran escala y el procesamiento industrial de otros metales, por lo que este recurso natural necesita ser manejado más cuidadosamente así como cambiar los enfoques para mejorar la producción y reciclado de este elemento, debido a que las técnicas de reciclado eficiente del selenio suelen ser muy complicadas (Oldfield, 1999).

El selenio se agrega en algunos fertilizantes comerciales para aumentar el valor nutrimental de ciertos grupos de alimentos, así como para promover el crecimiento y la calidad de las plantas, facilitando la biosíntesis de selenoproteínas, pero sólo una pequeña proporción es absorbida por las plantas y gran parte del resto se pierde, por lo tanto, puede ser un método de fortificación derrochador para ser aplicado a grandes áreas de nuestro planeta (Rayman, 2007).

La mayor parte de selenio en el mundo se produce en Estados Unidos, Japón y Canadá, se obtiene como subproducto de la minería del cobre. Según la Dirección de Control Documental e Indicadores estratégicos de la Secretaría de Economía, México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial en la producción de selenio, aportando el 4.1 % de la producción mundial, lo cual equivale a 100 toneladas aproximadamente, en el año 2016, siendo el estado de Sonora el principal aportador. La producción mundial ha aumentado

considerablemente desde que el elemento comenzó a utilizarse comercialmente a principios del siglo XX (Lyons, et al., 2003).

El uso del selenio como componente menor en tantos productos hace que sea muy difícil o casi imposible reciclarlo de manera eficiente, y solo aproximadamente el 15 % se logra reciclar, en 2016, solo 402 de las 2700 toneladas de selenio fueron recicladas (Selenium Tellurium Development Association, STDA, 2017). El selenio es económicamente recuperable a partir de desechos industriales y residuos de procesos químicos. La reutilización de metales es común para varios elementos, incluido el cobre, si el cobre es más fácil de reciclar que el selenio y el porcentaje de reutilización del cobre es mucho mayor que el del selenio, podríamos esperar que la demanda relativa de selenio sea mayor que la de cobre en un futuro, debido a, que como se explicó anteriormente, el selenio es principalmente un subproducto de refinación del cobre y que no existen depósitos de donde pueda extraerse exclusivamente selenio, lo cual puede resultar en una futura escases de selenio (Bajaj, et al., 2012).

## **2.5. Contaminación por selenio.**

Aunque una gran cantidad de selenio que se encuentra en circulación en el medio ambiente ha sido liberado como resultado de la actividad antropogénica, tales como la combustión de combustibles fósiles, la actividad industrial y la fertilización de suelos de cultivo, también existe contaminación natural por selenio, suelos con concentraciones inusualmente altas en especies de selenio se han encontrado en Wyoming, Dakota del Norte y otras regiones del sur de Estados Unidos, el condado de Enshi en China, Punjab en India, Colombia y Venezuela (Painter, 1994). En algunas de estas regiones la principal causa de la contaminación por selenio en el suelo es una alta concentración en la roca madre de este elemento, aunque factores como la deposición atmosférica, el intemperismo y la lixiviación de los minerales terrestres, los fluidos geotérmicos y los procesos volcánicos son procesos naturales que también contribuyen al enriquecimiento de suelos seleníferos. En muchas regiones de Europa, la concentración de selenio en el suelo es relativamente alta debido a elevada deposición de este elemento, ya sea de una fuente natural, por ejemplo

proveniente del mar (como en los casos de Irlanda, Inglaterra, Escocia y los Países Bajos) o de lluvias altamente contaminadas (por ejemplo, Alemania, República Checa, Eslovaquia y Polonia (Reilly, 2006).

En ambientes contaminados con selenio, el elemento se encuentra principalmente en forma de oxoaniones, selenito y selenato, la alta solubilidad de estas especies les confiere la propiedad de ser más móviles y perjudiciales, ya que se encuentran biodisponibles y pueden ser fácilmente absorbidos por organismos tanto eucariontes como procariontes de suelos o aguas ricas en selenio y entrar así en la cadena alimentaria según la cantidad de selenio disponible, que depende en gran medida del pH y el equilibrio redox en el suelo; lo cual representa un riesgo para los animales y los seres humanos. El selenio y otros metales y metaloides son contaminantes persistentes, al contrario de los contaminantes orgánicos, su remoción de suelos y aguas es muy complicada por lo que las nuevas estrategias de biorremediación se basan en su transformación de un estado de oxidación a otro no contaminante, el cual limita su biodisponibilidad (Souza, et al., 2000).

#### **2.6. Toxicidad del selenio y mecanismos de resistencia en células bacterianas.**

Se ha comprobado que las formas inorgánicas de selenio presentan una mayor toxicidad que las formas orgánicas, en casi cualquier organismo vivo.

En los organismos procariontes se ha propuesto que el selenio penetra al periplasma mediante las porinas de la membrana externa, una vez aquí puede ser reducido mediante reductasas periplásmicas como la flavin-óxido reductasa (DszD), u otras moléculas orgánicas como las quinonas, si el selenio no es reducido en el periplasma debido a que la concentración de oxoaniones es muy alta o que el microorganismo no cuenta con un sistema adecuado de enzimas reductasas periplásmicas, pueden penetrar al citoplasma mediante las permeasas transportadoras de sulfato, debido a que los oxoaniones de selenio presentan similitudes químicas, físicas y metabólicas con el ion sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), aunque se han hecho experimentos en los cuales se suprimen éstos transportadores y no se observan cambios en la concentración de iones de selenio dentro de las células, lo que implica la existencia de sistemas de transporte alternativos que podrían llevar a cabo el transporte de

las especies de selenio (Goldhaber, 2003). Si los oxoaniones de selenio logran penetrar hasta el citoplasma, estos pueden reaccionar fácilmente con el glutatión (tiol más abundante en los microorganismos de la clase  $\gamma$ -proteobacteria) formando seleno-di-glutatión que luego que convierte en seleno-persulfuro, el cual es inestable transformándose fácilmente en glutatión reducido y  $\text{Se}(0)$ , también pueden reaccionar con otros tipos de reductasas que pueden ser específicas para la reducción de oxoaniones de selenio o se pueden compartir algunos sistemas de reducción para otros elementos, como el complejo de arseniato reductasas que tienen la capacidad de metabolizar fácilmente oxoaniones de selenio, que incluyen la asimilación, metilación, desintoxicación y respiración anaerobia (Suzuki y Ogra, 2002). Algunos mecanismos de resistencia a algunos metales surge de mutaciones desarrolladas a través de su adaptación a altas concentraciones de contaminantes en el medio sin alterar sus funciones básicas, presentando mecanismos de autoprotección produciendo vías celulares alternativas. En el caso de que la reducción se lleve a cabo en el periplasma resulta en varios focos de nanopartículas nacientes de selenio precipitado, pero en el caso de que la reducción se lleve a cabo el citoplasma resulta en una esfera única y mucho más grande que tiene componentes citoplasmáticos adheridos a la superficie, tales como el factor de elongación citoplasmático EF-Tu y proteínas ribosomales cuando esta es excretada. Al iniciar la precipitación citoplasmática de las partículas de selenio 0, podrían unirse formando grandes esferas mediante el mecanismo de maduración de Ostwald o coalescencia. Si la o las nanopartículas no son excretadas pueden causar la ruptura de la célula debido al impacto de las esferas contra las membranas celulares. Se ha demostrado que la reducción en el citoplasma y en el citoplasma puede ocurrir simultáneamente (Gonzales, et al., 2016).

En los organismos eucariontes se ha observado que una de las primeras respuestas a las altas concentraciones de selenio es una disminución transitoria de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa durante la absorción del selenio por parte de las células, una posible explicación podría ser la autoinhibición de las selenoenzimas, como la glutatión peroxidasa, debido a que los iones selenato y selenito reaccionan con los grupos selenol ( $\text{R-Se-H}$ ) en residuos de selenoproteínas formando enlaces covalentes entre dos átomos de selenio ( $\text{Se-}$

Se) que causan la inactivación de la enzima. Los organismos eucariontes y procariontes convierten el selenio principalmente en selenometionina (Se-met) y selenocisteína, y posteriormente son incorporados a las proteínas, la selenocisteína está codificada por su propio ARNt, conformando principalmente la variedad de enzimas formiato deshidrogenasa. En el caso de la selenometionina, el selenio es metabolizado a través de la vía de asimilación del azufre, primero el selenato es activado con la ATP sulfurilasa y posteriormente convertido en selenometionina (Oremland, et al., 2002).

Algunas plantas y algas fotosintéticas tienen la capacidad de acumular selenio en relación directa con la cantidad biodisponible, mientras que otras llamadas organismos acumuladores de selenio, pueden acumular selenio en ordenes de magnitud superiores a las de la mayoría de las especies, este reservorio de selenio suele estar en forma de selenio metil-L-selenocisteína (SeMCys), entrando así a la cadena alimenticia grandes concentraciones de selenio lo cual puede ser perjudicial para un gran número de organismos. Diferentes formas de selenio en los organismos productores en la cadena alimenticia puede afectar distintas vías bioquímicas en el resto de los consumidores, lo cual no siempre es perjudicial en los organismos, por ejemplo, se ha observado que en algunos organismos que consumen plantas acumuladoras de selenio se ve inhibida la carcinogénesis (Stolz, et al., 2006).

### **2.7. Microorganismos reductores de selenio y sus aplicaciones en procesos de biorremediación.**

Las transformaciones redox durante el ciclo biogeoquímico del selenio no parece estar limitado a un grupo particular de organismos procariontes, microorganismos filogenéticamente diversos, como parte de grandes consorcios microbianos o individualmente son capaces de reducir las formas solubles de selenio en selenio elemental insoluble. La reducción de metales por microorganismos puede agruparse en dos procesos fundamentales: El primero es la reducción asimilatoria, en donde ocurre la reducción de iones metálicos y estos a su vez son acoplados a biomoléculas que son utilizadas en los procesos celulares. El segundo es la reducción disimilatoria, la cual ocurre preferentemente



en ambientes anóxicos ya que los especies metálicas actúan como aceptores finales de electrones en los procesos respiratorios de algunas bacterias anaerobias y aerobias facultativas, o como parte de un proceso de desintoxicación en el que la bio-reducción no está acoplada a los procesos respiratorios y de crecimiento, sino que ocurre como respuesta a la toxicidad, cuando hay una alta concentración de especies metálicas. Entre las especies que pueden realizar ésta biomineralización de iones selenato mediante sus procesos respiratorios se encuentra *Thauera selenatis*, la cual es una de las más estudiadas por su eficiente complejo de selenoreductasas periplásmicas, también se encuentran diversas especies de las clases  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\epsilon$ -proteobacteria. Por el contrario solo pocas especies de bacterias que respiran iones selenito se han logrado aislar hasta ahora y los detalles con respecto a los procesos de bio-reducción aún no se conocen completamente (Newman, et al., 1997).

La reducción disimilatoria de Se(VI) a Se(IV) y posteriormente a Se(0) es el proceso que se ha logrado demostrar que ocurre en la mayor parte de los microorganismos reductores de selenio, por lo que resulta ser un proceso ambiental significativamente rápido. Mientras que la reducción directa de Se(IV) a Se(0) también ocurre en la naturaleza, aunque resulta ser un proceso mucho más lento y se conocen pocos microorganismos con la capacidad de realizar esta reducción en un solo paso. Aunque también se han descubierto bacterias con vías metabólicas capaces de reducir Se(0) a selenuros (SeH<sup>-</sup>) (Muller, et al., 2003).

**Tabla 1.** Principales microorganismos reductores de selenio con aplicaciones biotecnológicas y su tolerancia máxima.

| <b>Microorganismos reductores de selenato Se(VI)</b> |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <b>Microorganismo</b>                                | <b>Tolerancia máxima</b> | <b>Referencia</b>        |
| <i>Thauera selenatis</i>                             | 10 mM                    | Butler, et al., 2012.    |
| <i>Methylococcus capsulatus</i>                      | 2 mM                     | Eswayah, et al., 2017.   |
| <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b               | 5 mM                     | Eswayah, et al., 2017.   |
| <i>Bacillus mycoides</i> SelTE01                     | 2 mM                     | Lampis, et al., 2014.    |
| <i>Azoarcus</i> sp.                                  | 8 mM                     | Fernández, et al., 2016. |
| <i>Rhizobium meliloti</i>                            | > 200 mM                 | Kinkle, et al., 1997.    |
| <i>Bacillus subtilis</i>                             | > 1 mM                   | Garbisu, et al., 1996.   |
| <i>Rhodospirillum rubrum</i>                         | > 2 mM                   | Kessi, et al., 1999.     |
| <i>Bacillus arseniciselenatis</i>                    | 20 mM                    | Nancharaiah, 2018.       |
| <i>Sulfurospirillum barnesii</i>                     | 40 mM                    | Nancharaiah, 2018.       |
| <i>Wolinella succinogenes</i>                        | 10 mM                    | Tomei, et al., 2012.     |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>                   | 10 mM                    | Tomei, et al., 1999.     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> AqSCr                   | 800 mM                   | Presente trabajo.        |
| <b>Microorganismos reductores de selenito Se(IV)</b> |                          |                          |
| <b>Microorganismo</b>                                | <b>Tolerancia máxima</b> | <b>Referencia</b>        |
| <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10               | 5 mM                     | Ranganathan, 2005.       |
| <i>Aquificales</i> HGMK-1, 2, y 3                    | 2 mM                     | Takai, et al., 2002.     |
| <i>Duganellan</i> sp.                                | 1 mM                     | Bajaj, et al., 2012.     |
| <i>Agrobacterium</i> sp.                             | 1 mM                     | Bajaj, et al., 2012.     |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                       | 1.5 mM                   | Belzile, et al., 2006.   |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2440                     | 1 mM                     | Avendaño, et al., 2016.  |
| <i>Wolinella succinogenes</i>                        | 1 mM                     | Tomei, et al., 2012.     |
| <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>                   | 0.1 mM                   | Tomei, et al., 1999.     |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> AqSCr                   | 500 mM                   | Presente trabajo.        |

## 2.8. Metilación y reducción extracelular.

Los estudios sobre la metilación microbiana del selenio también son escasos. El seleniuro de dimetilo y diseleniuro de dimetilo son las formas metiladas más comunes, ambas son especies volátiles y en ambos casos el selenio se encuentra en su forma totalmente reducida Se(-II). La metilación se lleva a cabo a través de tres enzimas diferentes según el microorganismo; metiltransferasa, trimetil purinametilasa (tpm) y tiopurina metiltransferasa. La metilación es un mecanismo común de eliminación de especies de selenio y otros metales en organismos procariontes, en aplicaciones industriales y ambientales se utiliza principalmente *Rhodocyclus tenuis* y *Rhodospirillum rubrum*, los cuales metilan el selenio (VI) y selenocisteína mientras crecen fotoautotróficamente. Dichos procesos son estudiados como medios sustentables para eliminar selenio de suelos agrícolas contaminados por algunas especies de  $\gamma$ -proteobacteria como *Pseudomonas sp.* La formación de nanopartículas de selenio elemental, principalmente nanoesferas, es un fenómeno que merece una mención especial, debido a las grandes aplicaciones nanotecnológicas que pueden presentar y a la escasa diversidad de microorganismos que las pueden producir, estas tienen aproximadamente el mismo diámetro uniforme y son producidas principalmente en la superficie celular debido a la reducción intrínseca que ocurre en las reductasas membranales y son desprendidas hacia el medio, aunque también se ha observado que pueden producirse en el citoplasma o periplasma celular y ser excretadas hacia el exterior o ser liberadas mediante la lisis celular (Ranjard, et al., 2003).

Otro mecanismo estudiado es el secuestro extracelular de iones metálicos mediante la segregación de polímeros extracelulares o exopolisacáridos (EPS), impidiendo su penetración a la célula protegiéndola de contaminantes ambientales. Este mecanismo lo han presentado diversos tipos de bacterias como *Klebsiella oxitoca*, la cual segrega un gel que puede secuestrar iones de hierro (Ramirez, et al., 2008). La interacción de los polímeros extracelulares con metales está determinado por dos factores importantes: el primero es la especie química del metal, ya que no todos los metales interactúan con el exopolisacárido segregado, incluso cuando se trata de iones del mismo metal, pero con un número de

oxidación distinto. El segundo factor importante es el tipo de ESP secretado, debido a que este puede tener diversas características: puede tratarse de un exopolisacárido formado por grupos funcionales los cuales pueden estar cargados (ácido urónico), lo que puede atraer cationes metálicos y actuar como bioadsorbente, o puede contener grupos funcionales que actúan como agentes quelantes de iones metálicos como hidroxilos, aminos, sulfatos, fosforilos, etc. (Kumar, et al., 2007).

Los polímeros extracelulares son estructuras exclusivas de las bacterias Gram – y están formados por repeticiones de glicopolímeros unidos entre sí a través de enlaces glucosídicos y están anclados a la pared celular por enlaces fosfodiéster entre el ácido N-acetilmurámico y una unión especial formada por N-acetilglucosamina y N-acetilmanosamina. El glucocálix es una capa viscosa amorfa de material extracelular que rodea la célula compuesta de polisacáridos y proteínas, no está unido directamente a la pared celular. La función del exopolisacárido es formar una barrera que pueda proteger a la célula bacteriana de factores ambientales como altas concentraciones de metales, anticuerpos, u otras bacterias, también funciona como adhesivo para la fijación a sustratos formando biopelículas mejorando el intercambio de nutrientes. Los polímeros extracelulares tienen varias aplicaciones comerciales según el tipo de células que los producen, se pueden utilizar para producir agentes gelificantes y biopolímeros. También tiene aplicaciones ambientales en la remoción de metales pesados (Cr, Co, Cd, Ni, Zn, entre otros) en sitios gravemente contaminados, ya que el exopolisacárido puede contener enzimas como las reductasas que contienen contra los iones altamente tóxicos o bien, una vez secuestrados, los iones pueden ser reducidos por moléculas orgánicas secretadas por la célula como tioles (bacillitiol) o sulfuros que pueden promover la reducción y/o precipitación de algunos metales, como el caso de la bioprecipitación del sulfuro de selenio (Naik, et al., 2012).

**Figura 2.** Resumen de las posibles vías de reducción de oxoaniones de selenio por un microorganismo.

### **2.9. Procesos de Biorremediación.**

Se define como biorremediación a cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar a un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. Los microorganismos reductores de metales con altos niveles de tolerancia a los contaminantes han recibido mucha atención en las últimas décadas debido a su gran potencial en la aplicación de procesos de biorremediación y en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados, como una tecnología alternativa, segura y barata en comparación con los métodos fisicoquímicos tradicionales. A diferencia de lo que puede ocurrir con los compuestos orgánicos contaminantes, los metales no pueden ser degradados en condiciones naturales normales y suelen ser muy

recalcitrantes. Las posibilidades para el tratamiento de la contaminación producida por ellos suele limitarse a la inmovilización o la movilización, extrayéndolos de matrices líquidas y sólidas, de tal forma que se busca reducir su biodisponibilidad o su toxicidad (Cruz, et al., 2010).

Los procesos de biorremediación pueden catalogarse como *in situ*, si su aplicación es directamente en el sitio que se desea descontaminar, tales como los sistemas pasivos de remediación entre los cuales podemos encontrar la volatilización, los humedales artificiales y las barreras reactivas permeables (BRP). Los tratamientos *ex situ* se realizan mediante sistemas activos en biorreactores, en donde se coloca la porción de suelo o a la cual se desea remover los metales contaminantes y las células, las cuales pueden encontrarse suspendidas o inmovilizadas (Hocking y Gadd, 2003).

Ya sea a través de la respiración anaeróbica o de los procesos de desintoxicación celular en la mayoría de los microorganismos estudiados, el selenio se reduce formando nanopartículas con una estructura definida en la mayor parte de los casos. Estos mecanismos de reducción han sido el objeto de numerosos estudios para su aplicación en la biorremediación de sitios y aguas residuales contaminadas con oxoaniones de selenio. El uso de métodos microbiológicos es preferible a los métodos fisicoquímicos, porque el proceso de eliminación puede realizarse en condiciones suaves sin la generación de residuos peligrosos o el uso de reactivos costosos (Cruz, et al., 2010).

#### **2.10. Producción de nanopartículas y sus aplicaciones.**

Una nanopartícula o nanomaterial se puede definir como aquel que tiene una de sus tres dimensiones físicas de tamaño menor a los 100 nm. Dependiendo de su naturaleza se habla de nanomateriales metálicos, magnéticos o semiconductores. Los nanomateriales se pueden preparar en gran variedad de formas. Existen nanohilos, nanotubos, nanocintas, nanobarras, nanoplacas, nanohojas, nanoesferas, nanocubos, y en realidad un sinnúmero de formas (Atkins y Palma, 2005).

La preparación de nanopartículas puede llevarse a cabo mediante métodos sintéticos, por ejemplo, por reducción química controlada de sales de metales en presencia de moléculas estabilizadoras, éste es quizá el método químico más popular debido a que aunque llega a ser complicado por las condiciones de presión y temperatura ideales, produce nanopartículas de tamaño y forma homogéneos, además de que se pueden controlar las condiciones de reducción para cambiar la forma de las nanopartículas. Otros métodos químicos pueden ser la catálisis homogénea y heterogénea, la síntesis coloidal, entre otros (Keka, 2011).

Hablando genéricamente de nanopartículas como entidades nanoscópicas independientemente de su forma, una de sus propiedades más importantes, es que presentan un área superficial muy grande por lo que tienen un exceso de energía libre superficial que las hace termodinámicamente inestables. Si se desea que conserven su forma y sus propiedades por un tiempo prolongado, deben ser estabilizadas tanto cinética como termodinámicamente por agentes protectores, los cuales son capaces de superar las fuerzas atractivas de Van der Waals que existen entre las partículas a través de fuerzas repulsivas electrostáticas y estéricas, determinadas por los iones adsorbidos por las nanopartículas y los contraiones asociados. En los procesos de síntesis de nanopartículas, las sustancias que actúan como estabilizadores controlan tanto la velocidad de reducción del o los elementos formadores, así como como el proceso de agregación de los átomos (Atkins y Palma, 2005). Una de las ventajas que se tiene con la preparación microbiológica de nanopartículas, es que estas al ser excretadas por la célula, o al provocar su lisis, quedan recubiertas por los componentes lipídicos de las membranas celulares los cuales proveen un recubrimiento electrostático debido a la carga que confieren éstas moléculas, así como una protección estérica debido al gran tamaño de los componentes membranales (lo cual se puede corroborar mediante un análisis de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) sobre la superficie de las nanopartículas), por lo que son muy estables y no se requiere la adición de estabilizadores sintéticos por lo que la biosíntesis microbiana se considera una vía fácil y amigable ambientalmente (Gonzales, 2016).

Una gran cantidad de microorganismos tiene la capacidad de transformar las distintas especies químicas de selenio altamente contaminantes en selenio elemental, no soluble y por lo tanto no contaminante al no estar biodisponible, esta técnica de inmovilización de elementos contaminantes también se puede aplicar en el reciclado de éste y otros elementos mitigando su toxicidad y produciendo formas nutricionales y tecnológicamente útiles como las nanopartículas. Cabe destacar que para que un microorganismo sea considerado para la biosíntesis de nanopartículas, estas deben presentar cierta homogeneidad en su forma y tamaño. En los últimos años se ha encontrado un sinnúmero de aplicaciones para las nanopartículas de selenio útiles en una amplia gama de disciplinas, por ejemplo, en la industria fotovoltaica y de semiconductores debido a sus particulares propiedades ópticas, presentan el efecto fotoeléctrico y una gran área superficial. Aplicaciones en medicina ya que no provocan rechazo por gran parte de los tejidos biológicos y presentan una baja toxicidad, también muestran una alta actividad antibiótica contra microorganismos que han adquirido resistencia a otro tipo de antibióticos comerciales, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Así como agentes antioxidantes quimio-preventivos y terapéuticos, por su gran actividad antioxidante por la facilidad que muestran para la captación de radicales libres (Atkins y Palma, 2005).



### 3. ANTECEDENTES.

Este proyecto se encuentra enfocado en el estudio de la reducción de oxoaniones de selenio por la cepa del microorganismo autóctono *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, aislada a partir de una muestra de agua tomada de un acuífero situado aproximadamente a 30 metros de profundidad, en un sitio gravemente contaminado por cromatos Cr(VI) localizado en la localidad de San Francisco del Rincón, Gto. La cepa se aisló en el Instituto de Biotecnología (UNAM) en el laboratorio de la Dra. Katy Juárez López, de la muestra de agua se obtuvo una gran diversidad de tipos morfológicos, pero se observó un tipo dominante. El tipo celular con la morfología dominante se aisló mediante varias resiembras de colonias en medios de cultivo sólido NBAF enriquecido con Cr(VI), para favorecer el crecimiento de los microorganismos resistentes a este metal y fue denominado AqSCr (Lara, 2016).

Esta cepa, se identificó mediante la secuenciación de los genes rRNA 16S, gyrA, rpoB y parC como *Klebsiella pneumoniae*. También se realizaron experimentos de concentración mínima inhibitoria de distintos metales contaminantes (Lara, 2016).

**Tabla 2.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) para *Klebsiella pneumoniae* AqSCr para distintos metales (Lara, 2016).

| Metal            | MIC                |
|------------------|--------------------|
| Co <sup>2+</sup> | > 4 mM, < 5 mM     |
| Zn <sup>2+</sup> | > 7 mM, < 8 mM     |
| Cu <sup>2+</sup> | > 8 mM, < 9 mM     |
| Ag <sup>+</sup>  | > 0.5 mM, < 0.6 mM |
| Cr <sup>6+</sup> | > 6 mM, < 7 mM     |
| Al <sup>3+</sup> | > 7 mM, < 8 mM     |
| Ni <sup>2+</sup> | > 8 mM, < 9 mM     |
| Se <sup>6+</sup> | > 800 mM           |
| As <sup>6+</sup> | > 500 mM, < 600 mM |
| As <sup>3+</sup> | > 10 mM, < 11 mM   |
| Cd <sup>2+</sup> | > 3 mM, < 4 mM     |
| Pd <sup>2+</sup> | > 2 mM, < 3 mM     |
| U <sup>6+</sup>  | > 5 mM, < 10 mM    |

Se decidió trabajar con selenio debido a que ya se habían realizado experimentos con la mayor parte de los metales, además de la importancia biotecnológica que representa la biosíntesis de nanopartículas de selenio.

Con la finalidad de localizar los genes involucrados en el proceso de resistencia a los oxoaniones de selenio, la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr fue secuenciada y se buscaron genes que codificaran enzimas selenoreductasas previamente reportadas de especies filogenéticamente cercanas, en el mapa genético de la cepa aislada de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, al no encontrar genes putativos a los que codifican selenoproteínas en otras especies de microorganismos, se construyeron tres cepas mutantes, mediante un proceso de mutagénesis dirigida al gen que se desea deletar, donde se reemplazó una región cromosomal por un transposón que contenía el gen de resistencia al antibiótico kanamicina mediante mecanismos de recombinación homóloga, para poder seleccionar las células transformantes. Se suprimieron genes que codifican enzimas reductasas para otras especies de oxoaniones, con la finalidad de comprobar si estos genes contribuyen a los procesos de resistencia de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr a los oxoaniones de selenio, observando los cambios fenotípicos (inhibición del crecimiento) al ser expuestas a distintas concentraciones de sales disódicas de selenio (Lara, 2016).

**Tabla 3.** Mutantes construidas sobre reductasas para determinar su contribución sobre la reducción de oxoaniones de selenio.

| Mutante | Gen deletado (cepa)                               | Funcionalidad del gen deletado |
|---------|---|--------------------------------|
| 1       | Kpn ChroAq1 2917- KmR                             | Nitrato reductasa              |
| 2       | Kpn ChroAq1 Ars1- Ars2-Ars3- Ars4- KmR            | Arsenato reductasa             |
| 3       | Kpn ChroAq1 396- 2917- 2615- 4253- 266- Ars1- KmR | Mutante para ambas reductasas  |

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

Los microorganismos nativos de zonas contaminadas con altas concentraciones de metales pesados, como resultado de su adaptación al medio, presentan la capacidad de tolerar y reducir las especies altamente contaminantes como pueden ser iones de Cr, Se, As, entre otras. Ya que poseen mecanismos para contender con las altas concentraciones de iones metálicos. La importancia del estudio de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, una cepa aislada de un acuífero altamente contaminado por Cr(VI) radica en las múltiples aplicaciones ambientales, como lo son la destoxificación de aguas y suelos contaminados. Adicionalmente, se ha observado que algunos microorganismos reductores de selenio, pueden producir además nanopartículas de selenio elemental, las cuales tienen una amplia gama de aplicaciones tecnológicamente útiles.

#### **5. HIPÓTESIS.**

La cepa de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, presenta uno o varios mecanismos de resistencia a altas concentraciones de selenio (IV) y (VI). Adicionalmente, dicho microorganismo es capaz de producir nanopartículas de selenio elemental.

#### **6. OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar los mecanismos de reducción y resistencia a oxoaniones de selenio en la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, así como la posible producción de nanopartículas de selenio elemental.

#### **7. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Trazar curvas de crecimiento en condiciones aerobias y anaerobias para elegir las condiciones experimentales idóneas, así como para conocer los perfiles de crecimiento del microorganismo *Klebsiella pneumoniae* AqSCr.
- Determinar la tolerancia máxima de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr a los oxoaniones de selenio mediante el trazado de curvas de crecimiento (MIC) en medios de cultivo enriquecido con distintas concentraciones de sales de selenio (IV) y (VI), en condiciones aerobias y anaerobias.

- Comparar las curvas de crecimiento en condiciones normales de la cepa silvestre con las de las cepas mutantes de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en las cuales se deletaron genes que codificaban distintos tipos de reductasas, con la finalidad de observar si estas mutantes presentaban afectaciones en su crecimiento.
- Determinar el comportamiento de las cepas mutantes de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en presencia de oxoaniones de selenio con la finalidad de observar si existe crecimiento y reducción por parte de estas.
- Comprobar la viabilidad de las células microbianas durante el proceso de crecimiento en presencia de oxoaniones de selenio mediante un experimento de cuenta viable.
- Determinar los sitios de reducción de selenio, el estado de las células microbianas durante este proceso, así como determinar la formación de nanopartículas de selenio elemental mediante análisis de microscopía óptica, de fluorescencia y de transmisión electrónica (TEM).

## **8. METODOLOGÍA.**

### **8.1. Generalidades de la cepa utilizada.**

En este trabajo se utilizó la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr y sus derivadas mutantes, las cuales se muestran en la tabla 1. Esta bacteria es un bacilo Gram –, conocido durante muchos años como bacilo de Friedländer. Se caracteriza principalmente por su prominente capsula de polisacáridos. El género *Klebsiella* está compuesto por 12 especies, de las cuales aproximadamente 5 presentan un riesgo para la salud humana dependiendo del exopolisacárido capsular o antígeno K secretado. Este grupo de bacterias son ubicuas en la naturaleza es decir, se encuentran en casi cualquier ambiente, al pertenecer a la familia de las enterobacterias forman parte de la microbiota intestinal (coliformes) de los organismos de sangre caliente, es por eso que su crecimiento óptimo se presenta a los 37° C. Su función principal en los ecosistemas es la fijación de nitrógeno atmosférico (González, et al., 2013).

## **8.2. Medios de cultivo.**

### **8.2.1. Medios de cultivo aerobios.**

Debido a que la cepa utilizada se caracteriza como un microorganismo facultativo, es decir, puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno, se decidió desarrollar la estrategia experimental en ambas condiciones. Para los experimentos en condiciones aeróbicas se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) en sus presentaciones líquido y sólido. La composición de éste medio en su presentación líquida es: (Cortés, et al., 2002)

- 10 g de peptona
- 5 g de extracto de levadura
- 5 g de NaCl

Dichas cantidades se utilizaron para preparar un litro de medio de cultivo LB, los componentes se disuelven en 1 L de agua grado Milli-Q, para la presentación sólida del medio de cultivo LB se utilizaron los mismos componentes, una vez disueltos se agregaron 12 g de agar y ambos medios se sometieron a un ciclo de esterilización en autoclave a una temperatura de 120 °C durante 20 min. Para el cultivo de las cepas mutantes se utilizó el medio de cultivo LB sólido al cual se le adicionó 250 µL de una solución de sulfato de kanamicina a una concentración de 30 µg/mL previamente esterilizada por filtración. La solución de kanamicina se adicionó después de que el medio se esterilizó, al encontrarse a temperatura ambiente se adicionó la solución de kanamicina, se agitó perfectamente y se dejó solidificar en una campana de flujo laminar para evitar contaminación. Los medios de cultivo aerobios sólidos y líquidos enriquecidos con selenato y selenito de sodio se prepararon de la misma manera. Para la presentación líquida la cantidad de la sal de selenio correspondiente, previamente pesada, se adicionó después de que el medio se esterilizó, al encontrarse a temperatura ambiente se adiciono la sal disódica de selenio y se agitó vigorosamente hasta que se disolvió totalmente. Para la presentación sólida se preparó el medio de cultivo de la manera antes mencionada y después del proceso de esterilización, al encontrarse a temperatura ambiente se le adiciono la cantidad de sal de selenio correspondiente y se agitó vigorosamente hasta la total disolución, posteriormente se vació

en cajas de Petri y se dejó solidificar en una campana de flujo laminar. Se debe tener especial cuidado en la preparación de ambos medios al adicionar las sales de selenio, ya que si el medio de cultivo se encuentra caliente el selenio puede reducirse cambiando su concentración disponible en el medio.

### **8.2.2. Medios de cultivo anaerobios.**

Para los experimentos realizados en condiciones de anaerobiosis se utilizó el medio de cultivo citrato de sodio, el cual contiene: (Lara, 2016)

- 15.14 g/L de citrato de sodio dihidratado ( $\text{HO}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 2.5 g/L de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
- 1.5 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 0.1 g/L de cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )
- 0.06 g/L de fosfato monosódico hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- 1.8 g/L de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )

Se disolvieron las sales anteriormente mencionadas en 1 L de agua grado Milli-Q y la solución se repartió en tubos de ensayo, a cada tubo se le agregó 5 mL del medio de cultivo y se taparon con un tapón de hule, posteriormente por medio de una cánula conectada a un sistema de gaseo se burbujeó una mezcla de nitrógeno/dióxido de carbono en una proporción 80:20 durante 4 min para desplazar el oxígeno del medio de cultivo asegurando así la anaerobiosis total. Una vez terminado el burbujeo se saca la cánula y se tapa el tubo en un solo movimiento, todos los tubos se sellaron con un seguro de aluminio. Una vez bien sellados los tubos se sometieron a un ciclo de esterilización en autoclave a una temperatura de 120 °C durante 20 min. Los medios de cultivo anaerobios enriquecidos con selenio se prepararon de la misma manera anteriormente descrita y el selenio se les adicionó después de la esterilización la cantidad correspondiente con ayuda de una jeringa y a partir de una solución de la sal respectiva de selenio con una concentración de 2.5 M previamente esterilizada por filtración.

### **8.3. Preparación de preinóculos.**

Para la inoculación de los medios de cultivo se prepararon preinóculos tanto aerobios como anaerobios, a partir de la cepa preservada en glicerol 20 % a una temperatura de -65 °C, esta preparación se realiza con la finalidad de favorecer la reactivación de la cepa y mejorar su adaptación al medio y en el caso de los preinóculos anaeróbicos, para eliminar las trazas de oxígeno presente en el medio. Con una asa microbiológica, se tomó una pequeña muestra de la cepa y se estrió una caja de Petri con medio LB sólido y se incubó a 30 °C hasta que se observó el crecimiento de colonias aisladas. Para preparar el preinóculo en condiciones aeróbicas se tomó una colonia aislada del medio de cultivo sólido y se suspendió en 3 mL de medio LB líquido, el preinóculo se incubó a una temperatura de 30 °C y con una agitación de 200 rpm durante 15 h.

El preinóculo para los experimentos en anaerobiosis se preparó tomando una colonia aislada de la cepa crecida en medio LB sólido y se suspendió en 1 mL de medio activador GYT (glicerol-extracto de levadura-triptona), posteriormente uno de los medios de cultivo anaerobios citrato de sodio ya estériles se enriqueció con 100 µL de una solución de cas-aminoácidos al 0.2 % con ayuda de una jeringa estéril, posteriormente se inyectaron 100 µL de la cepa suspendida en medio activador GYT y se incubó a 30 °C sin agitación durante 15 h. Antes de realizar cada adición a los medios de cultivo se esterilizó el tapón de cada tubo con etanol para evitar cualquier tipo de contaminación.

Para asegurar la eliminación total del oxígeno del medio, se realizó la misma técnica anteriormente descrita pero en vez de inyectar la cepa suspendida en medio GYT, se inyectaron 100 µL del preinóculo anteriormente preparado incubándose nuevamente a 30°C sin agitación durante 15 h, a partir de éste segundo preinóculo se inocularon los medios de cultivo anaerobios.

#### **8.4. Curvas de crecimiento.**

Con la finalidad de conocer el perfil de crecimiento del microorganismo *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en condiciones normales aerobias y anaerobias, se trazaron curvas de crecimiento en ambas condiciones. Para el trazado de éstas curvas en condiciones aerobias, se inocularon 3 tubos que contenían 3 mL de medio de cultivo LB líquido, con 100  $\mu$ L de preinoculo aeróbico cada uno a una absorbancia inicial de 0.02 ( $\lambda = 600$  nm), posteriormente se midió la densidad celular de cada uno de los tubos, mediante un espectrofotómetro con un aditamento que permitió medir la absorbancia directamente del tubo sin que este tuviera que ser abierto. Los tubos se incubaron a una temperatura de 30°C y con una agitación de 200 rpm. Cuando la absorbancia llegaba a un valor mayor o igual a la unidad, se realizaron diluciones del medio para poder tener resultados más consistentes con la ley de Lambert y Beer. Se tomaron medidas de la absorbancia a partir de la inoculación de los medios de cultivo y cada 5 h aproximadamente. Como blanco se utilizó un tubo con medio de cultivo LB líquido sin inocular y un control microbiológico que constaba de un tubo con medio LB sin inóculo con la finalidad de comprobar que no se produjera ningún tipo de contaminación durante el procedimiento experimental.

Para el trazado de las curvas de crecimiento anaerobias se siguió el mismo procedimiento anteriormente mencionado pero la inoculación se realizó a partir del segundo preinóculo preparado, a cada tubo se inyectaron 100  $\mu$ L de cas-aminoácidos y 100  $\mu$ L de preinóculo. Los tubos se incubaron a una temperatura de 30 °C sin agitación y las medidas de absorbancia se tomaron de igual manera. Como blanco se utilizó un tubo de medio de cultivo con cas-aminoácidos pero sin inocular, se preparó también un tubo control con medio de cultivo y cas-aminoácidos sin inóculo que sirvió como control microbiológico.

#### **8.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en oxoaniones de selenio.**

Una vez obtenidos los perfiles de crecimiento normal en condiciones aerobias y anaerobias, se procedió a trazar curvas de crecimiento en presencia de oxoaniones de selenio para comprobar su resistencia y la reducción de éste elemento. Para el trazado de estas curvas



en condiciones aerobias, experimento realizado por triplicado, a cada uno de los tubos de ensayo con 3 mL de medio de cultivo LB, se le adicionó la cantidad correspondiente de sal de selenato o selenito de sodio para preparar medios con una concentración de 100, 300, 600, 700 y 800 mM de selenato de sodio y medios con una concentración de 500, 600, 700 y 800 mM de selenito de sodio y se agitó hasta que la sal estuvo bien disuelta, esta adición se realizó en la campana de flujo laminar, posteriormente se inoculó cada medio de cultivo con 100  $\mu$ L de preinóculo a una absorbancia inicial de 0.02 ( $\lambda = 600$  nm) y los tubos se incubaron a 30 °C con una agitación de 200 rpm. Se preparó un tubo con medio de cultivo como control microbiológico, y se realizaron medidas de absorbancia a partir de la inoculación y cada 5 h aproximadamente.

Para el trazado de las curvas en condiciones anaerobias, experimento que también se realizó por triplicado, primero se esterilizó el tapón de cada uno de los tubos con etanol, posteriormente a todos los tubos se le adicionó 100  $\mu$ L de solución de cas-aminoácidos al 0.2 % y se inyectó la cantidad correspondiente de una solución de selenato o selenito de sodio, según el caso, con una concentración de 2.5 M previamente esterilizada y desoxigenada, para preparar medios con una concentración de 50, 100, 200, 300 400 y 500 mM de selenato de sodio y medios con una concentración de 10, 20, 40, 50, 60 y 80 mM de selenito de sodio, se agitaron vigorosamente y se adicionaron 100  $\mu$ L de preinóculo anaerobio. Los tubos se inocularon a 30 °C y sin agitación. Se preparó un tubo con medio de cultivo y cas-aminoácidos como control microbiológico y se midió la absorbancia de cada uno de los tubos a una longitud de onda de 600 nm, a partir de la inoculación y cada 5 h aproximadamente. En ambos experimentos se utilizaron como blanco tubos con medios de cultivo sin inocular.

#### **8.6. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes.**

Se seleccionaron 3 cepas de un banco de cepas mutantes en las cuales se habían deletado distintos genes que codificaban para reductasas (distintas a las selenoreductasas), para comprobar que las cepas mutantes no tenían afectaciones en el crecimiento debido a los genes deletados y por consiguiente comprobar que estos genes participaban o no en los

procesos de detoxificación de selenio en cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr; se decidió trazar curvas de crecimiento aerobias en condiciones normales de la cepa silvestre y las mutantes, si las curvas de crecimiento de las cepas mutantes no presentaban comportamientos diferentes a la cepa silvestre, se podría concluir que no tenían afectaciones en el crecimiento en condiciones normales y se podrían comparar sus crecimientos en presencia de selenio. Para medir el crecimiento de la cepa silvestre, se preparó un preinóculo a partir de la cepa preservada en glicerol como se explicó anteriormente. Con este preinóculo se inoculó por triplicado, tubos con 3 mL de medio LB líquido cada uno a una absorbancia inicial de 0.02 ( $\lambda = 600$  nm) y se midió la absorbancia a partir de la inoculación y cada 5 horas aproximadamente. Para preparar el preinóculo de las cepas mutantes, primero se hicieron cultivos de dichas cepas en medio LB-kanamicina sólido (para promover el crecimiento de las células transformantes con el gen de resistencia), a partir de las cepas preservadas en glicerol y se incubaron a una temperatura de 30 °C, una vez que se tuvieron colonias aisladas, se tomó una colonia y se preparó el preinóculo de la manera mencionada anteriormente, igualmente se inocularon tubos por triplicado y las mediciones y condiciones de incubación se realizaron exactamente del mismo modo que con la cepa silvestre.

#### **8.7. Crecimiento de las cepas mutantes en presencia de oxoaniones de selenio.**

Para observar los patrones de crecimiento de las cepas mutantes en presencia de oxoaniones de selenio, se decidió realizar el experimento en condiciones aerobias y se seleccionó una concentración alta de ambas sales de selenio en las cuales no se observara distorsión en la forma de la curva de crecimiento microbiano. Dichas concentraciones fueron 100 mM para selenio (IV) y 700 mM para Se (VI). Se prepararon por triplicado tubos de ensayo con 3 mL de medio LB líquido, se pesó la cantidad necesaria de la respectiva sal de selenio para obtener las concentraciones antes mencionadas, y se le adicionó al medio de cultivo líquido, se agitaron hasta que la sal se disolvió totalmente. Los tubos se inocularon con un preinóculo aerobio (preparación mencionada en el punto 8.2.1.) a una absorbancia inicial de 0.02 ( $\lambda = 600$  nm) y se midió la absorbancia a partir de la inoculación

y cada 5 h aproximadamente. Dicho procedimiento se realizó para cada una de las cepas mutantes y la cepa silvestre como referencia, para ambas sales de selenio.

#### **8.8. Cuenta viable.**

Se realizaron experimentos de cuenta viable como una medida indirecta para conocer el estado de las células durante el crecimiento microbiano en presencia de los oxoaniones de selenio. Para realizar éste experimento se inocularon 20 mL de medio LB líquido en medio aerobio enriquecido con selenato de sodio y selenito de sodio respectivamente, el experimento se realizó por triplicado y para dos concentraciones distintas de las sales de selenio, 100 y 500 mM, ya que en ambas se observa crecimiento microbiano sin distorsión aparente de la respectiva curva de crecimiento. Se incubaron los medios de cultivo a una temperatura de 30 °C y con agitación a 200 rpm, a partir de la inoculación y cada 5 h, se tomaba una muestra de 100 µL del medio de cultivo y se realizaron diluciones seriadas hasta una concentración de  $10^{-12}$  aproximadamente para poder observar colonias bien definidas. Se colocó una gota de 10 µL de cada dilución sobre una placa de medio LB sólido y se dejó secar, posteriormente las cajas se incubaron a 30°C durante 24 h y se contabilizaron las unidades formadoras de colonia (UFCs) en cada una de las diluciones, el experimento se realizó también en un medio de cultivo sin adicionar sales de selenio como marco de referencia.

#### **8.9. Microscopía óptica.**

Como parte de un estudio previo a microscopias más complejas, se sometieron muestras de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr crecida en presencia de oxoaniones de selenio a un análisis de microscopía óptica, con la finalidad de observar el estado de las células así como los cambios morfológicos que estas presentaban después del proceso de reducción de selenio. Se tomó una muestra de 10 µL de medio de cultivo enriquecido con selenio e inoculado con la cepa, después de haber sido incubado por 5 días. La muestra se depositó sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se analizó en un microscopio óptico OLYMPUS IX3 con un objetivo de 100 X de inmersión en aceite.

#### **8.10. Microscopía de fluorescencia.**

Se realizó un análisis de microscopía de fluorescencia de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr crecida en presencia de oxoaniones de selenio con la finalidad de observar la morfología de las membranas celulares al término del proceso de reducción del selenio. Para realizar este análisis se tomó una muestra de 10  $\mu$ L de medio de cultivo enriquecido con selenio e inoculado con la cepa, después de haber sido incubado por 5 días y se fijó con calor a un portaobjetos, se le adicionaron 5  $\mu$ L de reactivo FM 4-64FX de la línea de pigmentos FM<sup>®</sup> de Thermo Fisher Scientific, el cual debido a sus componentes lipofílicos se adhiere a la bicapa lipídica de las membranas celulares haciéndolas visibles en un campo de fluorescencia en el rango del infrarrojo. Se deja reposar durante 20 min y después se lava el exceso de pigmento con agua grado Milli-Q fría. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia de la línea EVOS FL de Thermo Fisher Scientific a una longitud de onda de excitación de 560 nm.

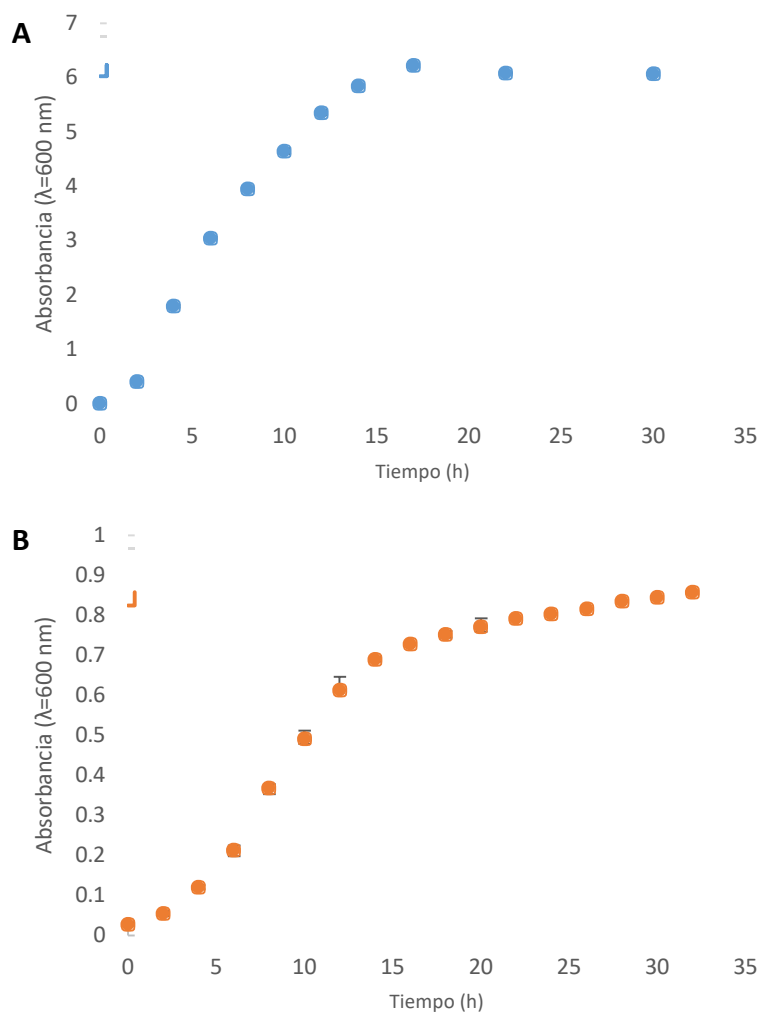
#### **8.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).**

Para realizar los análisis de microscopía electrónica de transmisión se utilizaron medios de cultivo LB sólido enriquecido con distintas concentraciones de selenato de sodio, al concluir los 5 días de incubación a 30 °C, se separaron las muestras para análisis fijando una pequeña cantidad de muestra a una rejilla de soporte compuesta por carbono y cobre con paraformaldehído al 4 % y glutaraldehído al 2.5 %. Las muestras fueron examinadas en un microscopio de transmisión electrónica Zeiss LIBRA 120n a 120 kV en la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) del Instituto de Biotecnología (UNAM).

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 9.1. Curvas de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr.

El primer paso de la estrategia experimental fue la caracterización de la cinética de crecimiento de la cepa silvestre *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en los medios de cultivo seleccionados, con la finalidad de trazar curvas que reflejaran la cinética del crecimiento microbiano. Esta determinación también sirvió para elegir las condiciones en las que la bacteria presentaba un mayor crecimiento.



**Figura 3.** Curvas de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en condiciones aerobias (A) y en condiciones anaerobias (B). En condiciones aerobias se utilizó el medio de cultivo LB, mientras que en condiciones anaerobias se utilizó el medio de cultivo citrato de sodio.

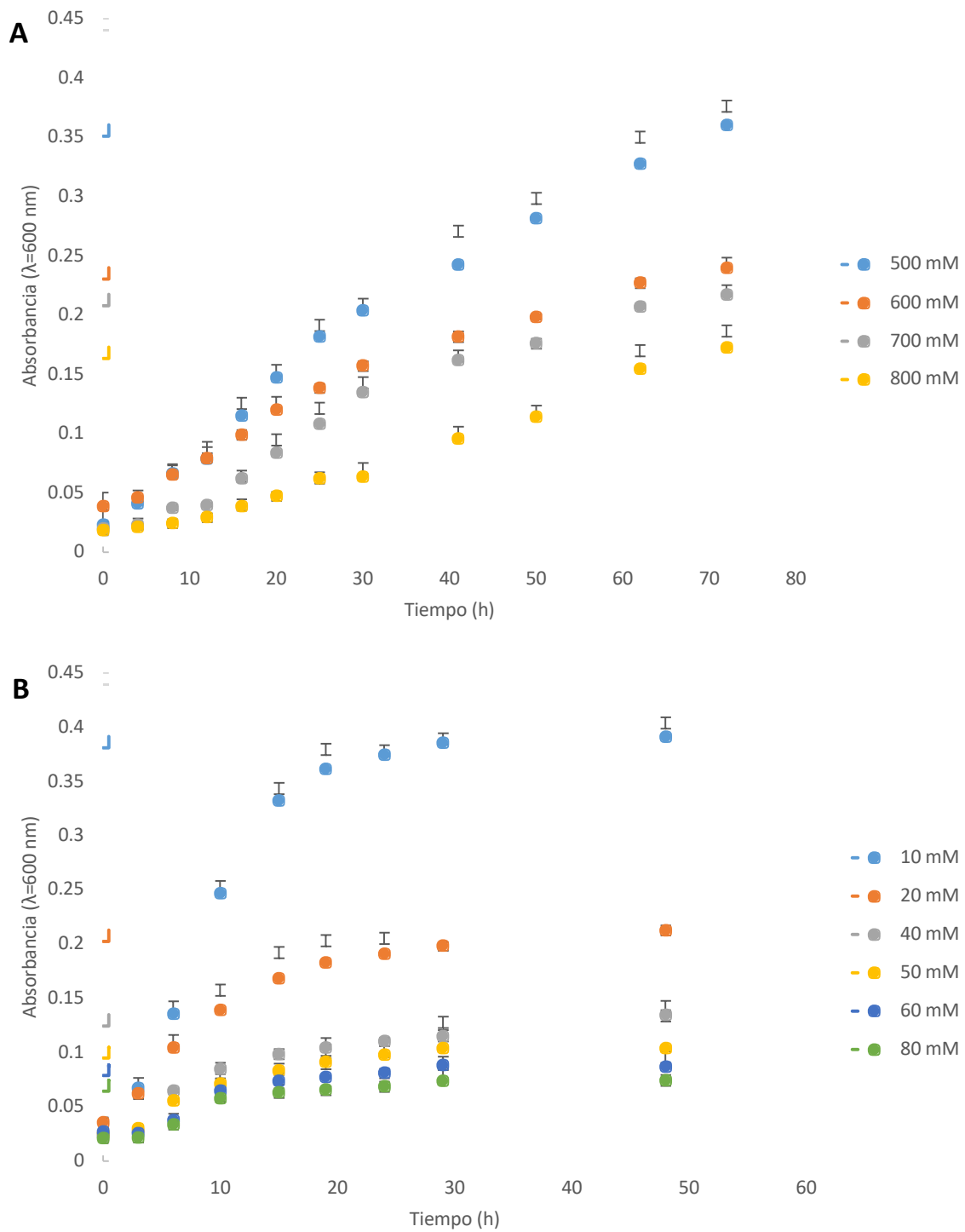
Como se observa en la figura 3, el microorganismo *Klebsiella pneumoniae* AqSCr presenta un mayor crecimiento en condiciones aerobias, lo cual se ve reflejado en la densidad óptica máxima que alcanza la curva, aproximadamente 6 unidades de absorbancia (valor determinado mediante diluciones del medio de cultivo), mientras que la curva que representa el crecimiento en condiciones anaerobias apenas alcanza la unidad de absorbancia. Podemos observar que la curva que representa el crecimiento microbiano en ambos casos es consistente al crecimiento normal, es decir no presenta más de una fases de crecimiento o más de una fase estacionaria, por lo que podemos concluir que los medios de cultivo elegidos son adecuados para realizar el estudio. Los resultados obtenidos son consistentes con el comportamiento de los organismos facultativos a los cuales pertenece el género *Klebsiella*, su crecimiento se ve favorecido en condiciones aerobias aunque en la naturaleza se puede encontrar en sitios anóxicos como en los cuerpos de agua subterráneos.

## **9.2. Concentración mínima inhibitoria de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr a oxoaniones de selenio.**

Como se mencionó anteriormente se observó que el microorganismo *K. pneumoniae* AqSCr presenta un mayor crecimiento en condiciones aerobias, sin embargo, se decidió hacer pruebas de crecimiento en condiciones anaerobias y en presencia de oxoaniones de selenio para conocer la tolerancia máxima del microorganismo bajo estas condiciones, además de comprobar si el microorganismo estudiado expresaba la ruta metabólica que permite la reducción del selenio (IV) y (VI) en ausencia de oxígeno como la que presenta el microorganismo *Desulfovibrio desulfuricans* (Tomei, et al., 2012).

Las curvas mostradas en las figuras 4 a 7, nos muestran el comportamiento de la cepa *K. pneumoniae* AqSCr en presencia de oxoaniones de selenio. Primero se realizó el experimento con una sal de Se (IV), selenito de sodio, en condiciones aerobias y anaerobias (Figura 4). Como comportamiento general en las cuatro curvas, observamos que a mayor concentración de la sal de selenio correspondiente, el crecimiento se ve más inhibido. La concentración mínima inhibitoria en cada caso fue determinada como aquella en la que la

que la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm, alcanzara un valor de absorbancia de 0.2. En condiciones aerobias podemos observar que la concentración mínima inhibitoria es de 500 mM de selenito de sodio, mientras que para las condiciones anaerobias la concentración mínima inhibitoria es de 20 mM de selenito de sodio. En la gráfica A podemos observar que la fase de crecimiento exponencial en todos los casos termina aproximadamente a las 30 h de incubación, después en la fase estacionaria se puede observar un incremento en la densidad óptica con una pendiente notoriamente menor, dicho comportamiento se debe a que comienza la precipitación del selenio elemental sólido en el medio de cultivo, el cual causa una turbidez color rojiza tal como se reporta en los experimentos de reducción microbiana por otros microorganismos (Gonzales, et al., 2016), este comportamiento de las curvas de crecimiento nos brinda información del proceso de reducción, la aparición del precipitado de selenio elemental durante la fase estacionaria nos indica que la reducción de oxoaniones de selenio es realizado después de terminar el proceso de crecimiento celular, por lo que se trata de un proceso enzimático que no está asociado al crecimiento, la expresión de las enzimas involucradas posiblemente es inducida por la presencia de oxoaniones de selenio en el medio por lo que su efecto se observa hasta el término del crecimiento celular. En cuanto a la curva B no se aprecia este proceso, al terminar la etapa de crecimiento logarítmico, se ve que la fase estacionaria se prolonga sin observarse incremento en la densidad óptica, lo cual indica que la cantidad de selenio reducido en el medio, se mantiene constante, lo cual nos da indicios de que el proceso de reducción del Se(IV) puede llevarse a cabo durante el proceso de crecimiento microbiano, pero una vez que termina este proceso, la célula muere debido a la alta toxicidad de este, al no aumentar la turbidez del medio, dicha hipótesis puede corroborarse con un ensayo de viabilidad celular después de terminar el proceso de crecimiento celular en presencia de oxoaniones de selenio. La tonalidad rojiza menos intensa que en el caso anterior (Figura 7), lo cual indica que la reducción de selenio es menor en estas condiciones. Aunque se requiere de un método analítico para realizar un seguimiento de la cinética de las especies de selenio en el medio para corroborar la identidad de los procesos de reducción involucrados.



**Figura 4.** Curvas de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B) a distintas concentraciones de selenito de sodio, Se(IV). Es importante observar que para el crecimiento de la cepa en condiciones anaerobias se utilizaron concentraciones de selenio 10 veces menores aproximadamente a las que se utilizaron en condiciones aerobias.

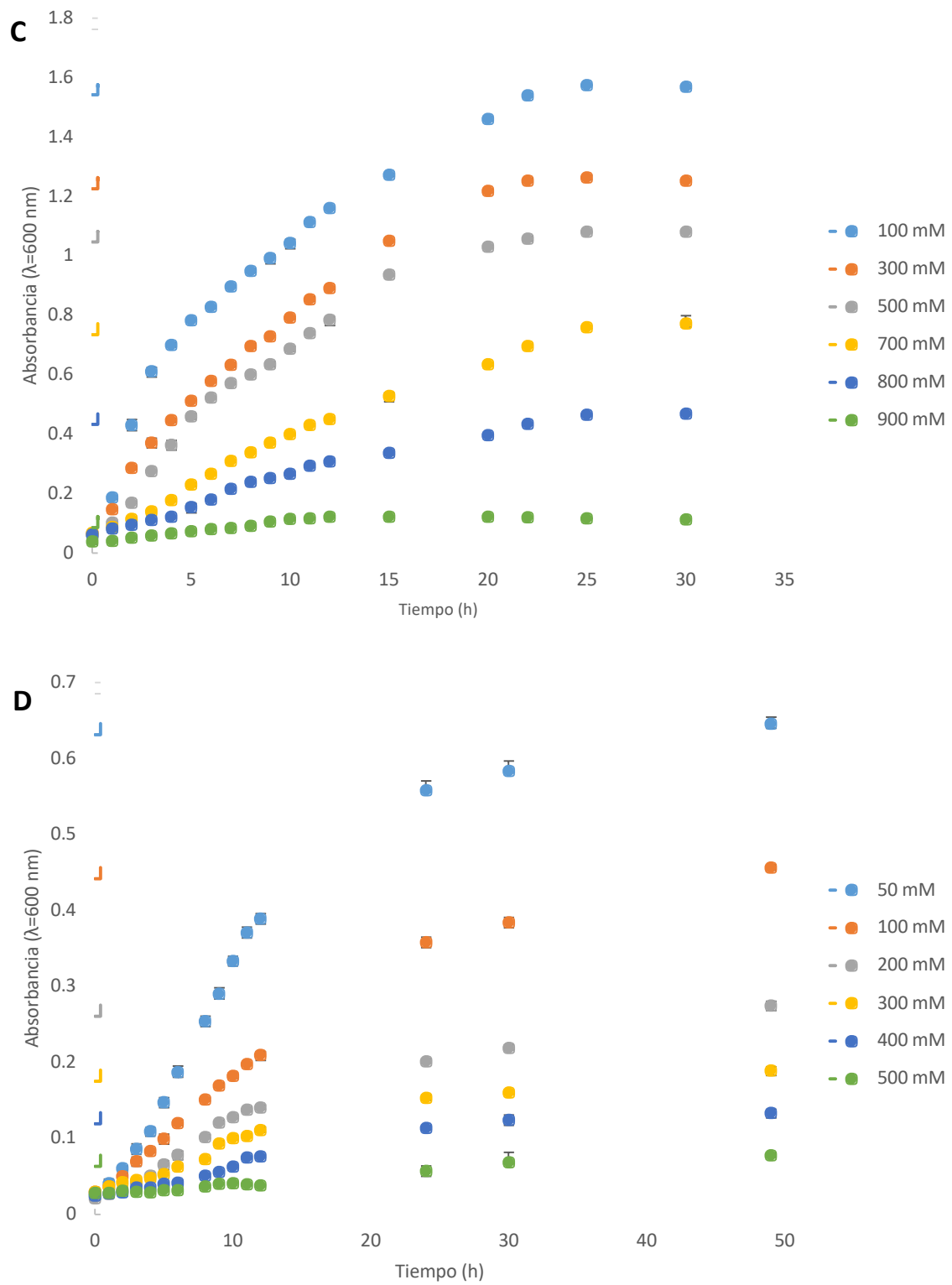


**A**

**B**

Ctrol. de E. 800 mM 700 mM 600 mM 500 mM 10 mM 20 mM 40 mM 50 mM 60 mM 80 mM

**Figura 5.** Tubos con medios de cultivo al término del trazado de las curvas en condiciones aerobias **A** y anaerobias **B**. Cada tubo está marcado con la concentración de selenito de sodio correspondiente. Se puede notar en ambos casos la coloración rojo tenue que resulta de la precipitación del selenio reducido, y como va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de selenito de sodio, debido a que a altas concentraciones de oxoaniones de selenio aumenta la toxicidad del medio y las células mueren antes de completar el proceso de reducción. Es mas evidente la coloración rojiza en los medios de cultivo de citrato de sodio (anaerobios) por ser totalmente transparentes, mientras que el medio LB presenta una coloracion amarillenta. También se observa una mayor turbidez que resulta de un mayor crecimiento microbiano del experimento en condiciones aerobias que en las condiciones anaerobias.



**Figura 6.** Curvas de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en condiciones aerobias (C) y anaerobias (D) a distintas concentraciones de selenato de sodio, Se(VI).

Podemos observar que las curvas con selenato de sodio (figura 6) muestran un comportamiento similar al observado en las curvas con selenito de sodio (figura 4), aunque se logra observar claramente que las curvas con Se(VI), en condiciones aerobias y anaerobias, alcanzan una densidad óptica mucho mayor que las medidas con Se(IV). En condiciones aerobias podemos observar que la concentración mínima inhibitoria es de 800 mM de selenito de sodio, mientras que para las condiciones anaerobias la concentración mínima inhibitoria es de 100 mM de selenato de sodio, es evidente que el crecimiento microbiano es considerablemente mayor en presencia de Se(VI), con lo cual podemos asegurar que el Se(IV) es mucho más tóxico para la cepa microbiana *Klebsiella pneumoniae* AqSCr que el Se(VI), dicho patrón de toxicidad a oxoaniones de selenio se ha reportado anteriormente para otros microorganismos como *Pseudomonas stutzeri* (Lortie, et al., 1992), *Enterobacter cloacae* y *Thauera selenatis* (Abdurrahman, et al., 2016). A diferencia de las curvas que se muestran en la figura 4, se puede observar en la figura 6 que en ambas condiciones de oxigenación, después de la fase logarítmica de crecimiento microbiano, la curva sigue un incremento en la correspondiente fase estacionaria, es la mayoría de los casos, lo cual es prueba de que después de terminar la fase de crecimiento, una gran parte de las células se encuentran en condiciones viables para perpetuar la reducción del Se(VI), un indicio más de que el Se(VI) es menos tóxico para nuestra cepa de trabajo que el Se(IV).

**C**

**B**

Ctrl. 100 mM 300 mM 500 mM 700 mM 800 mM      50 mM 100 mM 200 mM 300 mM 400 mM 500 mM

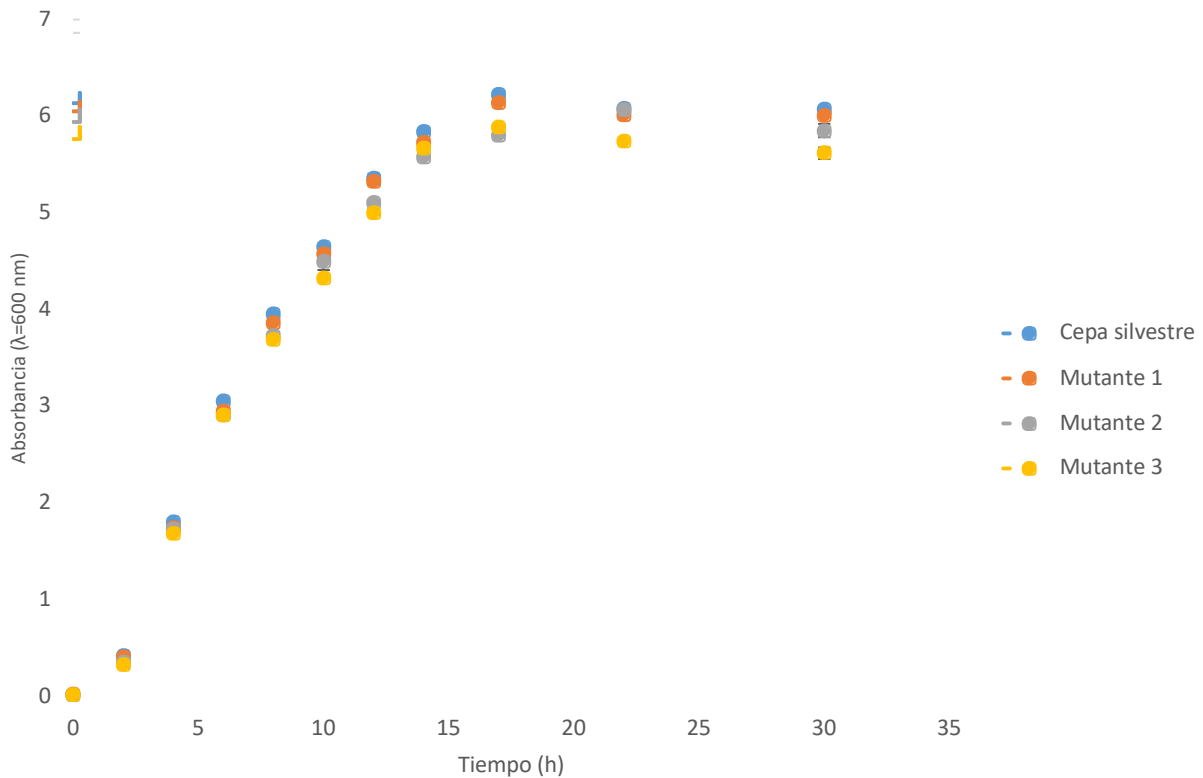
**Figura 7.** Tubos con medios de cultivo al término del trazado de las curvas en condiciones aerobias **A** y anaerobias **B**. Cada tubo está marcado con la concentración de selenato de sodio correspondiente. Se puede notar en ambos casos la coloración rojiza es este caso considerablemente más intensa que con Se(IV) que resulta de la reducción del selenio, y como va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de selenito de sodio, también es evidente que la coloración rojiza es más intensa en los cultivos aerobios, que en los anaerobios, por lo que podemos inferir que en las condiciones aerobias se lleva a cabo mayor reducción de Se(VI), condición ideal para la aplicación de la cepa en los procesos de biorremediación *in situ*.

**Figura 8.** Acercamiento al fondo de los tubos con medio de cultivo anaerobio enriquecido con selenato de sodio Se(VI), a una concentración de 500 mM, después del proceso de incubación. Puede notarse que a altas concentraciones de selenato de sodio no se produce turbiedad en el medio, pero se observa el crecimiento de las células formando estructuras filamentosas en el fondo del medio. Aun no se han reportado casos en los que se observen cambios similares de morfología celular.

### **9.3. Curvas de crecimiento de las cepas mutantes.**

Para conocer la funcionalidad de un gen dentro de un microorganismo, este suele deletarse del genoma para observar los cambios genotípicos o fenotípicos que se obtienen como resultado de dicho cambio. En el caso de las mutantes que se construyeron, al no encontrar genes putativos que codifican reductasas, reportadas en la literatura, para organismos filogenéticamente cercanos, se deletaron genes que codificaban otro tipo de reductasas para observar su contribución en la reducción de los oxoaniones de selenio (Lara, 2016).

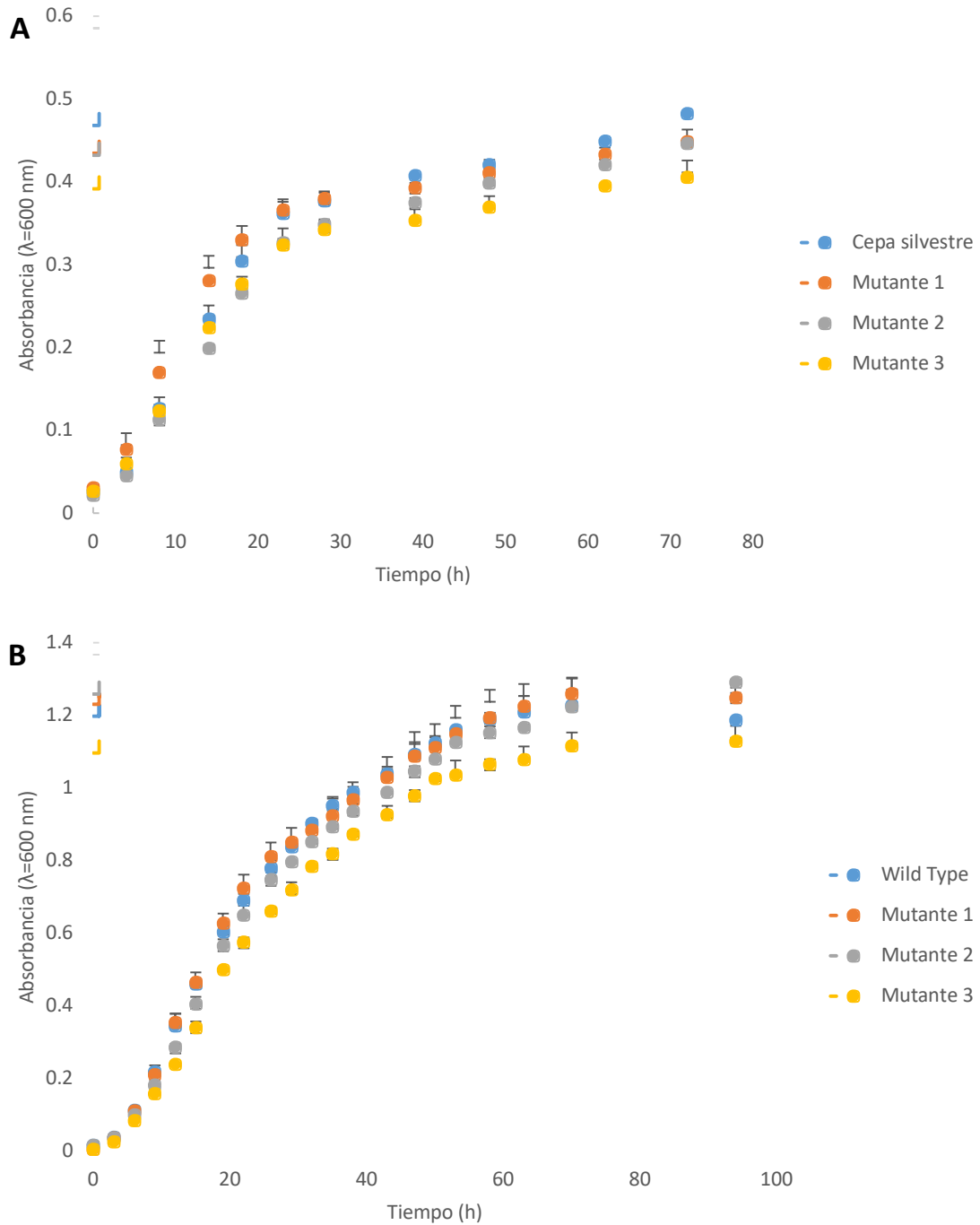
Se trazaron curvas de crecimiento de las cepas mutantes sin enriquecer el medio con selenio y se compararon con la cepa silvestre, con la finalidad de observar si las cepas mutantes presentaban afectaciones en el crecimiento como resultado de los genes deletados.



**Figura 9.** Curvas de crecimiento de las cepas mutantes y la cepa silvestre *Klebsiella pneumoniae* AqSCr en condiciones aerobias. M1=Nitrato reductasa, M2=Arsenato reductasa, M3=Mutante múltiple.

En los experimentos anteriores se observó que tanto el crecimiento como el proceso de reducción de oxoaniones de selenio, se ven favorecidos en condiciones aerobias, por lo que se decidió hacer una comparación, en esta misma condición, de la cepa silvestre y las cepas mutantes. Como se puede observar en la Figura 9, no se identificaron afectaciones en el crecimiento considerables en ninguna de las cepas mutantes, las curvas se sobreponen en la mayor parte de la trayectoria de crecimiento.

#### 9.4. Crecimiento de las cepas mutantes en presencia de oxoaniones de selenio.



**Figura 10.** Curvas de crecimiento de las cepas mutantes y de la cepa silvestre de *K. pneumoniae* AqSCr en condiciones aerobias. **A** en presencia de Se(IV) 100mM y **B** en presencia de Se(VI) 700 mM.

En los experimentos anteriores se determinó que el crecimiento en aerobiosis era el idóneo para la cepa de *klebsiella pneumoniae* AqSCr. No se detectaron afectaciones en el crecimiento de las cepas mutantes en comparación con la cepa silvestre. Tomando en cuenta los argumentos anteriores, se decidió trazar curvas de crecimiento en condiciones aerobias, de las cepas mutantes en sales disódicas de selenio (IV) y (VI), en una concentración considerablemente alta pero en la cual aun se observara crecimiento, para maximizar las condiciones de estrés, con la finalidad de observar su comportamiento bajo estas condiciones.

En la figura 10 podemos observar, en la curva **A**, que la cepa mutante 1 y 2 siguen una cinética muy similar a la cepa silvestre, no se observan diferencias significativas, en cuanto a la cepa mutante 3, se aprecia un pequeño rezago en el crecimiento en estas condiciones el cual puede deberse a que el conjunto de genes deletados en esta cepa mutante intervienen en los mecanismos de detoxificación celular, alterando la fisiología de esta. Dichos genes no se encuentran asociados al crecimiento dado que al comparar la cepa silvestre y la cepas mutantes en ausencia de selenio, no se muestran cambios considerables en las curvas de crecimiento. En la curva **B** se observa el mismo rezago de la cepa mutante 3, aunque la forma y proporción de las curvas siguen el patrón observado anteriormente, se observa que las cepas crecidas en selenato de sodio, tienen un incremento después de la fase de crecimiento log, producido por la presencia de selenio reducido, mientras que en las cepas crecidas con selenito de sodio este incremento es casi inexistente.

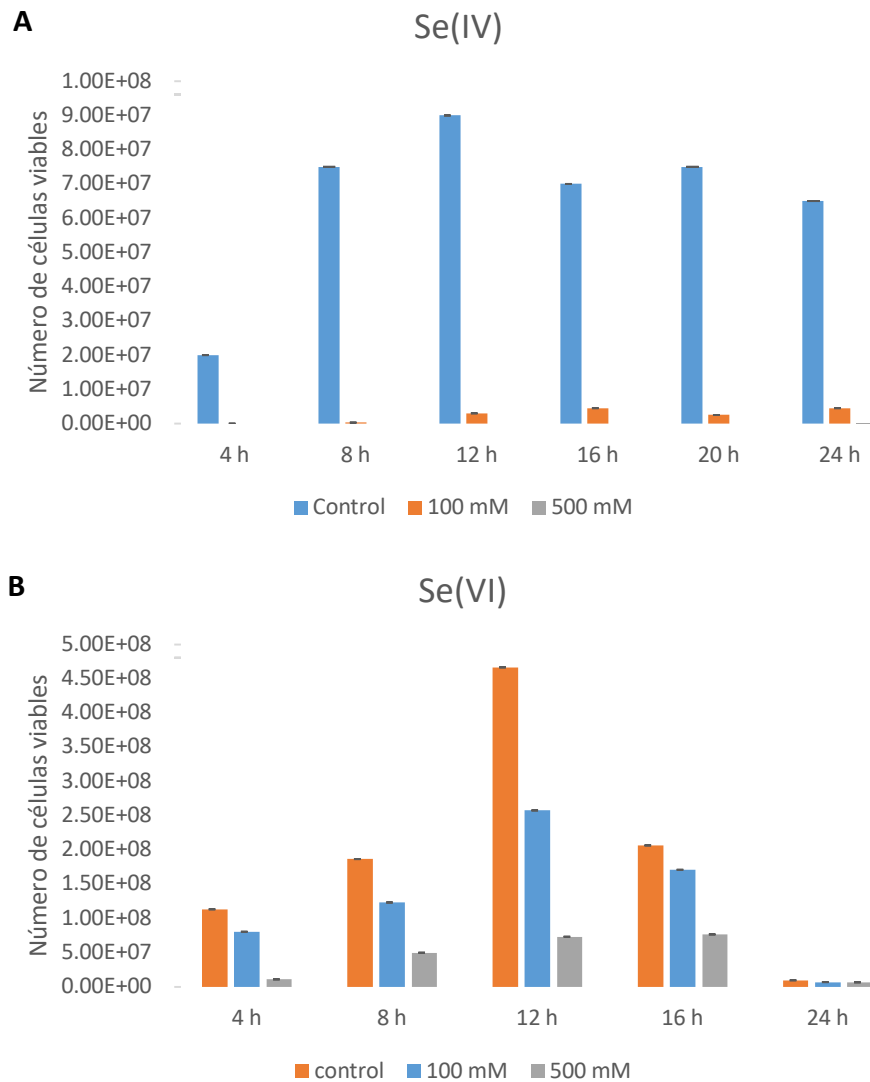
Los resultados demuestran que la reducción de oxoaniones de selenio ocurre por una vía independiente de las nitrato y selenito reductasas, ya que al deletar estos genes del genoma bacteriano, no se observaron cambios fenotípicos importantes, al menos reflejados en el crecimiento. Mientras que la mutante 3 (mutante en nitrato y arsenato reductasas) se observa un poco rezagada en el crecimiento en ambas condiciones, esto puede ser provocado por la inhibición en la capacidad de sensor la presencia de oxoaniones de selenio en el medio, ya que existe gran homología en los transportadores membranales para distintos metales, lo que provoca una rápida intoxicación de la célula antes de



desarrollar los mecanismos de destoxificación correspondientes. Si los genes deletados participaran directamente en la reducción de las especies de selenio, como ocurre con otros metales, este proceso se observaría muy afectado con la delección de estos genes, observándose muy poca o nula reducción de selenio.

### 9.5. Cuenta Viable.

Con los experimentos anteriores solo se podía especular sobre el estado de las células durante y después del proceso de reducción pero mediante un experimento de cuenta viable se determina la cantidad de células vivas y con la capacidad de reproducirse en cada uno de los puntos de la curva de crecimiento, en presencia de una concentración de oxoaniones de selenio muy cercana al límite de tolerancia.



**Figura 11.** Cantidad de células viables (UFC) medidas en distintos puntos de la curva de crecimiento a distintas concentraciones de oxoaniones de selenio. **A** selenito de sodio y **B** selenato de sodio.

Con los resultados de la cantidad de células viables en distintos puntos de las curvas de crecimiento a distintas concentraciones de oxoaniones de selenio, podemos tener la certeza de que el Se(IV) es más tóxico para las células bacterianas, ya que las incapacita casi por completo para reproducirse, en cambio el Se(VI) presenta cierto grado de toxicidad pero aun las células están viables para reproducirse, lo cual corrobora lo sugerido por las curvas de crecimiento en presencia de Se(IV) y Se(VI).

#### **9.6. Microscopía óptica.**

Como un estudio previo para determinar el estado de las células para ser sometidas a microscopía de fluorescencia y de transmisión electrónica, se observó una muestra de cultivo anaerobio enriquecido con selenato de sodio a una concentración de 300 mM incubada durante 3 días, en un microscopio óptico con objetivo de 100 X.

**Figura 12.** Micrografía tomada con una cámara acoplada al microscopio óptico (derecha), de un cultivo de *Klebsiella pneumoniae* AqScr en presencia de selenato de sodio y un acercamiento a los puntos de interés (izquierda).

Aunque se trató de una prueba preliminar, las micrografías tomadas mediante microscopía óptica nos brindan información importante sobre el estado de las células al terminar el proceso de reducción, aunque se pueden observar muchas células lisadas, algunas otras presentan una morfología muy peculiar de las bacterias con la capacidad de reducir oxoaniones de selenio (Nancharaiah y Lens, 2018), se pueden observar células con varios gránulos adheridos a ellas, posiblemente de selenio reducido, el cual parece formar esferas bien definidas, aunque la poca definición del instrumento nos impide conocer la localización exacta de los objetos, estos parecen estar adheridos al exterior de la célula por lo que aparentemente la reducción del selenio podría efectuarse fuera de la célula o las nanopartículas de selenio podrían ser excretadas al espacio extracelular y luego quedar adheridas a la célula por el exopolisacárido, lo cual descarta una reducción localizada en el citoplasma y por lo tanto la reducción mediante reductasas citoplasmáticas. La mayor parte de las células que presentaban estos cuerpos extraños presentaban movimiento, lo que nos indica que la célula se mantiene viva después del proceso de reducción.

### **9.7. Microscopía de fluorescencia.**

Una de las características principales en las células bacterianas que llevan a cabo la reducción de oxoaniones de selenio en el periplasma, es que se produce una retracción de la membrana interna como resultado de la acumulación del selenio reducido, el cual puede o no encontrarse en forma de nanopartículas. Para comprobar si este proceso de reducción se lleva a cabo en la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, un cultivo de la cepa crecido en presencia de selenato de sodio fue teñido con un colorante especial para la observación de las membranas bacterianas, así como su correspondiente control, el cual fue un cultivo crecido en ausencia de selenio, ambos se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Los resultados de la microscopía de fluorescencia fueron cruciales para la caracterización de los procesos de reducción de los oxoaniones de selenio. En la figura 13, micrografía **A**, se observa el cultivo control, se observa una morfología normal de las células, ambas membranas se encuentran sin cambios aparentes. Mientras que en la micrografía **B**, se puede observar algunas células que presentan una retracción en la membrana interna y un

**Figura 13.** Micrografías tomadas con una cámara acoplada al microscopio de fluorescencia, **A** cultivo control crecido en ausencia de selenio, **B** cultivo enriquecido con selenato de sodio a una concentración de 300 mM, se muestran células alargadas y con retracción membranal.

gran espacio periplásmico, además de un alargamiento de las células, exactamente igual a la que se reporta en los microorganismos de la clase  $\gamma$ -proteobacteria con la vía metabólica de reducción localizada en el periplasma (Gonzales, et al., 2016), lo cual resuelve parcialmente la incógnita del sitio de reducción dentro de la célula bacteriana, ya que la presencia de sitios de reducción en el periplasma no significa que en la misma célula no existan otros mecanismos alternos de reducción.

### 9.8. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las micrografías obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM), nos muestran detalladamente las estructuras celulares, debido a que en lugar de utilizar una fuente de luz visible, lo cual limita el alcance de los microscopios ópticos, utiliza un haz de electrones con una longitud de onda mucho menor, lo cual permite la observación de detalles de los microorganismos con mejor claridad.

En la figura 14 podemos observar un cultivo sólido de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, enriquecido con selenato de sodio a una concentración de 50 mM, la observación se llevó a cabo después de 5 h de incubación, en las imágenes podemos observar que las células se encuentran agrupadas, no dispersas como en las micrografías anteriores, además se logra observar la gran cantidad de exopolisacárido secretado alrededor de los cúmulos celulares.

**Figura 14.** Micrografía obtenida mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM), de un cultivo con 5 h de incubación de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr donde se puede observar la gran cantidad de exopolisacárido secretado rodeando las células.

También se observó un cultivo enriquecido con 200 mM de selenato de sodio después de 10 h de incubación (Fig. 15) las estructuras observadas son un poco distintas, las células se pueden observar mucho más alargadas y siguen agrupadas en cúmulos, los cuales se encuentran cubiertos por un matriz muy oscura (material electrodensos) el cual podría ser el selenio reducido, el cual parece no tener una forma definida.

**Figura 15.** Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), de un cultivo de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr con 10 horas de incubación. A y B cúmulos de células alargadas, C y D, acercamiento a células.



Finalmente, se observó una muestra de un cultivo en presencia de selenato de sodio 300 mM, después de 30 h de incubación (Fig. 16), en donde se observaron muchos restos de selenio reducido sin forma definida, no se observa la formación de nanopartículas definidas adheridas a las células o libres en el medio de cultivo como se habían observado en la microscopía óptica, posiblemente los cuerpos de selenio reducido solo se forman en etapas tempranas de la reducción de oxaniones de selenio, posteriormente el selenio reducido se sigue acumulando de manera irregular alrededor de los cúmulos celulares. En los microorganismos utilizados para la producción de nanopartículas de selenio, se puede observar que estas son excretadas o provocan la lisis celular manteniendo su estructura definida (Nancharaiah y Lens, 2018) mientras que en este caso el selenio toma una forma amorfa y no se desprende de las células, lo cual hace a la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr incapaz de producir nanopartículas de selenio elemental. Los cúmulos celulares cubiertos de un material electrodense, posiblemente selenio elemental, no permitió observar los detalles de la célula en estas condiciones.

**Figura 16.** Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), de un cultivo de *Klebsiella pneumoniae* AqSCr con 30 h incubación, las células se encuentran totalmente cubiertas de selenio reducido.

## 10. CONCLUSIONES.

- El crecimiento en medio aerobio es la condición ideal para el crecimiento de la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr, lo cual convierte a esta cepa en una alternativa viable para aplicarse en procesos de biorremediación, aunque también tiene la capacidad de crecer en condiciones anaerobias utilizando al citrato como única fuente de carbono.
- La concentración mínima inhibitoria que presenta el microorganismo para selenito de sodio es 500 mM en condiciones aerobias y 20 mM en condiciones anaerobias. La concentración mínima inhibitoria para selenato de sodio es de 800 mM en condiciones aerobias y 100 mM para condiciones anaerobias, dichas concentraciones superan la tolerancia de los microorganismos anteriormente reportados para las especies de selenio mencionadas, hacienda a la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr una alternativa ideal para su aplicación en procesos de biorremediación.
- La reducción de oxoaniones de selenio se observa en el medio como un sedimento rojizo.
- Los genes identificados en el genoma que codifican para la nitrato reductasa y arsenito reductasa, los cuales fueron deletados en esta cepa, no contribuyen significativamente en la reducción de las especies de selenio, además, al no encontrar secuencias homólogas a selenato reductasas reportadas en otros organismos filogenéticamente cercanos, la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr presenta una vía metabólica de detoxificación diferente a las anteriormente mencionadas.
- En el ambiente donde se aisló la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr no se encontró presencia de oxoaniones de selenio, solo se encontraron grandes cantidades de especies de cromo (Lara, 2016), por lo que la capacidad reductora de especies de selenio de esta cepa puede deberse a un mecanismo compartido el cual se desarrolló como consecuencia de su exposición a las especies tóxicas

de cromo, que si bien no son específicas para reducir especies tóxicas de selenio, pueden ayudar a la detoxificación en presencia de este y otros metales.

- El selenio (IV) presenta una mayor toxicidad para las células de la cepa microbiana que el selenio (VI), aunque la cepa presenta la capacidad de reducir ambas especies; pocos microorganismos reportados presentan la o las vías metabólicas de reducción de selenio (IV) y (VI) simultáneamente.
- Las células crecidas en presencia de selenio (VI) presentan una morfología membranal característica de la reducción periplásmica, por lo que parte de la reducción es posible que se lleve a cabo en este sitio de la célula.
- Mediante microscopía TEM se observó que el selenio reducido se acumula alrededor de las células microbianas formando una especie de matriz, por lo que existe la posibilidad de que también se lleve a cabo la reducción del selenio por proteínas secretadas en el exopolisacárido como una manera de contener con la concentración de especies de selenio tóxicas.
- Los mecanismos de reducción de ambas especies de selenio que presenta la cepa *Klebsiella pneumoniae* AqSCr no se han reportado simultáneamente en ningún microorganismo.
- No se observa la formación aparente de nanopartículas definidas de selenio elemental, el selenio reducido tiene una forma amorfa que rodea las células bacterianas.

## 11. REFERENCIAS.

Abdurrahman S, Thomas J, Philip H, (2016) Microbial transformations of selenium species of relevance to bioremediation. American Society for microbiology 16: 4848-4859.

Atkins P, Palma J., Synthesis and Characterization of Nanoparticles, Phis. Chem., vol.1, 2005, 112-116.

Avendaño R, Chávez N, Fuentes P, Sánchez E, Jimenez J, Chavarria M, (2016) Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. Nature. 6: 371.

Bajaj M, Schmidt S, Winter J, (2012) Formation of Se (0) Nanoparticles by *Duganella sp.* and *Agrobacterium sp.* Isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India. Microbial Cell Factories 11: 64-68.

Belzile N, Jun Wu G, Chen Y, Appanna V, (2006) Detoxification of selenite and mercury by reduction and mutual protection in the assimilation of both elements by *Pseudomonas fluorescens*. Science of the Total Enviroment 367: 704-714.

Butler C, Debieux C, Dridge E, Splatt P, Wright M, (2012) Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis*. Biochemical Society Transactions 40: 1239-1243.

Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, (2002) Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia. American Society for Microbiology 70: 2583-2590.

Cruz V, Pagnanelli F, Cibati A, Uccellet D, Palleschi C, Toro L, (2010) Biotreatment and bioassessment of heavy metal removal by sulphate reducing bacteria in fixed bed reactors. *Water Research* 44: 151-158.

Eswayah A, Smith T, Scheinost A, Hondow N, Gardiner P, (2017) Microbial transformations of selenite by methane-oxidizing bacteria. *Environmental Biotechnology* 18: 627-641.

Fernández-Llamas H, Castro L, Blázquez M, Díaz E, Carmona M, (2016) Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Azoarcus sp.* *Microbial Cell Factories* 15: 109.

Frost S, Ingvaldstad G, Ecological aspects of selenium and tellurium in human and animal health. *Chemica Scripta*, 1995: 1-13.

Garbisu C, Ishii T, Leighton T, Buchanan B, (1996) Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* 132: 199-204.

Goldhaber S, (2003) Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38: 232-42.

Gómez J, Giráldez I, Morales E, Pozas J, (1999) Use of solid phase extraction for speciation of selenium compounds in aqueous environmental samples. *Royal Society of Chemistry* 24: 231-243.

González A, Nieves B, Solórzano M, Cruz J, Puig J, (2013) Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Revista Chilena de Infectología* 30(4): 374-380.

Gonzales G, Saikaly P, Lens P, (2016) Selenite Reduction by Anaerobic Microbial Aggregates: Microbial Community Structure, and Proteins Associated to the Produced Selenium Spheres. *Frontiers in Microbiology* 7: 571-579.

Haug A, Christophersen O, Lyons G, (2007) How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microbial Ecology Health and Disease* 19: 209-228.

Herbel M, Switzer B, Oremland R, Borglin S, (2003) Reduction of elemental selenium to selenide: experiments with anoxic sediments and bacteria that respire Seoxyanions. *Geomicrobiology Journal* 20: 587-602.

Hocking S, Gadd G, (2003) Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by sulfate-reducing bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7063-7072.

Keka C, Barton L, Wai Lok T, Shuman K, Gillespie J, Chioma S, (2011) A novel method for the measurement of elemental selenium produced by bacterial reduction of selenite. *Journal of Microbiological Methods*. 86: 140-144.

Kessi J, Ramus M, Wehrli E, et al., (1999) Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4735-4740.

Kinkle B, Sadowsky M, Johnstone K, Koskinen W, (1997) Tellurium and Selenium Resistance in Rhizobia and Its Potential Use for Direct Isolation of *Rhizobium meliloti* from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(5): 1674-1677.

Krauskopf KB. Introduction to geochemistry, 2nd. edition. Singapore: McGraw-Hill Book Company, 1982, Appendix 3: 546.

Kumar A, Mody K, Jha B, (2007) Bacterial exopolysaccharides--a perception. Journal of Basic Microbiology 47(2): 103-117.

Lampis S, Zonaro E, Bertolini C, (2014) Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. Microbial Cell Factories 13: 35-42.

Lara P, (2016) Estudio de los procesos de Resistencia y reducción de Fe (III) y Cr (VI) de *Klebsiella pneumoniae* ChroAq1 aislada de un acuífero contaminado por cromatos. (Tesis doctoral). Instituto de Biotecnología (UNAM), México.

Lyons G, Stangoulis J, Graham R, (2003) High-Se wheat: biofortification for better health. Nutrition Research Reviews 16: 45-60.

Muller D, Lievremont D, Simeonova D, Hubert J, Lett M, (2003) Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant  $\beta$ -proteobacterium. Journal of Bacteriology 185: 135-41.

Naik M, Pandey A, Kumar S, (2012) Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. Biodegradation 23: 775-783.

Nancharaiyah Y, Lens P, (2018) Ecology and Biotechnology of Selenium-Respiring Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 79: 61-80.

Newman D, Kennedy E, Coates J, Ahmann D, Ellis D, et al., (1997) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulftomaculum auripigmentum* sp. Archives of Microbiology 168: 380-88.

Oldfield JE, Selenium World atlas. Grimbergen, Belgium: Se-Tellurium Development Association (STDA), 1999.

Oremland R, Hoefft S, Santini J, Bano N, Hollibaugh R, Hollibaugh J, (2002) Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arseniteoxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. Applied and Environmental Microbiology 68: 4795-802.

Painter E, (1994) The chemistry and toxicity of Selenium Compounds, with Special Reference to the Selenium Problem. Chemical Reviews 28: 179-213.

Ramirez M, Goma G, Uribelarrea J, (2008) Producción de exopolisacárido rico en L-fucosa por el microorganismo *Klebsiella pneumoniae* sp. utilizando un proceso Fed-Batch. Institut National des Sciences Appliquées 94: 21-34.

Ranganathan M, (2005) Arr genes from arsenate-respiring low G+C Gram positive bacteria *Bacillus selenitireducens* strain MLS10 and *Clostridium* sp. strain OhILAs. Masters thesis. Department of Biological Sciences. Duquesne University 35: 321-342.

Ranjard L, Nazaret B, (2003) Freshwater bacteria can methylate selenium through the thiopurine methyltransferase pathway. Applied and Environmental Microbiology 69: 3784-90.

Rayman M, (2007) The use of high-Se yeast to raise Se status: how does it measure up?. British Journal Nutrition 92: 57-73.



Reilly C., Selenium in Food and Health, 2nd. edition, ed. Springer, 2006.

Souza M, Lytle C, Mulholland M, Otte M, Terry N, (2000) Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard. *Plant Physiology* 122: 1281-1288.

STDA, Selenium Tellurium Development Association. (2006) Recuperado de <http://www.stda.net/se-te.htm>.

Stolz J, Basu P, Santini J, Oremland R, (2006) Arsenic and selenium in Microbial Metabolism. *Annual Review of Microbiology* 60:107-30.

Suzuki K, Ogra Y, (2002) Metabolic pathways for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se 19: 974-983.

Takai K, Hirayama H, Sakihama Y, Inagaki F, Yamato Y, Horikoshi K, (2002) Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order *Aquificales* in a subsurface gold mine. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3046-54.

Thomas G. Back, Organoselenium Chemistry: A Practical Approach. Oxford University Press, 1999, 26-56.

Tomei F, Barton L, Lemansky C, Zocco T, (2012) Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by *Wolinella succinogenes*. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 1328-1333.

Tomei f, Barton L, Lemansky C, Zocco T, Fink N, Sillerud L, (1999) Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. Journal of Industrial Microbiology 24: 329.336.

Zhang B, et al., (2006) Biomolecule-assisted synthesis of single-crystalline selenium nanowires and nanoribbons via a novel flake-cracking mechanism. Nanotechnology 17: 385-390.