

Informe final publicable de proyecto

Caracterización de bacterias antárticas oxidadoras de manganeso

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162559

Fecha de cierre de proyecto: 01/02/2024

AMARELLE LARROSA, Vanesa (Responsable Técnico - Científico)

ROLDÁN REVUELTA, Diego Martín (Investigador)

ROLDÁN, Diego (Investigador)

FABIANO GONZÁLEZ, Elena (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"
(Institución Proponente) \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

Las bacterias oxidadoras de manganeso (BOM) se caracterizan por su capacidad de oxidar el Mn(II) a Mn(III)-Mn(IV), cumpliendo un rol de suma importancia en el ciclo del manganeso. Las BOM están presentes en ambientes muy diversos como suelo, agua, sedimentos y rocas. Si bien las BOM están ampliamente distribuidas en la naturaleza, no se conoce en profundidad los mecanismos implicados en la oxidación de Mn(II) ni cuál es la función de los óxidos en las bacterias que los producen. Se ha propuesto un rol anti-oxidante, de protección frente a la radiación UV, a toxicidad por metales y a toxicidad por nitrito. En nuestro laboratorio tenemos una colección de bacterias antárticas capaces de oxidar manganeso y nos propusimos caracterizar algunas de ellas en aspectos relacionados a su capacidad de oxidar Mn(II) así como determinar qué función podrían cumplir los óxidos de manganeso en esos aislamientos. Considerando que hasta el momento no se han identificado BOM de origen antártico, este proyecto es novedoso y permitirá la generación de nuevo conocimiento científico.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Fisiología y genómica bacteriana

Palabras clave: oxidación biológica de manganeso / bacterias antárticas / /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las BOM se caracterizan por su capacidad de catalizar la reacción de oxidación del Mn(II) soluble a óxidos de Mn insolubles de fórmula general MnO_x. Estas bacterias cumplen un rol de suma importancia en el ciclo biogeoquímico de este metal ya que si bien la oxidación de Mn(II) se da de forma espontánea, la velocidad de oxidación abiótica a pHs cercanos a la neutralidad es muy lenta, mientras que la oxidación biológica puede aumentar la velocidad hasta en cinco órdenes de magnitud (1, 2).

Las BOM están ampliamente distribuidas en la naturaleza en ambientes como suelo, agua, sedimentos y rocas. Los beneficios potenciales que podrían tener estos óxidos para los microorganismos son: protección frente a la predación,ceptor de electrones, actividad anti-oxidante, protección frente a la radiación ionizante, al UV, al ataque viral, a la toxicidad por metales, a la toxicidad por nitrito, así como oxidar sustancias húmicas a compuestos de bajo peso molecular que podrían ser usados como sustratos para el crecimiento microbiano (4-7).

Las BOM son capaces de llevar a cabo la oxidación de Mn(II) de forma indirecta o directa. Los mecanismos indirectos se dan a causa de la modificación del pH o de las condiciones redox del ambiente, o mediante la producción de productos de desecho que oxidan químicamente el Mn(II). Ejemplos de mecanismos indirectos incluyen la producción de O₂ por bacterias fotosintéticas, y la producción y liberación de metabolitos alcalinos u oxidantes (8). La oxidación directa de Mn(II) involucra la producción por parte de los microorganismos de macromoléculas específicas, como polisacáridos o proteínas, que catalizan el proceso (9). Las proteínas con actividad manganeso oxidasa descritas hasta el momento pertenecen mayoritariamente al grupo de las multicobre-oxidases (MCO), aunque se han reportado en algunos casos la participación de hemo-peroxidases (HP). Si bien se ha reportado en varios géneros bacterianos la capacidad de oxidar Mn(II), no se conoce en profundidad el mecanismo involucrado ni el porqué de la producción de estos óxidos (9-11).

Las BOM y los MnO_x producidos por éstas tienen diversas aplicaciones biotecnológicas. Esto se debe a la gran capacidad de los MnO_x de oxidar distintos compuestos orgánicos contaminantes como ser fenoles, anilinas, pesticidas y compuestos antibacterianos, entre otros (11). Dada su alta reactividad con agentes contaminantes, los MnO_x, y por lo tanto las BOM, son capaces de oxidar contaminantes en suelos o aguas (2-4). Por otro lado, los MnO_x son capaces de adsorber otros iones, entre ellos metales potencialmente tóxicos, pudiendo ser utilizados en biorremediación de metales pesados (12,13). Estas bacterias han sido también utilizadas en la producción de biofiltros de remoción de Mn(II) en agua potable, constituyendo una alternativa biológica a los procesos químicos habitualmente utilizados para tal fin (14-17). Recientemente se ha demostrado la capacidad de BOM de remover, en condiciones de laboratorio, la cianotoxina cylindrospermopsina. Esta toxina puede tener efectos hepa-, neuro-, y cito-tóxicos en humanos y es posible encontrarla en cursos de agua dulce usados para potabilización (18). Por lo tanto, las BOM podrían utilizarse también para remover este contaminante en agua potable.

Si bien se han identificado y caracterizado varias cepas capaces de oxidar Mn(II), aún queda mucho por conocer sobre las proteínas implicadas, su mecanismo de acción, y la función de los MnO_x en la fisiología bacteriana, entre otros aspectos fundamentales básicos. Conocer en profundidad estos mecanismos también permitirá avanzar hacia la utilización de estas bacterias y los óxidos producidos en diversas aplicaciones biotecnológicas. La utilización de MnO_x como agentes oxidantes de compuestos orgánicos contaminantes o toxinas en suelos y aguas (2-4, 18), como superficies de adsorción para metales potencialmente tóxicos (2, 12, 13), así como la utilización de las BOM en sistemas de remoción de Mn(II) en agua potable (14-17), son todas posibles aplicaciones biotecnológicas que pueden tener un impacto ambiental y económico

favorable.

En nuestro grupo hemos realizado bioprospección de BOM en ambientes antárticos contando con una colección de BOM, capaces de oxidar Mn(II) tanto a bajas temperaturas como a temperatura ambiente. Estas bacterias, por ser de origen antártico, están especialmente adaptadas a vivir a bajas temperaturas (son bacterias psicrófilas/psicrotolerantes), siendo la producción de enzimas psicrófilas uno de los principales mecanismos de adaptación. Las enzimas psicrófilas se caracterizan por presentar una alta actividad específica a pH y temperaturas moderadas (19, 20), características interesantes desde el punto de vista biotecnológico ya que su utilización redundaría en menores costos.

En este proyecto planteamos caracterizar el proceso de oxidación de manganeso de aislamientos antárticos respecto a las condiciones a las que se lleva a cabo este proceso, la localización de la actividad y de los MnOx, así como evaluar posibles roles de los mismos en la fisiología celular. Todas estas aproximaciones permitirán no sólo conocer aspectos básicos de la oxidación de Mn(II) en bacterias antárticas, sino también evaluar su posible aplicación desde el punto de vista biotecnológico. Hasta la fecha no se han identificado bacterias de origen antártico capaces de oxidar Mn(II), lo que hace de éste un proyecto novedoso. Los resultados obtenidos sin duda contribuirán al conocimiento de los procesos de oxidación de Mn(II) en bacterias.

Metodología/Diseño del estudio

Identificar secuencias genómicas que puedan estar involucradas en la oxidación de Mn(II)

Para determinar si los microorganismos tienen en su genoma posibles genes implicados en la oxidación de Mn(II), es posible secuenciar los genomas y analizarlos en busca de secuencias con homología a aquellas previamente reportadas para esta actividad. De esta manera podemos proponer posibles genes/mecanismos involucrados en la oxidación.

Determinar la condición óptima de oxidación de manganeso in vivo, la localización subcelular de la actividad, y localización de los MnOx producidos

Para determinar las condiciones óptimas de producción de MnOx in vivo se evaluó el crecimiento bacteriano y se cuantificaron los óxidos producidos en función de la composición del medio de cultivo, la temperatura, la concentración de manganeso y el pH del medio. Para evidenciar la presencia de MnOx utilizamos un indicador denominado Azul de leucoberbelina (LBB) cuya oxidación, mediada por MnOx, resulta en un viraje del sustrato de incoloro a azul el cual podemos cuantificar (21). Una vez determinada la condición óptima in vivo de producción de MnOx, determinamos la localización subcelular de la actividad para determinar si la misma se encuentra en el sobrenadante, en proteínas solubles, o en la membrana.

Para determinar dónde se ubican los MnOx y qué efecto pueda tener su producción en la estructura celular, se utilizaron técnicas microscópicas complementarias. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) podemos determinar la localización de los MnOx a nivel subcelular y mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) podemos evaluar el efecto de la producción de MnOx en la morfología celular. Mediante espectroscopía de rayos-X por energía dispersiva (EDS) acoplado a SEM podemos verificar la presencia de manganeso en el preparado. Mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) podemos determinar el efecto de los MnOx en las propiedades elásticas de la célula de manera de determinar si su presencia otorga rigidez a las mismas.

Adjudicar posibles funciones a los MnOx producidos en la fisiología de los aislamientos

Para determinar si los MnOx cumplen un rol de protección frente a toxicidad por metales o protección frente a nitrito, se puede evaluar el efecto de estos compuestos en el crecimiento celular y en la capacidad de oxidar manganeso. Para evaluar un posible rol de los MnOx de protección frente a H₂O₂, se pueden exponer los microorganismos a dicho compuesto y determinar la viabilidad celular. Para determinar el efecto de los MnOx en la protección frente a radiación UV se puede aplicar radiación UV a los microorganismos y luego contar la cantidad de células viables pre y post tratamiento.

Resultados, análisis y discusión

Información genómica

Mediante la secuenciación de los genomas adquirimos información relacionada al tamaño y contenido GC de los genomas, así como el número de secuencias codificantes y secuencias de ARNs que presentan los distintos genomas (Tabla 1). Mediante asignación taxonómica determinamos que UYMnOx20 es una *Pseudomonas deceptionensis*. El aislamiento más cercano es *Pseudomonas deceptionensis* LMG 25555 que fue originalmente aislada en 2011 de la Isla Decepción en la Antártida y no ha sido aislada en ningún otro lugar, lo que sugiere una distribución conservada de la misma en esta región.

La cepa UYMnOx7 fue asignada al género *Arthrobacter*, UYMnOx9 a *Sporosarcina*, y UYMnOx13 a *Janthinobacterium*, pero en ninguno de ellos se logró determinar la especie. Según el análisis del genoma completo de la cepa UYMnOx7 el aislamiento más cercano es *Pseudarthrobacter albicanus* NJ-Z5 una nueva especie de *Pseudarthrobacter* definida recientemente. *Pseudarthrobacter albicanus* NJ-Z5 fue aislada de la península antártica, lo que nuevamente sugiere una distribución geográfica conservada para una especie bacteriana de la Antártida. Para la cepa UYMnOx13 el aislamiento más cercano es *Janthinobacterium tructae* SNU WT3 aislado de riñón de trucha arcoíris. Para el aislamiento UYMnOx9, los aislamientos más cercanos fueron *Sporosarcina limicola* DSM13886 y *Sporosarcina beigongshangi* REN13. *Sporosarcina limicola* DSM13886 es una bacteria psicrófila aislada de un sedimento de lago en Reino Unido, y *Sporosarcina beigongshangi* REN13 de un pozo de lodo en China.

Para todas las cepas se identificaron secuencias codificantes para multicobre-oxidasas. En UYMnOx9 y UYMnOx20 se identificaron secuencias que fueron anotadas como "multicopper oxidase mco". En el caso de UYMnOx20, la secuencia presentó un 81.7% de identidad de secuencia aminoacídica y un 99% de cobertura con la proteína cumA de *Pseudomonas putida* GB-1 (modelo de estudio de oxidación de manganeso), que originalmente fue identificada como una enzima involucrada en la oxidación de manganeso. En el caso de UYMnOx9, esta secuencia presentó 29.8% de identidad de secuencia y un 85% de cobertura con la proteína CotA de *Bacillus pumilis*, proteína que ha sido reportada en este microorganismo como responsable de la oxidación de manganeso. También se identificaron secuencias copA (3 en UYMnOx9 y 2 UYMnOx20), cuyo producto ha sido reportado en la oxidación de manganeso en *Brevibacillus panacihumi* MK-8. En el caso de la cepa UYMnOx7 se detectó también una copia de copA, y además 2 copias del gen cotA. Por último, la cepa UYMnOx13 tiene 2 copias de copA e interesantemente una copia del gen mopA, el cual se ha reportado como una hemoperoxidasa con actividad manganeso oxidasa en *Aurantimonas manganoxydans* S18-9A1, *Erythrobacter* sp. SD-21 y *Pseudomonas putida* GB-1.

Condición óptima de producción de MnOx y localización subcelular de la actividad

Se evaluó el crecimiento y la producción de óxidos de manganeso en función del medio de cultivo, la temperatura, y la concentración de Mn(II). Respecto al crecimiento bacteriano, en medio R2A a 25°C y en presencia de 5 mM y 10 mM de MnCl₂ se observó una marcada disminución de crecimiento en las cepas UYMnOx20 y UYMnOx13 mientras que en las cepas UYMnOx7 y UYMnOx9 no hubo crecimiento, lo que sugiere que estas concentraciones de Mn(II) son tóxicas para estos microorganismos (Fig. 1).

En medio sólido R2A, todas las cepas produjeron MnOx en alguna de las concentraciones de MnOx ensayadas. Los perfiles de oxidación de UYMnOx7, UYMnOx9 y UYMnOx13 son muy similares, observándose ausencia de MnOx a 1mM de MnCl₂. La cepa UYMnOx20 es la única capaz de producir MnOx en 1mM de MnCl₂ (Fig. 2).

Evaluamos varios medios líquidos, y la cepa UYMnOx20 fue la única capaz de oxidar manganeso. En medio líquido PYG pH6.5 a 25°C, la cepa UYMnOx20 es capaz de oxidar manganeso en el rango de 100µM-1mM de MnCl₂, evidenciándose la mayor acumulación de MnOx a las 72h y en presencia de 500 µM de MnCl₂. A las 24h ya hay indicios de la oxidación a simple vista, y a 48h ya se observan claramente los MnOx, sugiriendo que se trata de un proceso muy rápido (Fig. 3). La cepa no presentó actividad a 4°C, y si bien a 15°C fue capaz de producir MnOx, la producción fue más lenta y produjo menos MnOx que a 25°C. El hecho de que las demás cepas no produjeran MnOx en medio líquido pero si en medio sólido podría sugerir que la formación de biofilms es necesaria para llevar a cabo la oxidación de Mn (II) en estos aislamientos.

Decidimos continuar caracterizando la cepa UYMnOx20 y su comportamiento a 25°C por ser la única cepa capaz de producir MnOx en medio líquido, un requerimiento esencial si se piensa en posibles aplicaciones biotecnológicas de la cepa o de los MnOx. Evaluamos la capacidad de oxidar Mn(II) a distintos pHs, determinando que es capaz de producir MnOx a pH5.5 y pH6.5, pero no produce a pH7.5 (Fig. 4). A pH6.5 es donde se da la máxima producción de MnOx a una concentración de MnCl₂ de 500µM (Fig. 5). En todos los casos, la producción de MnOx esta subestimada ya que mucho de los MnOx producidos queda retenido en el tubo, posiblemente debido a la producción de biofilms (Fig. 6A). Decidimos entonces determinar si existe alguna relación entre la formación de MnOx y la formación de biofilms. Determinamos que la formación de biofilm se ve afectada por la concentración de MnCl₂, generándose más biofilm (Fig. 6B) en las mismas condiciones en que se generan más MnOx (Fig. 6C). Estos datos sugieren que la formación de biofilm tiene un rol importante en la producción de MnOx. Interesantemente, no observamos la formación de MnOx cuando UYMnOx20 es crecido en matraces de vidrio. Sin embargo, pudimos evidenciar algo de oxidación al incluir bolitas de polipropileno al matraz (Fig. 7A), lo que podría sugerir que la formación de biofilm no se da en vidrio pero si en plástico. Interesantemente, pudimos determinar la presencia de MnOx al incluir arena al matraz (Fig. 7B). Determinamos la presencia de MnOx en presencia de UYMnOx20 independientemente del agregado de MnCl₂ al medio, lo que sugiere la disponibilidad de Mn(II) en la arena. Este resultado es muy interesante porque la arena es un sustrato económico y habitualmente utilizado en la producción de biofiltros de remoción de Mn(II).

Evaluamos el proceso de formación de MnOx en medio sólido PYG, el cual presenta un patrón muy singular e interesante. Como se muestra en la Fig. 8, la aparición de los MnOx no es homogénea en toda la colonia, observándose a los 7 días de incubación precipitados discretos en el centro y los bordes de la colonia (Fig. 8 (I y II)). Cuando se observan estos precipitados a mayor aumento (Fig. 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, 8f), se puede observar que forman círculos con distinta coloración, sugiriendo distintos gradientes de MnOx. A las 4 semanas las colonias se observan completamente marrones (Fig. 8 (III y IV)), observándose un mayor acúmulo de MnOx en el centro de la colonia y en los bordes.

Para determinar la localización subcelular de la actividad manganeso oxidasa de la cepa UYMnOx20, preparamos extractos celulares y evaluamos la capacidad de oxidar Mn(II) de la fracción citosólica y membranas celulares. No se evidenció actividad en ninguna de estas fracciones, por lo que podemos concluir que la actividad es extracelular encontrándose en el sobrenadante de cultivo.

Localización de los MnOx producidos

Para determinar la localización de los MnOx, analizamos las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada a espectroscopía de rayos-X por energía dispersiva (EDS). Pudimos determinar que en presencia de MnCl₂ en la muestra, se observan más acúmulos celulares que en la muestra sin metal. Como se observa en la Fig. 9, en presencia de MnCl₂ la cepa UYMnOx20 produce abundante matriz extracelular en comparación con las condiciones control en ausencia de metal. Mediante EDX (Fig. 10) pudimos determinar la presencia de Mn(II) en la muestra conteniendo MnCl₂ y no en la muestra control. Evidenciamos que la presencia de Mn(II) está asociada a la formación de acúmulos pero no es homogénea, habiendo acúmulos que contienen Mn(II) (secciones G e I) y otros que no (secciones F y H). Esta heterogeneidad tendría más que ver con los límites de detección de la técnica y las secciones seleccionadas. A modo de ejemplo, cuando la sección F de la Fig. 10 se evalúa a mayor resolución (Fig. 11, en presencia de MnCl₂) podemos detectar la presencia de Mn (II) en secciones donde se evidencia matriz extracelular (E, F y D) mientras que no se observa Mn(II) en células aisladas (G). A mayor resolución (Fig. 12) se evidencia claramente que la presencia de Mn(II) está asociada a la matriz extracelular, observándose en A, B, C y D donde hay matriz, mientras que no se detecta Mn(II) en E, F y G, donde no hay matriz. Estos resultados sugieren que los MnOx formarían parte de la matriz extracelular.

Posibles funciones a los MnOx producidos en la fisiología de los aislamientos

Aun nos resta determinar si los MnOx cumplen alguna de las funciones propuestas: protección frente a stress oxidativo, protección a UV, protección frente a metales. Hasta el momento únicamente hemos evaluado la respuesta a metales (Zn, Cd, Cu y Fe) de la cepa UYMnOx20 en condiciones de producción de MnOx vs en condiciones de no producción, pero no hemos obtenido resultados concluyentes.

Conclusiones y recomendaciones

De los análisis genómicos podemos concluir que 3 de los 4 aislamientos pertenecen a nuevos géneros bacterianos. Estos resultados dan cuenta de la importancia de muestrear sitios poco explorados para aportar al conocimiento de la diversidad bacteriana existente. Por otro lado, logramos identificar genes candidatos a ser responsables de la oxidación de manganeso en todos los aislamientos. Interesantemente, identificamos genes candidatos en los aislamientos del género *Janthinobacterium* y *Arthrobacter*, para los cuales se ha reportado la capacidad de oxidar manganeso pero hasta el momento se desconocen los mecanismos implicados. Según nuestros resultados, la oxidación de manganeso en *Janthinobacterium* sp. UYMnOx13 posiblemente se trate de un mecanismo dual mediado por multicobre-oxidases (CopA) y hemoperoxidasas (MopA). En el caso de *Pseudoarthrobacter* sp. UYMnOx7, el mecanismo posiblemente este mediado únicamente por multicobreoxidases (CopA y CotA).

Caracterizamos la capacidad de la cepa *Pseudomonas deceptionensis* UYMnOx20 de oxidar Mn(II) determinando las condiciones óptimas de producción de MnOx: medio líquido PYG pH6.5, 72h de incubación a 25°C, en presencia de 500 µM de MnCl₂. Además, la cepa UYMnOx20 es capaz de oxidar Mn(II) en un amplio rango de concentraciones (100µM-1mM), y en un lapso de tiempo corto (24h-48h). Determinamos que la cepa es capaz de formar biofilms en asociación con la formación de MnOx, y que es capaz de oxidar Mn(II) presente en arena, lo que resulta interesante desde el punto de vista biotecnológico para la generación de biofiltros de arena para la remoción de Mn(II) en agua. En futuros trabajos sería interesante determinar las propiedades de adhesión a arena de la cepa, y la capacidad del biofiltro de eliminar Mn(II) de agua.

En resumen, la cepa Antártica *Pseudomonas deceptionensis* UYMnOx20 tiene un gran potencial biotecnológico que puede ser aprovechado.

Referencias bibliográficas

1. Miyata N, Tani Y, Sakata M, Iwahori K. 2007. Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. *J Biosci Bioeng* 104:1–8.
2. Spiro TG, Bargar JR, Sposito G, Tebo BM. 2010. Bacteriogenic Manganese Oxides. *Acc Chem Res* 43:2–9.
3. Tebo BM, Clement BG, Dick GJ, Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD. 2007. Biotransformations of manganese. 1223–1238.
4. Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156:609–43.
5. Xuezheng L, Aiguo G, Haowen C. 2008. Isolation and phylogenetic analysis of cultivable manganese bacteria in sediments from the Arctic Ocean. *Acta Ecol Sin* 28:6364–6370.
6. Sunda WG, Kieber DJ. 1994. Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature* 367:62–64.
7. Zerfaß C, Christie-Oleza JA, Soyer OS. 2019. Manganese Oxide Biomineralization Provides Protection against Nitrite Toxicity in a Cell-Density-Dependent Manner. *Appl Environ Microbiol* 85.
8. Richardson LL, Aguilar C, Nealson KH. 1988. Manganese oxidation in pH and O₂ microenvironments produced by phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 33:352–63.
9. G. J. Brouwers, E. Vijgenboom, P. L. EVPLAMCJPM de VEW de VJ. 2000. Bacterial Mn²⁺ Oxidizing Systems and Multicopper Oxidases: An Overview of Mechanisms and Functions. *Geomicrobiol J* 17:1–24.
10. Tebo BM, Johnson HA, McCarthy JK, Templeton AS. 2005. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends Microbiol* 13:421–428.
11. Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, Dick GJ, Murray KJ, Parker D, Verity R, Webb SM. 2004. BIOGENIC MANGANESE OXIDES: Properties and Mechanisms of Formation. *Annu Rev Earth Planet Sci* 32:287–328.
12. Gude JCJ, Rietveld LC, van Halem D. 2017. As(III) oxidation by MnO₂ during groundwater treatment. *Water Res* 111:41–51.
13. Bai Y, Yang T, Liang J, Qu J. 2016. The role of biogenic Fe-Mn oxides formed in situ for arsenic oxidation and adsorption in aquatic ecosystems. *Water Res* 98:119–127.
14. Katsoyiannis IA, Zouboulis AI. 2004. Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: kinetic considerations and product characterization. *Water Res* 38:1922–1932.
15. Sly L, Arunpairojana V, Dixon D. 1993. Biological Removal of Manganese from Water by Immobilized Manganese-Oxidising Bacteria. *J Aust Water Assoc* 20:38–40.
16. Li C, Wang S, Du X, Cheng X, Fu M, Hou N, Li D. 2016. Immobilization of iron- and manganese-oxidizing bacteria with a biofilm-forming bacterium for the effective removal of iron and manganese from groundwater. *Bioresour Technol* 220:76–84.
17. Piazza A, Ciancio Casalini L, Pacini VA, Sanguinetti G, Ottado J, Gottig N. 2019. Environmental Bacteria Involved in Manganese(II) Oxidation and Removal From Groundwater. *Front Microbiol* 10:119.
18. Martínez-Ruiz EB, Cooper M, Fastner J, Szewzyk U. 2020. Manganese-oxidizing bacteria isolated from natural and technical systems remove cylindrospermopsin. *Chemosphere* 238:124625.
19. Metpally RPR, Reddy BVB. 2009. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC Genomics* 10:11.
20. Feller G. 2013. Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica (Cairo)* 2013:1–28.
21. Krumbein WE, Altmann HJ. 1973. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 25:347–356.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)