

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

---



## **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS MICROBIANAS CON APLICACIÓN COMO INHIBIDORES DE CORROSIÓN**

### **TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**Doctora en Biotecnología**

**P R E S E N T A**

**M. en B. Sandra Pérez Miranda**

### **DIRECTORES**

**Dr. Francisco José Fernández Perrino**

**Dr. Luis Silvestre Zamudio Rivera**

**Marzo de 2009**

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrado del Conacyt y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el número de registro 0471-O” .**

Iztapalapa, D. F., a 19 de marzo de 2009.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa

Aprobó la tesis

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS  
MICROBIANAS CON APLICACIÓN COMO INHIBIDORES DE CORROSIÓN**

que presentó

**M. en B. Sandra Pérez Miranda**

Comité tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co-director: Dr. Luis Silvestre Zamudio Rivera

Asesora: Dra. Rocío George Téllez

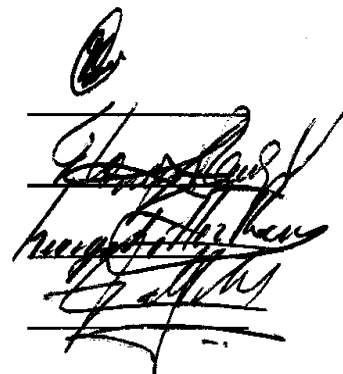
Jurado:

Presidente: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Secretaria: Dra. Florina Ramírez Vives

Sinodal: Dra. Rocío George Téllez

Sinodal: Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde

The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are cursive and appear to be those of the jury members listed in the text: Araceli Tomasini Campocosio, Florina Ramírez Vives, Rocío George Téllez, and Hiram Isaac Beltrán Conde.

*La vida es un instante de experiencias,  
tener la voluntad de ser feliz es decisión de cada individuo,  
haz que el tiempo que permanezcas en ella sea ventura.*

SPM/130309

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Por el largo tiempo que hemos compartido, en el cual nunca dejaste de estar al pendiente de mi desempeño académico, por haber creído en mi capacidad y apoyarme en las decisiones tomadas de las cuales surgieron ideas emprendedoras que hoy me llevan a ser Doctora, pero sobre todo por la confianza que siempre me has mostrado y por tu amistad.

Dr. Luis Silvestre Zamudio Rivera

Por compartir su conocimiento conmigo; el tiempo invertido en mi enseñanza y la disponibilidad al resolver mis dudas, lo cual no tiene precio.

Dra. Rocío George Téllez

Por la ayuda recibida durante el desarrollo de esta tesis, por resolver dudas y apoyarme en todo momento, pero sobre todo por tu amistad.

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Por su calidad humana, su asesoría y ayuda incondicional, aún sin formar parte de mi Comité tutorial, además de estar siempre al pendiente de las necesidades del laboratorio.

Dra. Florina Ramírez Vives

Por aceptar ser parte del jurado y la pronta revisión de esta tesis.

Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde

Por tu amistad, por las sugerencias realizadas para mejorar la calidad de esta tesis y resolver mis dudas.

Dr. José Manuel Martínez Magadan y Dr. Raúl Oviedo

Por su ayuda, disponibilidad y paciencia al realizar las simulaciones.

A los que han estado a mi lado desde que soy yo, mi maravillosa familia, los que siempre han apoyado mis decisiones y locuras, mis incondicionales, en particular a mis padres y hermano, mi mundo, los cuales han contribuido a mi formación y a hacer de mí lo que hasta hoy soy; orgullosa estoy por ser parte de su vida.

A mis amigos del Instituto Mexicano del Petróleo, M. Fernando Godínez, Aristeo Estrada, Ing. Laura Moreno, Dr. César Flores, Dr. Eugenio Flores, M. Juan Pablo; por la ayuda brindada, los comentarios y sugerencias acertadas durante el desarrollo de esta tesis; por sus sonrisas, las cuales hicieron menos difícil mi estancia allá; por las sinceras conversaciones que me ayudaron a mejorar mi vida, por dejarme conocerlos.

A mis amigos del Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, Tania, Jesús, Jaime, Maura, Roxana, Hugo, Doris, Arturo; por todo el tiempo compartido, risas, comidas, bailes, nieves, buenos momentos, porque aunque ya no los vea seguimos en contacto.

A mis amigas y buzos, Lety, Angélica, Celia, Diego, Félix, Charly, Carlitos, Usha, Edwin, Julio, los cuales de una u otra forma siempre han estado conmigo, aun en la distancia, los buenos y malos ratos, por consentirme, buscarme y permanecer a mi lado, gracias.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xii
Unidades, abreviaturas y símbolos	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
Capítulo I.           INTRODUCCIÓN	1
Capítulo II.           REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
II.1   Corrosión y su importancia económica	7
II.2   Industria del petróleo y corrosión	9
II.2.1 Protección contra la corrosión	10
II.3   Inhibidores de corrosión	10
II.4   Características esenciales de los inhibidores fílmicos	14
II.5   Inhibidores de corrosión ecológicos	14
II.5.1 Toxicidad de compuestos orgánicos	17
II.5.2 Bioacumulación de compuestos orgánicos	20
II.5.3 Biodegradabilidad de compuestos orgánicos	23
II.6   Evaluación de inhibidores de corrosión	24



---

II.7	Química computacional y cálculos teóricos	26
II.8	Investigaciones con moléculas biológicas para inhibir la corrosión	28
II.9	Importancia biológica del hierro y biodisponibilidad	29
II.10	Sistemas de captación de hierro	32
II.10.1	Transporte de $Fe^{2+}$ por reducción de $Fe^{3+}$	32
II.10.2	Adquisición directa del hospedador	33
II.10.3	Sideróforos	34
II.10.3.1	Hidroxamatos	41
II.10.3.2	Catecoles	44
II.10.3.3	$\alpha$ -hidroxiácidos	47
II.10.3.4	Mezclas	48
II.10.3.5	Anfífilicos	52
II.10.3.6	Biosíntesis de sideróforos	55
II.10.3.7	Transporte del complejo $Fe^{3+}$ /sideróforo en bacterias	56
II.10.3.8	Transporte del complejo $Fe^{3+}$ /sideróforo en hongos	60
Capítulo III.	JUSTIFICACIÓN	64
Capítulo IV.	HIPÓTESIS	66

---

---

Capítulo V.	OBJETIVOS	68
Capítulo VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	70
VI.1	Materiales y reactivos	71
VI.2	Cálculos teóricos	71
VI.3	Microorganismos	71
VI.4	Selección y aislamiento de colonias productoras de sideróforos	72
VI.5	Método O-CAS	73
VI.6	Ensayos químicos para comprobar la producción de sideróforos	74
VI.6.1	Hidroxamatos	74
VI.6.2	Catecoles	75
VI.6.3	Hidroxiácidos	75
VI.7	Producción de sideróforos	76
VI.7.1	Métodos analíticos	77
VI.8	Caracterización de grupos funcionales de sideróforos	78
VI.9	Purificación del sideróforo	78
VI.10	Elucidación estructural	79
VI.11	Ensayos de aplicación	80
VI.11.1	Prueba de rueda dinámica	80
VI.12	Evaluaciones de pérdida de peso	81

---

---

VI.13	Determinación de toxicidad	83
VI.14	Identificación molecular del microorganismo	83
Capítulo VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
VII.1	Cálculos teóricos	87
VII.2	Aislamiento de microorganismos y producción de sideróforos	100
VII.2.1	Muestra de agua dulce	101
VII.2.2	Muestra de suelo alcalino	102
VII.2.3	Muestra de agua de mar	103
VII.3	Concentración de las muestras que contienen sideróforos y caracterización de grupos funcionales	107
VII.4	Evaluación de la eficiencia de inhibición a la corrosión	109
VII.5	Identificación molecular de la cepa productora del sideróforo presente en la muestra S7	116
VII.6	Producción del sideróforo proveniente de la muestra S7	119
VII.7	Purificación del sideróforo proveniente de la muestra S7 y evaluación de su eficiencia de inhibición a la corrosión	122
VII.8	Elucidación estructural del sideróforo (compuesto 1) proveniente de la muestra S7	130
VII.9	Determinación de la toxicidad aguda de la ferrioxamina B (compuesto 1)	135

---

---

VII.10 Determinación del coeficiente de partición y del volumen molecular a través de cálculos teóricos de la ferrioxamina B	136
VII.11 Simulación de la interacción de la ferrioxamina B con una superficie de hematita	137
VII.12 Diseño de nuevos prototipos de inhibidores de corrosión ecológicos derivados de la ferrioxamina B	138
Capítulo VIII. CONCLUSIONES	140
Capítulo IX. BIBLIOGRAFÍA	142
APÉNDICES	169
APÉNDICE A-1 Reactivos, Medios de cultivo y Salmueras	170
APÉNDICE A-2 Estadísticos	180
APÉNDICE A-3 Espectros de RMN	182
APÉNDICE A-4 Microtox®	195
APÉNDICE A-5 Cromatogramas y Gradientes de elución HPLC	199
APÉNDICE A-6 O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection	203

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
Tabla 1 Costo de la corrosión metálica en diferentes países industrializados	8
Tabla 2 Inhibidores de corrosión en la industria de la refinación del petróleo	11
Tabla 3 Principales contaminantes del agua de formación	15
Tabla 4 Prueba de toxicidad para organismos de diferentes niveles tróficos	16
Tabla 5 Clasificación de los productos químicos utilizados en la producción de hidrocarburos en el Mar del Norte	19
Tabla 6 Estrategias de bacterias y hongos para adquirir hierro	31
Tabla 7 Sideróforos bacterianos y los microorganismos productores	36
Tabla 8 Sideróforos fúngicos y los microorganismos productores	39
Tabla 9 Receptores específicos de sideróforos	57
Tabla 10 Protocolo para amplificar los genes codificantes para ARNr 16S por PCR	84
Tabla 11 Condiciones de PCR	85
Tabla 12 Entalpías de reacción para superficies de hematita	89
Tabla 13 Entalpías de reacción para superficies de piritita	91
Tabla 14 Entalpías de reacción para superficie híbrida	93
Tabla 15 Entalpías de reacción de la interacción del compuesto <b>20</b> con los complejos de coordinación <b>1 a 3</b>	96
Tabla 16 Coeficientes de partición y volumen molecular de micobactina	100
Tabla 17 Detección del tipo de sideróforo para muestras de agua dulce	102
Tabla 18 Detección del tipo de sideróforo para muestras de suelo	103
Tabla 19 Detección del tipo de sideróforo para muestras de agua de mar	104
Tabla 20 Microorganismos de agua dulce productores de sideróforos seleccionados como posibles inhibidores de corrosión	105
Tabla 21 Microorganismos de suelo alcalino productores de sideróforos seleccionados como posibles inhibidores de corrosión	105

---

Tabla 22	Microorganismos de agua marina productores de sideróforos seleccionados como posibles inhibidores de corrosión	106
Tabla 23	Muestras de sideróforos seleccionados y sus concentraciones	107
Tabla 24	Eficiencias de inhibición a la corrosión para muestras de sideróforos seleccionados	110
Tabla 25	Eficiencias de inhibición a la corrosión para la muestra S7	114
Tabla 26	Eficiencias de inhibición a la corrosión para las muestras A7 y A8	115
Tabla 27	Resultados obtenidos con BLAST para la secuencia de nucleótidos de la cepa S7	118
Tabla 28	Fracciones colectadas por cromatografía en columna y su concentración de sideróforos	123
Tabla 29	Eficiencias de inhibición a la corrosión para las fracciones colectadas por cromatografía en columna	124
Tabla 30	Eficiencias de inhibición a la corrosión para el compuesto 1	128
Tabla 31	Comparación de las eficiencias de inhibición a la corrosión para el compuesto 1, la fracción C y la muestra S7	129
Tabla 32	Comparativo de desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ obtenidos para la ferrioxamina B en agua deuterada por Borgias y en la presente tesis	134
Tabla 33	Toxicidad aguda de la ferrioxamina	135
Tabla 34	Coefficientes de partición y volumen molecular de prototipos de sideróforos anfifílicos sintéticos derivados de la ferrioxamina B	139
Tabla 35	Curva patrón de hidroxamatos	176
Tabla 36	Curva patrón para determinación de azúcares reductores	178
Tabla 37	Análisis de datos con programa Microtox®	197
Tabla 38	Gradiente de elución 1	199
Tabla 39	Gradiente de elución 2	200
Tabla 40	Gradiente de elución 3	201

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 1 Mecanismo general de un inhibidor de corrosión mostrando el grupo hidrofílico y la cadena hidrofóbica	13
Figura 2 Sideróforos empleados como inhibidores de corrosión	29
Figura 3 Grupos funcionales característicos de sideróforos	34
Figura 4 Estructuras de sideróforos tipo hidroxamato	42
Figura 5 Estructuras de sideróforos tipo catecol	46
Figura 6 Estructuras de sideróforos tipo $\alpha$ -hidroxiácidos	48
Figura 7 Estructuras de sideróforos en mezcla	50
Figura 8 Estructuras de sideróforos tipo anfifílicos	54
Figura 9 Captación de hierro por sideróforos en bacterias	56
Figura 10 Mecanismo de captación de hierro con reducción interna por sideróforos en hongos	61
Figura 11 Mecanismo de captación de hierro con reducción externa por sideróforos en hongos	62
Figura 12 Equipo de rueda dinámica	81
Figura 13 Estructura de compuestos de coordinación 1 a 3 y estructuras de los compuestos coordinantes 4 a 7	88
Figura 14 Estructura de los quelatos 8 a 10 y el aducto 11	89
Figura 15 Estructura del quelato 12 y el aducto 15	92
Figura 16 Estructura de los quelatos 16 a 18 y el aducto 19	94
Figura 17 Sideróforo anfifílico micobactina	95
Figura 18 Estructura de la 2-(2-hidroxi-6-metil-fenil)-5-metil-oxazolina	95
Figura 19 Estructura de los quelatos 21 a 23	97
Figura 20 Inhibidores de corrosión base imidazolina	98
Figura 21 Inhibidores de corrosión base bis-imidazolininas	99
Figura 22 IR muestra A3	108
Figura 23 RMN $^1\text{H}$ muestra A3	108
Figura 24 RMN $^{13}\text{C}$ muestra A3	109

---

Figura 25	Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16 S ADNr de la cepa S7	116
Figura 26	ADN genómico y Producto de amplificación de PCR de la cepa S7	117
Figura 27	Cinética de <i>Bacillus sp.</i> con medio de cultivo sin mejorar	120
Figura 28	Cinética de <i>Bacillus sp.</i> con medio de cultivo mejorado	121
Figura 29	RMN $^1\text{H}$ del compuesto 1 en $\text{D}_2\text{O}$ a 500 Mhz	126
Figura 30	RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto 1 en $\text{D}_2\text{O}$ a 125 Mhz	126
Figura 31	RMN $^1\text{H}$ del compuesto 2 en $\text{D}_2\text{O}$ a 500 Mhz	127
Figura 32	RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto 2 en $\text{D}_2\text{O}$ a 125 Mhz	127
Figura 33	IR del compuesto 1	132
Figura 34	Proceso para la obtención de ferrioxamina B	136
Figura 35	Ferrioxamina B interaccionando con la superficie de hematita	138
Figura 36	Gráficos Gamma y % efecto vs concentración	198
Figura 37	Cromatograma Fracción C, gradiente de elución 1	199
Figura 38	Cromatograma estándar Ferricromo	200
Figura 39	Cromatograma Fracción C, gradiente de elución 2	201
Figura 40	Cromatograma Fracción C, gradiente de elución 3	202



## UNIDADES

<b>° C</b>	grado centígrado	<b>M</b>	molar
<b>Da</b>	Dalton	<b>mg</b>	miligramo
<b>g</b>	gramo	<b>Hz</b>	hertz
<b>g / L</b>	gramo por litro	<b>MHz</b>	megahertz
<b>h</b>	horas	<b>mL</b>	mililitro
<b>kcal / mol</b>	kilocalorías por mol	<b>mm</b>	milímetro
<b>L</b>	litro	<b>mM</b>	milimolar
<b>lb / in<sup>2</sup></b>	libra por pulgada cuadrada	<b>nm</b>	nanómetros
<b>μL</b>	microlitro	<b>ppm</b>	partes por millón

## ABREVIATURAS

<b>CAS</b>	romo azulol S
<b>HDTMA</b>	bromuro de hexadeciltrimetil amonio
<b>kaff</b>	constante de afinidad
<b>MilliQ</b>	agua desionizada
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear
<b>TMS</b>	tetrametilsilano
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>ACN</b>	acetónitrilo
<b>DBO</b>	demanda bioquímica de oxígeno
<b>DQO</b>	demanda química de oxígeno

## SÍMBOLOS

<b><sup>13</sup>C</b>	carbono 13
<b><sup>1</sup>H</b>	hidrógeno 1
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	cloroformo deuterado
<b>D<sub>2</sub>O</b>	agua deuterada
<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b>Hg</b>	mercurio
<b>δ</b>	partes por millón
<b>λ</b>	lambda
<b>ν</b>	frecuencia

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio sistemático teórico-experimental para la determinación de las características estructurales que deben reunir los sideróforos para ser usados como inhibidores de corrosión ecológicos; se demostró que el sideróforo ferrioxamina B controla eficientemente los problemas de corrosión que se presentan en ambientes ácidos característicos de la industria petrolera. La ferrioxamina B es un sideróforo base trihidroxamato que funciona como inhibidor de corrosión ecológico a una concentración mínima de 75 ppm, fue purificado por técnicas cromatográficas y caracterizada a través de técnicas espectroscópicas de IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ .

El productor de la ferrioxamina B fue *Bacillus sp.*, el cual se aisló de una muestra de suelo alcalino proveniente del Lago de Texcoco y se identificó a través de técnicas de Biología Molecular.

La eficiencia de inhibición a la corrosión de la ferrioxamina B fue determinada a través de técnicas gravimétricas que se utilizan a nivel mundial para evaluar el desempeño de inhibidores de corrosión que se aplican actualmente en la industria petrolera.

Una posible explicación, a través de simulación molecular, de cómo la ferrioxamina B controla el problema de corrosión en superficies de óxido de hierro fue propuesta. Además se diseñaron nuevos prototipos de inhibidores de corrosión anfifílicos ecológicos sintéticos base ferrioxamina B, los cuales tendrían las características estructurales idóneas para funcionar eficientemente a nivel industrial en ambientes corrosivos característicos de la industria petrolera.

## ABSTRACT

In the present work a theoretical-experimental systematic study for the determination of the structural characteristics that siderophores must reunite to be used like ecological corrosion inhibitors was realized, we demonstrated that ferrioxamine B siderophore controls efficiently problems of corrosion that appear in acid atmospheres characteristic of the oil industry. Ferrioxamine B is a siderophore base trihydroxamate that works like ecological corrosion inhibitor to minim concentration of 75 ppm, it was purified by chromatographic techniques and characterized through spectroscopic techniques IR, NMR  $^1\text{H}$ , NMR  $^{13}\text{C}$ .

The producer of the ferrioxamine B was *Bacillus sp.*, which was isolate of an originating alkaline soil sample of the Lake of Texcoco and it was identified through techniques of Molecular Biology.

The efficiency of inhibition to the corrosion of the ferrioxamine B was determined through gravimetric techniques that are used at world level to evaluate the corrosion inhibitor performance which are applied actually in the oil industry.

A possible explanation, through molecular simulation, of how the ferrioxamine B controls corrosion problems in iron oxide surfaces was proposed. In addition, new synthetic ecological amphiphilic corrosion inhibitor prototypes were designed base ferrioxamine B, which would have suitable structural characteristics to work efficiently at level industrial in corrosive atmosphere characteristic of the oil industry.

# INTRODUCCIÓN

## Capítulo I

A pesar de los continuos avances en el desarrollo de las ciencias aplicadas a los materiales resistentes a la corrosión o de las tecnologías nuevas para prevenir la degradación física y química que sufren todos los materiales a causa del ambiente en el que se encuentran, la corrosión continúa siendo uno de los mayores problemas que afectan el desempeño, seguridad e integridad de los mismos; es un tema del que quizá no se quiere hablar pero es una constante que afecta nuestra vida diaria. Se manifiesta en varias formas, desde el color rojizo en puertas y ventanas en casa hasta el deterioro de los tubos de escape y silenciadores en los automóviles; la sustitución de los calentadores de agua domésticos, rupturas en la conducción de agua, explosiones por fugas de combustible en los tanques de almacenamiento o tuberías de conducción e incluso el derrumbe de un puente, son algunos de los problemas derivados de la corrosión (Ryan *et al.*, 2002).

La corrosión de los metales representa una gran pérdida para la civilización moderna; se estima que ocasiona un costo en millones de dólares perdidos al año que alcanza el 2-3% del Producto Interno Bruto de los Estados Unidos de América (Koch *et al.*, 2002) (Lyon, 2004), sin contar con la cantidad de recursos económicos que invierten las grandes empresas a nivel mundial para su prevención.

El fenómeno de la corrosión es de interés particular para la industria del petróleo, en las diferentes áreas que la conforman. La corrosión en ductos y equipos industriales provoca grandes pérdidas económicas a dicha industria, debido a los continuos paros en las líneas de producción y a los elevados costos que implica el reemplazo de las partes afectadas. Todo ello sin mencionar el daño ecológico que causan los constantes derrames de petróleo en ambientes marinos y terrestres.

En los últimos años, la industria petrolera a nivel mundial se ha dado a la tarea de desarrollar tecnologías de bajo impacto ambiental, lo que obliga a la industria petrolera nacional a afrontar diversos retos tecnológicos para mantenerse en el ritmo competitivo del mercado internacional (en el cual la variable ambiente es fundamental). Con el desarrollo de nuevas normas ambientales, que exigen a las industrias desarrollar productos de calidad y ecológicamente sustentables (además del máximo aprovechamiento de los materiales y recursos dentro de sus procesos) la industria petrolera está abierta al desarrollo de las ciencias biológicas en general, y a la biotecnología en particular, donde existen oportunidades adicionales para el desarrollo de tecnologías limpias y el factor técnico económico es o puede ser rentable. Dentro de estas tecnologías limpias se encuentra el diseño de biomoléculas activas que tengan aplicación en el desarrollo de inhibidores de corrosión de alta eficiencia. El uso de inhibidores químicos es la práctica más efectiva y económica para la prevención de la corrosión, aceptándose su empleo para una gran variedad de condiciones de operación. Los inhibidores son sustancias que al agregarse al medio agresivo controlan, o al menos disminuyen, la velocidad con la que se corroe el sistema, aunque por su estructura molecular, de naturaleza anfifílica, poseen propiedades que los hacen ser altamente tóxicos (Martin *et al.*, 2000). Desafortunadamente, los más comunes son también peligrosos para la salud (Lyon, 2004).

Aunque se tienen productos efectivos, el desarrollo de nuevos compuestos de origen biológico podría ser una alternativa para prevenir estas características indeseables. Del mismo modo, debido a las exigencias que deben cumplir y las

características que deben poseer, sería muy interesante obtener compuestos funcionales y amigables con el ambiente en condiciones de operación severas. Esto ha motivado el desarrollo y aplicación de inhibidores de corrosión biológicos (los sideróforos, por ejemplo) como una de las opciones más adecuadas para mitigar los efectos ocasionados por la corrosión (McCafferty y McArdle, 1995). Los sideróforos son ligandos de hierro, de bajo peso molecular, producidos por microorganismos cuando éstos se encuentran bajo condiciones de crecimiento deficientes en este metal. De acuerdo al grupo funcional que presentan en su estructura, estos compuestos se clasifican en: hidroxamatos, catecoles y  $\alpha$ -hidroxiácidos (Braun y Killmann, 1999; Baakza *et al.*, 2004).

Debido a que el hierro bajo condiciones fisiológicas presenta una solubilidad muy baja ( $10^{-18}$  M), en ambientes terrestres es poco disponible y en ambientes marinos se encuentra en concentraciones traza (desde 0.02 nM a 1 nM) (Guan *et al.*, 2001). La obtención del metal es básica para muchos procesos bioquímicos de los microorganismos, por lo que resulta un problema en estos ambientes. Por ello se requieren los sideróforos para poder adquirir el hierro y realizar sus procesos vitales. Esto implica que prácticamente casi cualquier microorganismo aeróbico puede producirlos (Casas *et al.*, 2002).

Con base en las características fisicoquímicas mencionadas con anterioridad, si los sideróforos contienen un número repetitivo de grupos activos que puedan interactuar con la superficie metálica, son moléculas no contaminantes y se obtienen de los microorganismos, este tipo de compuestos resultarían de interés como inhibidores de corrosión.

---

El propósito fundamental de este proyecto fue identificar y caracterizar moléculas biológicas microbianas (sideróforos) que tuvieran aplicación como inhibidores de corrosión, para lo cual fue necesario diseñar la siguiente metodología:

- 1) Determinar el grupo funcional de sideróforos óptimo para funcionar como inhibidor de corrosión mediante cálculos teóricos.
- 2) Aislar y seleccionar microorganismos acuáticos y terrestres productores de sideróforos con las características mencionadas.
- 3) Producir, purificar y caracterizar los sideróforos.
- 4) Determinar la eficiencia de inhibición a la corrosión, coeficiente de partición y toxicidad del sideróforo.
- 5) Finalmente, identificar al microorganismo productor del sideróforo con potencial como inhibidor de corrosión.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## Capítulo II

---

## II.1 Corrosión y su importancia económica

La corrosión es un fenómeno natural que se define como el deterioro de un material o de sus propiedades debido a que ocurre una reacción química o electroquímica entre el material y el medio ambiente (Sedriks, 1996). Al igual que los desastres naturales, como terremotos o disturbios a causa del tiempo, la corrosión puede causar daños peligrosos y costosos en todas las cosas, desde automóviles hasta construcciones. Este fenómeno ha llamado la atención de una parte de la comunidad científica a nivel mundial, por sus implicaciones económicas y por los riesgos de seguridad industrial y ecológicos provocados por la misma.

Realizar una aproximación del importe de los daños debidos a la corrosión resulta ser un trabajo muy complejo y costoso, por lo que la gran mayoría de países no destinan esfuerzos para llevar a cabo estudios profundos relacionados con este tema; México está incluido entre ellos.

Las referencias que se tienen del costo de los daños ocasionados por este fenómeno son sólo de países industrializados; en la tabla 1 se muestran costos de corrosión en relación con el Producto Interno Bruto (PIB) de cada nación (Sastri, 1998; Koch *et al.*, 2002). Los costos anuales estimados que se asocian directamente con la corrosión metálica en el sector industrial estadounidense, desde infraestructura y transportación hasta producción y manufactura, en el periodo de 1999 a 2001 fueron de 276 miles de millones de dólares, aproximadamente el 3.1% del PIB del país. Este dato revela que aunque los problemas de corrosión han disminuido en las últimas décadas en EUA, los países industrializados deberán

encontrar más y mejores alternativas para el control de la corrosión (Koch *et al.*, 2002).

Tabla 1. Costo de la corrosión metálica en diferentes países industrializados.

<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>*PIB</b>	<b>% del PIB</b>	<b>Costo de la corrosión*</b>
Reino Unido	1970	91	3.00	3.2
EUA	2001	10100	3.10	276
	1986	3404	4.20	160
	1975	1667	4.20	70
URSS	1969	335	2.00	6.7
Alemania	1969	200	3.00	6.0
Canadá	1991	674	0.52	3.47

\* miles de millones de dólares

En este estudio, sin embargo, se deslindaron los costos destinados a la industria del petróleo, los cuales ascienden a un monto aproximado de 3.7 miles de millones de dólares. La industria de la refinación del petróleo sufrió un costo anual de 1.7 miles de millones de dólares. Estos datos aportan una idea clara de la magnitud del problema, además de proveer una buena justificación para destinar recursos humanos y económicos a la investigación de nuevas técnicas que permitan disminuir el impacto de este fenómeno (Lee y Newman, 2003).

## II.2 Industria del petróleo y corrosión

En México, esta industria es una de las que presenta problemáticas graves de corrosión, prácticamente en todas las etapas de procesamiento y refinación del petróleo. Ésto se deriva de la gran variedad de agentes químicos manipulados, materiales de construcción y condiciones de operación de los sistemas de producción y transporte. La refinación del petróleo es una etapa crítica, no sólo por la importancia de la misma sino debido a la presencia de altas concentraciones de contaminantes ácidos y básicos, así como a las condiciones severas de procesamiento (presión y temperatura) a la que se someten los crudos. Al parecer, el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y los compuestos derivados de azufre ( $SO_2$ ) en presencia de agua provocan el mayor número de fallas de materiales, contaminación ambiental y daños a la salud, por lo que son considerados los agentes químicos más comunes y agresivos. La corrosión de depósitos, tuberías y sistemas de condensación causada por el agua básica amarga es uno de los principales problemas que se encuentran en las plantas catalíticas de petróleo en México (Gutzeit, 1968). En estos sistemas, la corrosión debilita las estructuras de acero por adelgazamiento y ampollamiento, por lo que esta infraestructura puede fallar posteriormente por efecto de la presión de trabajo, o bien por efecto de la generación de concentradores de esfuerzo que pueden provocar el colapso total de la estructura (Hudgins, 1969).

### **II.2.1 Protección contra la corrosión**

Entre las medidas utilizadas en la industria del petróleo para combatir la corrosión están las siguientes:

1. Aislamiento eléctrico del material. Esto puede lograrse mediante el empleo de pinturas o resinas, depósitos metálicos de espesor suficiente o por aplicación de recubrimientos diversos.
2. Protección catódica. Se consigue cambiando el sentido de la corriente en la pila de corrosión. Conectando eléctricamente el acero con un metal más activo (zinc o magnesio, por ejemplo) se puede llegar a suprimir la corrosión del acero, ya que éste no actuará como ánodo y pasará a comportarse como cátodo, dejando el papel de ánodo al metal más activo (zinc o magnesio, en el ejemplo anterior).
3. Polarización del mecanismo electroquímico. Ésto se puede lograr eliminando el oxígeno disuelto, mediante la adición al medio agresivo de ciertas sustancias llamadas inhibidores, las cuales pueden llegar a polarizar uno de los electrodos de la pila de corrosión, y por lo tanto, llegar a detener (o cuando menos disminuir) sus efectos.

### **II.3 Inhibidores de corrosión**

La inhibición de la corrosión representa la reducción de la velocidad de corrosión en el metal por adición al sistema de un compuesto químico cuando éste

se encuentra en contacto con el medio agresivo. Específicamente, el inhibidor de corrosión es un compuesto que al agregarse al medio controla o al menos disminuye, la velocidad con la que se corroe el sistema. El inhibidor puede añadirse en forma líquida, en vapor o en ambas formas (Sedriks, 1996).

Desde hace aproximadamente dos décadas, la forma más económica de controlar la corrosión en esta industria ha sido el empleo de inhibidores. Actualmente su uso es una de las técnicas más importantes y con más desarrollo desde el punto de vista económico para el control de la misma. De esta forma, para cada una de las etapas del proceso se tienen bien definidos los tipos de inhibidores que deben ser utilizados (tabla 2).

Tabla 2. Inhibidores de corrosión en la industria de la refinación del petróleo.

<b>Refinación del petróleo</b>	<b>Contaminantes</b>	<b>Tipo de corrosión</b>	<b>Inhibidor</b>
Destilación primaria o atmosférica	HCl <sup>†</sup> y H <sub>2</sub> S	Generalizada	Fílmico y neutralizante
Destilación secundaria o al vacío	HCl <sup>††</sup> y H <sub>2</sub> S	Generalizada	Fílmico y neutralizante
Desintegración catalítica	H <sub>2</sub> S, NH <sub>4</sub> HS y NH <sub>4</sub> CN	Generalizada y ampollamiento por hidrógeno	Fílmico y secuestrante
Reducción de viscosidad	HCl y H <sub>2</sub> S	Generalizada	Fílmico y neutralizante
Hidrodesulfuración	H <sub>2</sub> S, NH <sub>4</sub> HS y NH <sub>4</sub> Cl	Generalizada y bajo depósito	Fílmico y secuestrante

<sup>†</sup> Proviene de la hidrólisis del cloruro de magnesio.

<sup>††</sup> Proviene de la hidrólisis de cloruro de magnesio y de cloruro de calcio

A pesar de lo anterior y de que existe un amplio campo de investigación para éstos, el área de los inhibidores de corrosión aún no está completamente desarrollada. No se conoce con detalle el mecanismo por el cual previenen la corrosión, fundamentalmente debido a que las condiciones en las que operan son muy complejas y difíciles de reproducir experimentalmente. Entender el mecanismo de acción de estos compuestos es importante, porque un cambio mínimo en su estructura química se correlaciona fuertemente con la eficiencia del inhibidor (Ramachandran *et al.*, 1997).

Existen varias formas de clasificar los inhibidores de corrosión, de las cuales la más aceptada es la que se fundamenta en su mecanismo de acción. Ésta clasificación comprende a los inhibidores pasivadores, convertidores de película, inhibidores de adsorción o fílmicos, neutralizantes, secuestrantes y misceláneos. Los primeros tres grupos son los más numerosos, e incluyen compuestos que pueden formar barreras entre el metal y el medio agresivo, mientras que los secuestradores y neutralizadores actúan sobre el medio (eliminando agentes agresivos como el ión hidrógeno o el oxígeno disuelto, entre otros). Por otro lado, en la categoría de inhibidores misceláneos se encuentran los biocidas, compuestos químicos que se utilizan para disminuir y controlar la población de bacterias pero que pueden ser considerados como inhibidores de la corrosión debido a que al disminuir la población bacteriana, la corrosión ocasionada por la presencia de esta clase de microorganismos también disminuye (NRF-005-PEMEX-2000).

Para la protección interior de ductos, la categoría de inhibidores más utilizada es la de los que actúan por adsorción o fílmicos. Este tipo de compuestos se

adsorben sobre la superficie del metal, formando películas protectoras delgadas que resultan de la atracción física o química entre el compuesto y la superficie, controlando la difusión de los iones corrosivos o moléculas hacia el metal que se desea proteger. El nivel de protección depende tanto de su concentración (que debe provocar una cobertura completa de la superficie) como de la fuerza de atracción entre el metal y el compuesto. Las barreras de inhibidor formadas son hidrofóbicas, y rechazan la fase acuosa en la que se encuentran las especies corrosivas (Szyprowski, 2000).

Esta clase de inhibidores consiste básicamente de una cabeza o parte polar y de una cola o cadena hidrofóbica (figura 1). Como ejemplo de este tipo de compuestos protectores se pueden mencionar las aminas, amino amidas, imidazolinias, sales cuaternarias de aminas, piridinas y tioles (Subramanyam y Mayanna, 1985; Graham, 1990).

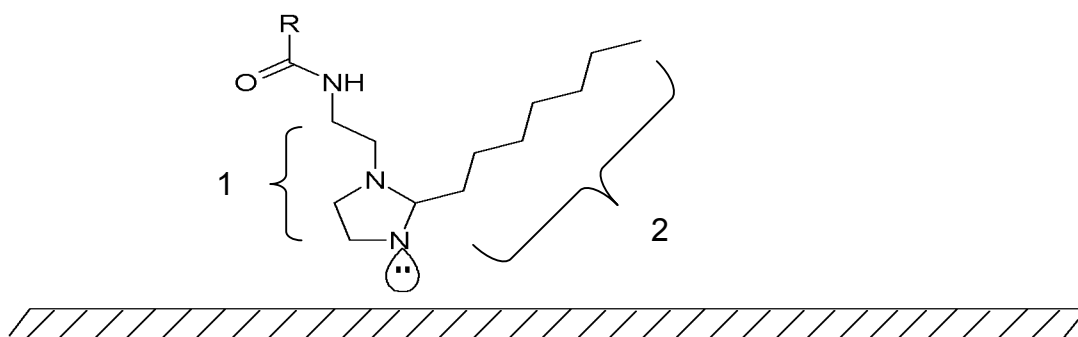


Figura 1. Mecanismo general de un inhibidor de corrosión mostrando el grupo hidrofílico (1) y la cadena hidrofóbica (2).



#### **II.4 Características esenciales de los inhibidores fílmicos**

Las características esenciales de estos inhibidores se basan en estudios teóricos y experimentales realizados sobre imidazolinas oléicas, las cuales son inhibidores de corrosión eficientes en sistemas de procesos (Ramachandran *et al.*, 1997). Para considerar a un compuesto como inhibidor de corrosión, éste debe cumplir lo siguiente:

- i. Presentar grupos funcionales capaces de enlazarse fuertemente con la superficie metálica.
- ii. La organización de las colas debe formar una película hidrofóbica que sirva como barrera para la migración e interacción de contaminantes en general con la superficie metálica.
- iii. Balance óptimo entre la parte hidrofílica e hidrofóbica de la molécula para poder formar una monocapa en la superficie con sólo una concentración de ppm.

#### **II.5 Inhibidores de corrosión ecológicos**

La producción de hidrocarburos genera una gran variedad de desechos asociados con esta actividad, entre los cuales está el agua de formación (que contiene contaminantes que en concentraciones suficientes pueden causar un impacto ambiental adverso si se descargaran hacia los cuerpos de agua). El agua de

formación es el principal producto de desecho. El impacto ambiental de las aguas producidas está en función de su composición química. Básicamente el agua contiene sólidos disueltos, hidrocarburos disueltos y suspendidos, metales pesados así como diferentes compuestos químicos que se adicionan a los fluidos producidos para disminuir problemas operacionales como la formación de emulsión, corrosión e incrustación entre otros (Stephenson, 1992). En la tabla 3 se muestran los principales contaminantes del agua de formación, dado el impacto ambiental que producen sobre los diferentes ecosistemas.

Tabla 3. Principales contaminantes del agua de formación.

<b>Contaminante</b>	<b>Tipo</b>	<b>Concentración</b>
Sólidos disueltos totales	NaCl, CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub>	100- 200000 ppm
Hidrocarburos	Hidrocarburos	10-30 mg/L
	Compuestos orgánicos	1000-6000 µg/L
Metales pesados	Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Ag, Zn	Variable
Aditivos químicos	Inhibidores de corrosión	
	Inhibidores de incrustación	
	Biocidas	Variable
	Antiemulsionantes	
	Antiespumantes	

En la última década del siglo pasado, la industria petrolera internacional reconoció la necesidad de minimizar el impacto ambiental producido por las sustancias químicas usadas en el manejo y procesamiento de hidrocarburos, principalmente en instalaciones marinas. En el año de 1990 en la conferencia de ministros del Mar del Norte, la comunidad económica europea estableció la Comisión

de París (PARCOM) con la finalidad de establecer las guías metodológicas de pruebas ambientales para la evaluación de productos químicos empleados en la exploración y producción de los hidrocarburos de la región del Mar del Norte. De acuerdo a la PARCOM los productos químicos empleados en las actividades petroleras deben someterse a pruebas de toxicidad, bioacumulación y biodegradación.

La propuesta de la Comisión de París consistió en estandarizar las pruebas ambientales y desarrollar un modelo para usar los datos obtenidos. La estandarización consistió en evaluar el efecto de tres parámetros como son:

a) Toxicidad

La prueba se realiza en organismos pertenecientes a diferentes niveles tróficos, incluyendo productores primarios (como algas) y consumidores (como peces o crustáceos), así como organismos descomponedores.

Tabla 4. Prueba de toxicidad para organismos de diferentes niveles tróficos.

<b>Organismo</b>	<b>Especie recomendada</b>	<b>Prueba</b>
Productor primario	<i>Skeletonema costatum</i>	72 h EC <sub>50</sub>
Consumidor	<i>Acartia tonsa</i>	48 h EC <sub>50</sub>
Descomponedor	<i>Corophium volutator</i>	10 d LC <sub>50</sub>

b) Biodegradabilidad

Esta prueba demuestra cuánto persiste un compuesto químico en el ambiente; cada componente de la formulación del inhibidor es sujeto a prueba. El método clásico para demostrar la biodegradabilidad de un compuesto consiste en incubar una solución o suspensión del compuesto

en un medio mineral con un inóculo microbiano, bajo condiciones ambientales controladas, durante un lapso de tiempo (usualmente 28 días). Algunos de los parámetros a cuantificar para la biodegradabilidad son DQO, se exige mínimo el 70%, DBO, se requiere como mínimo un 60% de biodegradación. Se realiza de acuerdo al método OCDE 301D modificado

c) Bioacumulación (coeficiente de partición)

La prueba consiste en determinar el coeficiente de partición ( $\log P_{o/w}$ ) que presenta el compuesto químico entre las fases octanol/agua, y se determina para cada uno de los componentes de la formulación. Se evalúa mediante el método OCDE 117, en donde el valor máximo permitido es 3.0.

En respuesta a este requerimiento, se han hecho esfuerzos para elaborar nuevos inhibidores de corrosión que presenten características menos tóxicas, fácilmente biodegradables y que sean no bioacumulables; en otras palabras, que sean amigables con el ambiente. Estos nuevos inhibidores de corrosión se conocen como ecológicos.

### **II.5.1 Toxicidad de compuestos orgánicos**

Debido a los efectos a largo plazo que representan los inhibidores descargados a los cuerpos de agua, existe una necesidad general en desarrollar pruebas biológicas en corto plazo que sean simples, baratas, rápidas y sensibles,

que se apeguen a los organismos de regulación ambiental para la evaluación de la toxicidad (Cronin, 2004).

En general existen dos principales grupos para la investigación de pruebas de toxicidad, las que se refieren al efecto en la salud y las de efecto ecológico. Las pruebas de toxicidad de efecto en la salud se basan en el uso de componentes subcelulares, células aisladas, secciones de un tejido y de órganos enteros aislados. Las pruebas de efecto ecológico son conducidas para medir principalmente la toxicidad aguda de compuestos químicos sobre organismos acuáticos, pero también se pueden utilizar microorganismos, en particular bacterias, las cuales ofrecen la oportunidad de obtener resultados reales debido a que poseen similitud bioquímica y morfológica con organismos mayores, además de tener tasas de crecimiento y distribución rápidas.

Considerando los efectos a largo y a corto plazo, las pruebas de toxicidad son crónicas o agudas. Donde, la prueba de toxicidad aguda determina la concentración a la cual un organismo en particular presenta una sintomatología inmediata (incluyendo la muerte como extremo límite), al ponerse en contacto con un compuesto químico tóxico durante un periodo de tiempo. La concentración a la cual el 50% de los microorganismos mueren se le denomina concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y cuando sufren una disfunción fisiológica se le llama concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ). Por el contrario, la prueba de toxicidad crónica se refiere a aquella en la que se estudia el efecto que tiene un compuesto químico durante un periodo de tiempo largo (Dreisbach y Robertson, 1988).

---

 Determinación de toxicidad aguda por Microtox® (Weideborg *et al.*, 1997)

La prueba se puede realizar a través del protocolo de toxicidad aguda Microtox® donde el análisis expone a la bacteria luminiscente *Photobacterium phosphoreum* al compuesto químico y en base a la emisión de luz producida por el microorganismo se determina la toxicidad del compuesto. En la tabla 5 se presenta la clasificación de las categorías establecidas por la Offshore Chemical Notification Scheme (OCNS) para clasificar los productos químicos utilizados en la producción de hidrocarburos en el Mar del Norte (Whale, 1991).

Tabla 5. Clasificación de los productos químicos utilizados en la producción de hidrocarburos en el Mar del Norte.

<b>Clasificación de la toxicidad</b>	<b>LC<sub>50</sub> (mg/L)</b>	<b>Categoría</b>
Extremadamente tóxico	0,01 – 0,1	5
Altamente tóxico	0,1 – 1,0	4
Moderadamente tóxico	1 – 10	3
Ligeramente tóxico	10 – 100	2
Bajamente tóxico	100 -1 000	1
No tóxico	> 1 000	0

## II.5.2 Bioacumulación de compuestos orgánicos

---

La acumulación de sustancias químicas en los sistemas bióticos y/o abióticos existentes como organismos, cuerpos de agua, suelo y sedimentos, ha tomado gran relevancia en materia ambiental para la comunidad científica. La captación de un contaminante en un organismo, ocurre principalmente por absorción directa, pero también a través de la red trófica. La concentración interna de un contaminante en un organismo puede incrementarse por acumulación hasta un nivel que causa efectos tóxicos, aún cuando la concentración en el exterior permanezca por debajo del nivel crítico. Incluso exposiciones por un periodo corto de tiempo, pueden producir una concentración alta interna que persiste en el organismo por un tiempo mayor que en el agua circundante, debido a su elevada y duradera estabilidad en sistemas bióticos.

La acumulación es un término general para cualquier fenómeno asociado con el incremento en la concentración de un compuesto químico de un sistema en relación a las fases circundantes. El proceso de acumulación depende de la forma en que la sustancia contaminante entra a un organismo, el cual se establece por la bioacumulación (incremento en la concentración del contaminante en el organismo, desde el ambiente hacia el receptor por cualquier forma posible); bioconcentración (incremento de la concentración del contaminante en el organismo desde la fase circundante hacia el receptor en forma directa, vía adsorción, difusión lipídica; biomagnificación (incremento de la concentración vía alimento a través de la cadena alimenticia).

La lipofilidad surge como un parámetro clave en la evaluación del impacto ambiental de contaminantes. Esta propiedad constituye una medida de la preferencia que tiene una sustancia sobre una fase acuosa o una orgánica. La partición entre dos sistemas de diferente polaridad determina la dirección y velocidad de transporte del compuesto químico en el ambiente y por lo tanto su acumulación en algunos de sus componentes. El potencial de los compuestos químicos a bioacumularse se caracteriza generalmente por el factor de bioconcentración (BFC) que sirve como medida de la concentración de compuestos químicos en el organismo concurrente y la concentración del ambiente, bajo condiciones de estado estable.

La partición entre dos fases inmiscibles puede ser considerada como un intercambio continuo de soluto entre dos solventes con una transferencia de masa neta cero, en el equilibrio. Los dos procesos concurrentes, la transferencia de la fase acuosa a la orgánica y la transferencia de la fase orgánica hacia la fase acuosa son relacionados por una constante de equilibrio denominada coeficiente de partición (P).

Después de que se libera el contaminante hacia el ambiente, el compuesto químico se distribuye entre las fases de acuerdo a las respectivas constantes de equilibrio. Un coeficiente de partición grande se relaciona con sustancias lipofílicas, las cuales se transfieren en una mayor proporción en fases orgánicas; valores pequeños de coeficiente de partición se relacionan con sustancias hidrofílicas, en las que una mayor proporción tiende a permanecer en la fase acuosa. Si P se aproxima a cero, el compuesto químico será tan insoluble en la



fase no polar que es improbable que atraviese la membrana lipídica y tenderá a permanecer en la fase inicial de contacto. Por el contrario, a medida que  $P$  tiende a infinito, el compuesto químico será tan insoluble en agua que atravesará la membrana lipídica o quedará atrapado en la fase no polar, en donde se acumulará.

La partición entre una fase acuosa y una fase orgánica, se expresa generalmente por el coeficiente de partición octanol/agua ( $\text{Log } P_{ow}$ ) y se correlaciona con la fase abiótica y biótica.

El  $\text{Log } P_{ow}$  es el parámetro clave en estudios de la distribución de compuestos químicos entre una fase orgánica y la fase acuosa, que determinan el transporte y distribución entre los diferentes sistemas existentes en el ambiente.

Con respecto a la bioacumulación, existe una clara correlación entre la bioacumulación y la lipofilidad de compuestos químicos orgánicos. Por lo que el coeficiente de partición  $\text{Log } P_{ow}$ , puede ser considerado como un parámetro en el pronóstico de la bioacumulación de compuestos químicos. Compuestos con valores de  $\text{Log } P_{ow} \leq 3$ , son considerados comparativamente como hidrofílicos, debido a que muestran solubilidad alta en agua y por lo tanto una bioconcentración baja. Inversamente, valores de  $\text{Log } P_{ow} > 3$ , caracterizan a compuestos químicos lipofílicos, los cuales son menos solubles en agua y por consiguiente presentan una bioconcentración mayor.

Por otra parte, de acuerdo a estudios experimentales realizados por Nendza en 1991, con datos de bioconcentración ( $\text{Log } BFC$ ) y de  $\text{Log } P_{ow}$ , se obtuvo que

eran iguales, siempre y cuando los valores de  $P_{ow}$  fueran menores a 7, por lo que se puede considerar adecuado el uso del coeficiente de partición octanol/agua para la determinación de la bioacumulación.

Para valores de  $\text{Log } P_{ow} < 3$ , se puede asumir que no existe bioconcentración sustancial del compuesto químico; valores de  $\text{Log } P_{ow}$  entre 3 y 6, se consideran compuestos químicos altamente bioacumulables; mientras que valores  $\text{Log } P_{ow}$  por arriba de 6, se consideran compuestos lipofílicos y por lo tanto extremadamente bioacumulables (Nendza, 1991).

El cálculo de  $\text{Log } P_{ow}$  por cualquier programa de cómputo para compuestos orgánicos es generalmente confiable, presentando un alto grado de certidumbre dentro de ciertos rangos. El programa *HyperChem* utiliza el promedio de las hidrofobicidades atómicas de una amplia gama de compuestos orgánicos para calcular el coeficiente de partición. (Viswanadhan, 1989)

### **II.5.3 Biodegradabilidad de compuestos orgánicos**

Se entiende como biodegradable a la característica de algunos compuestos químicos para poder ser utilizada como sustrato por microorganismos, que la emplean como fuente de carbono para su metabolismo en general. La biodegradación puede ser por vía aerobia o anaerobia.

Las pruebas de biodegradabilidad pueden ser rápida, inherente y de simulación. La prueba rápida, proporciona una limitada oportunidad de que

ocurra la biodegradación y la aclimatación del inóculo, bajo condiciones experimentales estrictas. El compuesto químico a evaluar es la única fuente de carbono y energía disponible y se utiliza un inóculo de baja concentración celular que no haya tenido contacto previo con el compuesto de prueba, éste tiene la ventaja de ser aplicable a diversos compuestos orgánicos.

La prueba inherente, permite una prolongada exposición del compuesto de prueba con los microorganismos y otras condiciones que favorecen la biodegradación.

La prueba de simulación proporciona información de la velocidad de biodegradación bajo condiciones ambientales relevantes, las pruebas se dividen de acuerdo al ambiente en que se desea simular, como tratamientos biológicos aerobios y anaerobios, ríos, lagos, mar y suelos.

## **II.6 Evaluación de inhibidores de corrosión**

Las actividades petroleras que se llevan a cabo en las instalaciones conformadas por plataformas marinas, proceso de refinación, transporte del producto, entre otros, utilizan ampliamente inhibidores de corrosión, los cuales son transportados y distribuidos hasta los pozos de producción y tuberías de conducción de crudo y gas para su inyección. Antes de la aplicación industrial de los inhibidores de corrosión a cualquier área donde sean utilizados, estos productos se someten inicialmente a un proceso de selección preliminar mediante pruebas de desempeño

en el laboratorio, bajo condiciones aceleradas y simuladas, con la finalidad de determinar la eficiencia de protección anticorrosiva (garantizando de manera segura la protección de las líneas de transporte).

Para realizar la evaluación de los inhibidores de corrosión se emplea la técnica gravimétrica de rueda dinámica (Wheel Test). En la cual, la pérdida de peso es un método directo para la estimación de la eficiencia y velocidad de corrosión. La evaluación de inhibidores de corrosión se realiza en el laboratorio mediante pruebas aceleradas que simulan las condiciones de los sistemas reales donde serán aplicados, considerando parámetros como tipo y concentración de agentes corrosivos y sales disueltas, temperatura y tiempo. La prueba de la rueda dinámica emplea pequeñas láminas o placas (cupones) del metal en estudio de tamaño específico, las cuales se pesan antes de ser sometidas al medio corrosivo en el interior de botellas de vidrio con y sin la presencia del inhibidor; después de un determinado periodo de tiempo de agitación en la rueda, se retiran los cupones del medio, se someten a una limpieza química para remover los productos de la corrosión y finalmente se pesan para la obtención de la eficiencia y velocidad de corrosión correspondientes. La velocidad de corrosión usualmente se expresa en milésimas de pulgada por año (mpa) y la eficiencia en porcentaje.

## II.7 Química computacional y cálculos teóricos

La química computacional es una disciplina reciente en la química, que se ha desarrollado en la última década. En la actualidad es usada como una herramienta de gran importancia, pues permite determinar propiedades termodinámicas, calcular propiedades teóricas de diversas estructuras y estimar diferencias de energías entre diferentes estados de una gran cantidad de moléculas, así como explicar vías de reacción y mecanismos a nivel atómico. Conociendo las ventajas de esta herramienta se pueden reducir tiempos experimentales. La química computacional abarca un amplio rango de aproximaciones matemáticas que pueden dividirse en dos categorías:

1. La mecánica molecular: aplica las leyes de la física clásica al núcleo atómico, sin considerar explícitamente a los electrones; es decir, trata a los átomos como esferas y a los enlaces como muelles, de manera que utiliza la Ley de Hooke para el tratamiento matemático en el momento de describir la capacidad de los enlaces para alargarse, comprimirse, flexionarse y girarse. Los métodos de la mecánica molecular predicen geometrías, pero tienen la desventaja de que no pueden predecir propiedades electrónicas (como la formación y ruptura de enlaces químicos, por ejemplo).
2. La mecánica cuántica: se basa en la ecuación de Schrödinger para describir una molécula con un tratamiento directo de la estructura electrónica, y se

subdivide a su vez en dos clases, según el tratamiento realizado: métodos semiempíricos y métodos *ab initio*.

- Los métodos semiempíricos ignoran o aproximan algunas de las integrales hechas por la ecuación de Schrödinger, por lo que para compensar esta aproximación se introducen parámetros obtenidos experimentalmente. Estos métodos se denominan NDO (Neglect of Differential Overlap) del acrónimo en inglés, que significa supresión de la diferencial de traslape y que reduce el tiempo de cómputo considerablemente. Aún así, este método tiene poca precisión en los datos que proporciona, y sobreestima los puentes de hidrógeno.
- Los métodos *ab initio* (del latín, que significa a primeros principios) utilizan la aproximación del campo auto consistente de Hatree-Fock (HF-SCF Self Consistent Field) para resolver la ecuación de Schrödinger. En estos métodos todas las integrales son resueltas y no se hace uso de ningún parámetro experimental, por lo que conforme se aumenta el nivel de teoría, generalmente, la precisión de los datos aumenta y es muy confiable para predecir interacciones de puentes de hidrógeno, aunque por el contrario es muy demandante en tiempo de cómputo.

La química computacional ha sido una herramienta ampliamente utilizada para el desarrollo de nuevos inhibidores, además de ayudar a comprender cómo es el mecanismo por el cual estos compuestos previenen la corrosión. Dentro de la

importancia para determinar el mecanismo por el cual los inhibidores tienen esta función se encuentra implícita la fuerte dependencia en la eficiencia del mínimo cambio realizado en la estructura química de los compuestos (Edwards *et al.*, 1994).

## **II.8 Investigaciones con moléculas biológicas para inhibir la corrosión**

McCafferty y McArdle (1995) reportaron las propiedades de los sideróforos como inhibidores de corrosión, aislaron cuatro sideróforos de bacterias (aerobactina de *Aerobacter aerogenes*, enterobactina de *Escherichia coli*, parabactina de *Paracoccus denitrificans* y ácido rodotorúlico de *Rhodotorula rubra*). Los compuestos se estudiaron como posibles inhibidores de corrosión en medios ácidos, sometiéndose a ambientes de HCl 1 N. De esta forma, se obtuvo un 93% de inhibición para la parabactina en tratamientos de 15 días a una concentración de 500 ppm, disminuyendo la eficiencia de inhibición en el siguiente orden: parabactina > enterobactina > aerobactina > ácido rodotorúlico (figura 2).

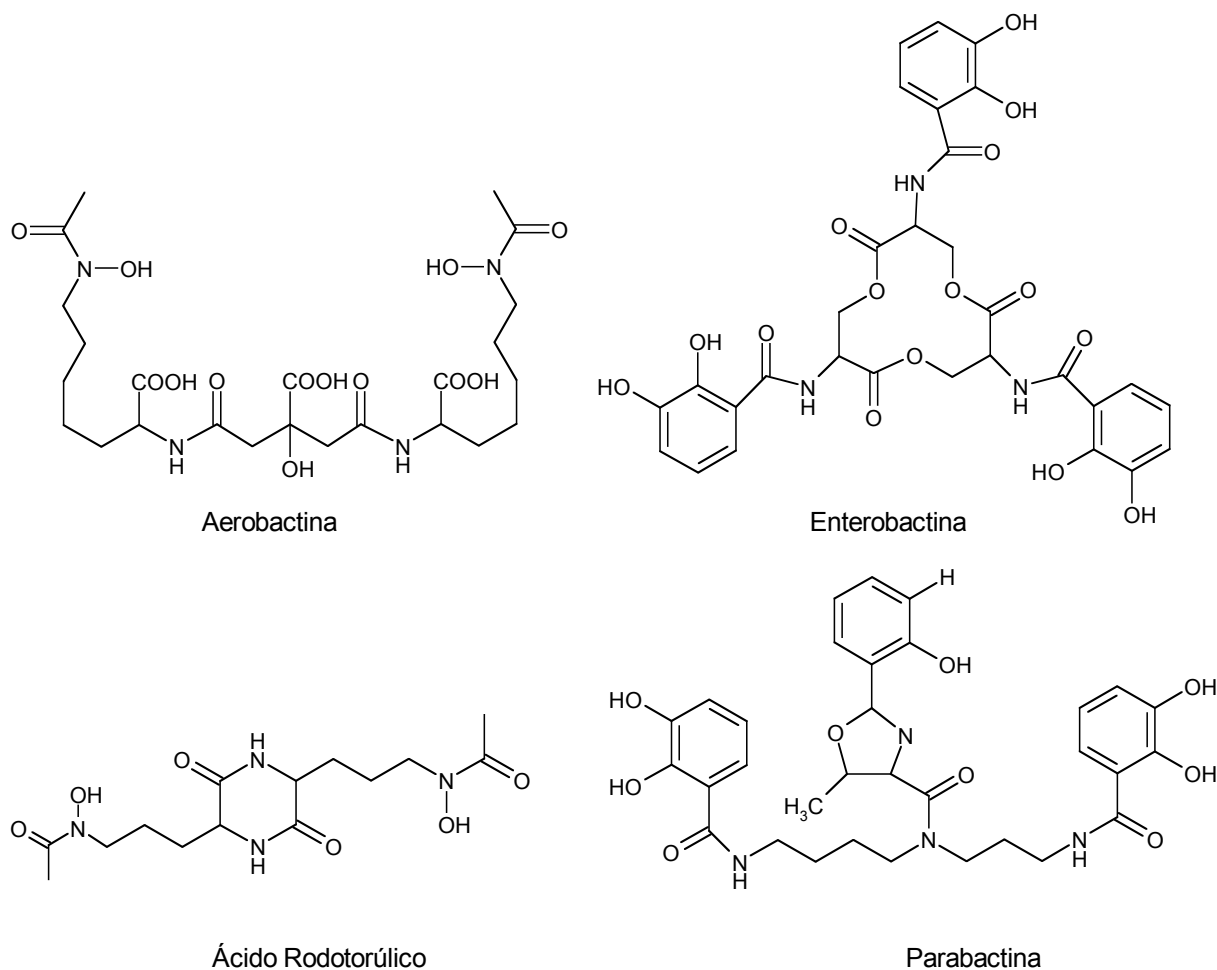


Figura 2. Sideróforos empleados como inhibidores de corrosión.

## II.9 Importancia biológica del hierro y biodisponibilidad

El hierro es el elemento 26 en la tabla periódica, es el segundo metal más abundante en el planeta (después del aluminio) y el cuarto más abundante en la corteza terrestre. Tiene una posición media en la primera serie de elementos de transición [(así designado porque sus iones tienen incompleto el orbital d), lo que implica que el hierro tiene la posibilidad de tener varios estados de oxidación (de  $-II$  a



+VI)] (Cotton y Wilkinson, 1980). Los estados principales, sin embargo, son +II (d6) y +III (d5), aunque varias monooxigenasas dependientes de hierro generan valencias intermedias altamente reactivas (Fe IV y Fe VI) durante su ciclo catalítico. También puede adoptar el potencial redox necesario (-300 a +700 mV). Mientras que el Fe<sup>2+</sup> es extremadamente soluble en agua, el Fe<sup>3+</sup> es insoluble en agua (Kps = 10<sup>-39</sup> M y a pH 7.0, [Fe<sup>3+</sup>] = 10<sup>-18</sup> M), por lo que sólo pueden lograrse concentraciones significativas de Fe<sup>3+</sup> en agua mediante la formación de complejos (Cooper *et al.*, 1978).

La importancia del hierro en los mecanismos bioquímicos básicos celulares responde a la potencialidad funcional del mismo. La estructura electrónica de este elemento, como ya se ha mencionado previamente, experimenta cambios reversibles a través de varios estados de oxidación y la poderosa activación catalítica que esto representa para las reacciones de óxido-reducción quizá determinó que el hierro fuera seleccionado favorablemente como cofactor de procesos metabólicos de organismos terrestres y oceánicos, volviéndose esencial con relación a otros elementos disponibles en etapas muy iniciales en la evolución de la vida (Schryvers y Stojiljkovic, 1999). Algunos de los procesos en los que participa este metal son: fotosíntesis, fijación de N<sub>2</sub>, metanogénesis, producción y consumo de H<sub>2</sub>, respiración, transporte de oxígeno, regulación de la expresión génica y biosíntesis de ADN.

Con excepción de ciertos microorganismos, como *Clostridium perfringens*, que crea pequeños microambientes para reducir el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, o aquellos como *Lactobacillus plantarum*, que utilizan manganeso o cobalto como oligoelemento esencial en lugar de hierro (Ratledge y Dover, 2000), el resto de los microorganismos

deben sobreponerse al problema de solubilidad y toxicidad del hierro. El primer problema queda resuelto cuando los microorganismos logran solubilizar el hierro. Químicamente tienen tres formas de conseguirlo: quelación (a través de sideróforos), reducción (por medio de reductasas férricas) y protonación (utilizando sistemas poliméricos de baja afinidad) (Guerinot, 1994). Los mecanismos más ampliamente utilizados son la quelación y la reducción (tabla 6).

Tabla 6. Estrategias de bacterias y hongos para adquirir hierro.

<b>Estrategia</b>	<b>Ejemplos</b>
Reducir Fe <sup>3+</sup> y transportar Fe <sup>2+</sup>	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Legionella</i> spp <i>Streptococcus</i> spp <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Uso de sideróforos	Muchos géneros de bacterias y hongos
Adquisición directa de hospedador	
Transferrina	<i>Neisseria</i> spp <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Helicobacter pylori</i>
Lactoferrina	<i>Vibrio</i> spp
Hemo	<i>Yersinia</i> spp

El segundo problema, la toxicidad, se resuelve regulando la adquisición celular del hierro. El hierro en exceso resulta tóxico, debido a su capacidad de catalizar la reducción de oxígeno para formar anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical oxidrilo, radicales libres que son potentes agentes oxidantes.

En ambientes terrestres, la adquisición de hierro se realiza por sideróforos, no existiendo problemas de limitación. En ambientes marinos no sucede lo mismo: el hierro es un nutriente limitante para la producción primaria de clorofila, lo cual influye en el ciclo del carbono y la biodiversidad marina, siendo indiscutiblemente el principal metal de transición, por su baja abundancia (Barbeau *et al.*, 2001). Estos ambientes se caracterizan por los bajos niveles de hierro (aproximadamente, entre 20 y 50 pM), altas concentraciones de nitratos y baja concentración de clorofila (Butler, 1998). Más del 99% de los iones férricos se encuentran formando complejos con ligandos orgánicos, teniendo constantes de afinidad en estos medios del orden de  $10^{19}$  a  $10^{22}$  M<sup>-1</sup> (Macrellis *et al.*, 2001).

## **II.10 Sistemas de captación de hierro**

Los microorganismos presentan diversas formas de captación de hierro, entre ellas se encuentran las siguientes:

### **II.10.1 Transporte de Fe<sup>2+</sup> por reducción de Fe<sup>3+</sup>**

Muchas bacterias poseen este tipo de sistema de transporte de hierro (Feo), el cual es bastante diferente de los sistemas dependientes de sideróforos. Este sistema funciona cuando las condiciones de oxígeno son bajas y la concentración de ión férrico también, pero la de ión ferroso es estable. Investigaciones

realizadas con *Salmonella* y *Helicobacter pylori* indican que el sistema Feo es dependiente de una ATPasa o GTPasa (Velayudhan *et al.*, 2002). Se ha registrado en *E. coli* y *H. pylori* una actividad reductasa para la conversión de ión férrico extracelular a ión ferroso, aunque aún no se han definido estos sistemas en otras bacterias (Coward, 2002).

### **II.10.2 Adquisición directa del hospedador**

Los problemas que afrontan los microorganismos en la adquisición de suficiente hierro de su entorno son particularmente agudos en el caso de los microorganismos patógenos. El hospedador limita específicamente la disponibilidad de hierro como parte de su defensa innata contra la invasión de los microorganismos, empleando proteínas transportadoras de hierro (transferrina y lactoferrina) para reducir los niveles de hierro extracelular hasta concentraciones de alrededor de  $10^{-18}$  M (sin embargo, niveles suficientes para el crecimiento bacteriano). Además, el hospedador produce proteínas que se enlazan con grupo hemo y hemoglobina (hemopexina y haptoglobina), con lo que limitan la disponibilidad del grupo hemo como fuente de hierro para microorganismos patógenos. Los patógenos usan frecuentemente niveles bajos de hierro en el ambiente como señal para la inducción de genes de virulencia (Andrews *et al.*, 2003).

### II.10.3 Sideróforos

Los microorganismos producen y secretan sideróforos para poder adquirir hierro. Se pueden definir como pequeñas moléculas peptídicas (entre 500 y 2000 Da), rápidamente ensambladas mediante vías metabólicas cortas y definidas (Boukhalifa y Crumbliss, 2002). Estas moléculas contienen cadenas laterales y grupos funcionales que proporcionan afinidades ( $K_{af}$  entre  $10^{22}$  y  $10^{50}$ ) a los ligandos para coordinarse con el ión férrico (Neilands, 1981 y 1995). Los sideróforos son sintetizados generalmente por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas (Raymond *et al.*, 1984) en respuesta a la restricción de hierro, aunque algunas veces (como es el caso de las micobactinas, producidas por micobacterias) están asociados con el desarrollo celular (Ratledge y Dover, 2000). Con base en la naturaleza química de los sitios de coordinación con hierro de los sideróforos microbianos, éstos se clasifican en hidroxamatos, catecoles y  $\alpha$ -hidroxiácidos (figura 3) (Winkelmann, 1991a y 2002).

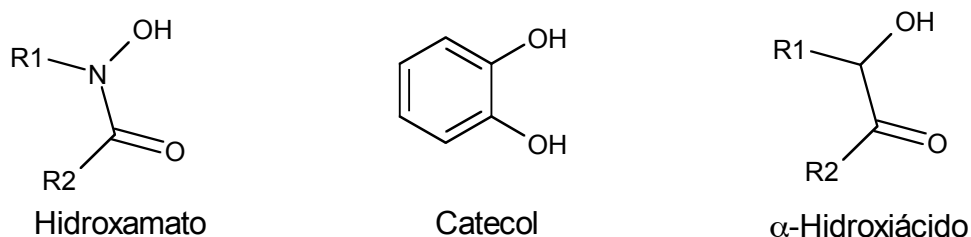


Figura 3. Grupos funcionales característicos de sideróforos.

Con la purificación y caracterización continua de nuevos sideróforos, la variedad de estructuras resueltas se ha extendido y ahora incluyen grupos de oxazolina, tiazolina, hidroxipiridinona,  $\beta$ -hidroxiácidos y  $\alpha$ -cetoácidos. La densidad del ligando (número de átomos coordinantes por molécula) constituye una característica importante de los sideróforos, abarcando desde quelatos bidentados hasta hexadentados (Schwarzenbach y Schwarzenbach, 1963).

Como se verá a continuación, aunque existe una gran diversidad en la cantidad de sideróforos, hay también algunas similitudes:

- i) Contienen átomos donadores de electrones (frecuentemente oxígeno y en menor grado, nitrógeno o azufre)
- ii) Su forma es termodinámicamente estable, asocian especies  $\text{Fe}^{3+}$  de alto espín y tienen un potencial de reducción en el rango de entre  $-0.33$  V (triacetilfusarinina) y  $-0.75$  V (enterobactina) (Pecoraro *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1985).
- iii) La configuración electrónica preferida del  $\text{Fe}^{3+}$  en complejos  $\text{Fe}^{3+}$ /sideróforo es para obtener estructuras octaédricas alrededor del Fe, en el cual uno de cinco orbitales 3d está ocupado por un electrón. Esta geometría es relativamente fácil de distorsionar, porque el ion férrico no tiene una preferencia direccional debido a la estabilización del campo del ligando.

Un listado de sideróforos producidos por diversas bacterias y hongos es presentado en la tabla 7 y 8.

Tabla 7. Sideróforos bacterianos y los microorganismos productores.

Sideróforo	Microorganismo	Referencia
Acinetobactina	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994 <sup>a</sup>
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	
Acinetoferrina	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Okujo <i>et al.</i> , 1994a
Aerobactina	<i>Aerobacter aerogenes</i>	Williams y Warner, 1980
	<i>Escherichia coli</i>	Stuart <i>et al.</i> , 1986
	<i>Shigella flexneri</i>	Lawlor y Payne, 1984
	<i>Shigella boydii</i>	
Agrobactina	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Neilands JB, 1983
Alcaligina	<i>Alcaligenis xylosoxidans</i>	Nishio <i>et al.</i> , 1988
	<i>Bordetella pertussis</i>	Moore <i>et al.</i> , 1995
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Brickman <i>et al.</i> , 1996
Alterobactina A y B	<i>Alteromonas luteoviolacea</i>	Reid <i>et al.</i> , 1993
Aminoquelina	<i>Azobacter vinelandii</i>	Page y Vontigerstrom, 1988
Amonobactina	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Telford y Raymond, 1997
Anguibactina	<i>Vibrio angillarum</i>	Actis <i>et al.</i> , 1986
Arthrobactina	<i>Arthrobacter pascens</i>	Linke <i>et al.</i> , 1972
Aquaquelina D	<i>Halomonas aguamarina</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2001
Azotobactina	<i>Azobacter vinelandii</i>	Demange <i>et al.</i> , 1988
Azotoquelina	<i>Azobacter vinelandii</i>	Sevinc y Page, 1992
Azoverdina	<i>Azomonas macrocygenes</i>	Linget <i>et al.</i> , 1992
Bisucaberina	<i>Alteromonas hyloplantis</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 1987
Cepabactina	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Meyer <i>et al.</i> , 1989
Cepaciaquelina	<i>Burkholderia cepacia</i>	Barelmann <i>et al.</i> , 1996
Chryseomonina	<i>Chryseomonas luteola</i>	Adolphs <i>et al.</i> , 1996

Continuación tabla 7

Sideróforo	Microorganismo	Referencia
Chrysobactina	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Ehlert y Taraz, 1994
	<i>Erwinia carotovora</i>	Persmarck <i>et al.</i> , 1989
	<i>Serratia marcescens</i>	
	<i>Chryseomonas luteola</i>	
Corinebactina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Winkelmann, 1991a
Corrugatina	<i>Pseudomonas corrugada</i>	Risse <i>et al.</i> , 1998
Enterobactina	<i>Escherichia coli</i>	Barghouti <i>et al.</i> , 1989
	<i>Salmonella typhimurium</i>	
	<i>Shigella spp</i>	
	<i>Klebsiella spp.</i>	Pollack y Neilands, 1970
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Schmitt y Payne, 1991.
	<i>Aerobacter aerogenes</i>	
	<i>Serratia marcescens</i> W225.	
Esquizokina	<i>Bacillus megaterium</i>	Mullis <i>et al.</i> , 1971
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Budzikiewicz <i>et al.</i> , 1997
Estafiloferrina A y B	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meiwes <i>et al.</i> , 1990
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Drechsel <i>et al.</i> , 1993
Exoquelina	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Gobin y Hortwitz, 1996
Exoquelina MN	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	Sharman <i>et al.</i> , 1995
Exoquelina MS	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Yu <i>et al.</i> , 1998
Exoquelina MB	<i>Mycobacterium boris</i>	Fiss <i>et al.</i> , 1994
Ferribactina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hohlneicher <i>et al.</i> , 1992 y 1995
Ferroxiaminas (A1,A2,B,C,D1, D2, E,F,G,H)	<i>Streptomyces pilosus</i>	
	<i>Streptomyces griseus</i>	Raymond <i>et al.</i> , 1984
	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	
	<i>Streptomyces olivaceus</i>	
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Winkelmann, 1991a
	<i>Arthrobacter simplex</i>	
	<i>Vibrio sp</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2001



Continuación tabla 7

Sideróforo	Microorganismo	Referencia
Ferritiocina	<i>Streptomyces</i>	Naegeli y Zahner, 1980
Ferrosamina A	<i>Erwinia rapontici</i>	Feistner <i>et al.</i> , 1983
Fluvibactina	<i>Vibrio fluviales</i>	Yamamoto, 1993
Maduraferrina	<i>Actinomadura madurae</i>	Keller-Schierlein <i>et al.</i> , 1988
Marinobactina E	<i>Marinobacter sp</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2001
Micobactina	<i>Mycobacteria</i>	Snow, 1970
Micobactina T	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Gobin y Hortwitz, 1996
Mixoquelina	<i>Angiococcus disciformis</i>	Kunze <i>et al.</i> , 1989
Nanoquelina	<i>Nannocystis excedens</i>	Kunze <i>et al.</i> , 1992
N-desoxiequizokina	<i>Bacillus megaterium</i>	Hu y Boyer, 1995
Nocobactina	<i>Nocardia asteroides</i>	Ratledge y Snow, 1974
	<i>Nocardia brasiliensis</i>	
Ornibactina	<i>Burkholderia cepacia</i>	Meyer <i>et al.</i> , 1995
Parabactina	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Neilands, 1983
Petrobactina	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Barbeau <i>et al.</i> , 2002
		Hickford <i>et al.</i> , 2004
	<i>Bacillus anthracis</i>	Koppisch <i>et al.</i> , 2005
Protoquelina	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Cornish y Page, 1995
Putrebactina	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Ledyard y Butler, 1997
Pioquelina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cox <i>et al.</i> , 1981
Pioverdina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Budzikiewicz, 1997
	<i>Pseudomonas putida</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	
Rizobactina	<i>Rhizobium meliloti</i>	Smith y Neilands, 1984
Enantio-Rizoferrina	<i>Ralstonia pickettii</i>	Munzinger, 1999
Serratioquelina	<i>Serratia marcescens</i>	Ehlert <i>et al.</i> , 1994
Shizoquenina	<i>Bacillus subtilis</i>	Schneider y Klaus, 1993
	<i>Bacillus anthracis</i>	Cendrowski <i>et al.</i> , 2004
	<i>Bacillus megaterium</i>	Hu y Boyer, 1996

Continuación tabla 7

Sideróforo	Microorganismo	Referencia
Spirilobactina	<i>Azospirillum brasiliense</i>	Bachhawat y Ghosh, 1987
Vibriobactina	<i>Vibrio cholerae</i>	Griffiths, 1984
Vibrioferina	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994b
Vicibactina	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Dilwort <i>et al.</i> , 1998
Vulnibactina	<i>Vibrio vulnificus</i>	Okujo <i>et al.</i> , 1994b
Yersiniabactina	<i>Yersinia pestis</i>	Haag, 1993
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Perry <i>et al.</i> , 1999

Tabla 8. Sideróforos fúngicos y los microorganismos productores.

Sideróforo	Microorganismo	Referencia
6-L-Alaninferrirubina	<i>Aspergillus ochraceous</i>	Hossain <i>et al.</i> , 1997
Coprogeno	<i>Penicillium sp</i>	Hesseltine <i>et al.</i> , 1952
	<i>Neurospora crassa</i>	
Ácido dimerómico	<i>Verticillium dahliae</i>	Harrington y Neilands, 1982
	<i>Gliocladium virens</i>	Jalal <i>et al.</i> , 1986
Ácido rodotorúlico	<i>Rhodotorula rubra</i>	McCafferty y McArdle, 1995
Ferricromo	<i>Ustilago sphaerogena</i>	Winkelmann, 1991a
Ferricrisina	<i>Aspergillus melleus</i>	Winkelmann, 1991a
	<i>Aspergillus ochraceous</i>	Jalal <i>et al.</i> , 1984
Ferricrosina	<i>Aspergillus sp</i>	Wong <i>et al.</i> , 1983
	<i>Colletrichum gloeosporioides</i>	Ohra <i>et al.</i> , 1995
Ferrirodina	<i>Aspergillus ochraceous</i>	Jalal <i>et al.</i> , 1985
Ferrirubina	<i>Penicillium variable</i>	Winkelmann, 1991a
	<i>Aspergillus ochraceous</i>	Jalal <i>et al.</i> , 1984
Fusarina A y B	<i>Fusarium roseum</i>	Emery, 1965

Continuación tabla 8

Sideróforo	Microorganismo	Referencia
Fusarina C	<i>Fusarium cubense</i>	Winkelmann, 1991a
	<i>Giberella fujikuroi</i>	
Hidroxicoprogeno	<i>Alternaria longipes</i>	Winkelmann, 1991a
Isotriornicina	<i>Epicoccum purpurascens</i>	Frederick <i>et al.</i> , 1982
Malonicromo	<i>Fusarium roseum</i>	Emery, 1980
N-dimetilcoprogeno	<i>Alternaria alternata</i>	Winkelmann, 1991a
Neocoprogeno I y II	<i>Curvularia lunata</i>	Hossain <i>et al.</i> , 1987
Rizoferrina	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Shenker <i>et al.</i> , 1995
	<i>Rhizopus microsporus</i>	Drechsel <i>et al.</i> , 1991
Sideroquelina	<i>Nocardia</i>	Liu <i>et al.</i> , 1981
Triacétilfusarina C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hossain <i>et al.</i> , 1980
Triornicina	<i>Epicoccum purpurascens</i>	Frederick <i>et al.</i> , 1982

Hasta la fecha han sido caracterizados y clasificados químicamente más de 500 sideróforos (Andrews *et al.*, 2003; Winkelmann, 2002). Ahora se sabe que la mayoría de las bacterias excretan múltiples sideróforos, de los cuales algunos son específicos (siendo quizás más eficientes bajo circunstancias particulares). Por ejemplo, algunas cepas de *E. coli* producen enterobactina y aerobactina; la aerobactina compite exitosamente *in vivo* por el Fe<sup>3+</sup> con las proteínas ligantes de Fe<sup>3+</sup> del hospedador, mientras que la enterobactina no puede hacerlo, debido a que se inactiva con la albúmina del suero (Konopka y Neilands, 1984). Esta evidencia está soportada experimentalmente, demostrándose el papel de la aerobactina como un factor asociado a la virulencia (Williams y Warner, 1980; Nassif y Sansonetti, 1986).

La producción de sideróforos diferentes quizás otorgue al microorganismo la capacidad de habitar ambientes diferentes. La enterobactina y la aerobactina son sintetizados exclusivamente por bacterias de la familia Enterobacteriaceae, que incluye especies como *E. coli*, *Shigella* (Schmitt y Payne, 1991), *Salmonella* (Hantke *et al.*, 2003), *Yersinia* y *Klebsiella*. Las ferrioxaminas también son producidas por bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo diferentes especies de *Streptomyces*, *Erwinia herbicola* o *Pseudomonas stutzeri*.

Los sideróforos fúngicos contienen comúnmente grupos hidroxamato como quelantes de  $Fe^{3+}$ . Sin embargo, con la caracterización continua de nuevos sideróforos, se ha encontrado el grupo  $\alpha$ -hidroxiácido en la rizoferrina, producida por hongos pertenecientes al grupo de los zigomicetos, como en el caso de algunas cepas de *Rhizopus* (Baakza *et al.*, 2004). También se ha reportado la producción de sideróforos fenolato-catecol por basidiomicetos (Milagres *et al.*, 1999).

### **II.10.3.1 Hidroxamatos**

Los primeros compuestos reconocidos como agentes microbianos transportadores de hierro fueron las ferrioxaminas y los ferricromos. Los sideróforos tipo hidroxamato son producidos por hongos y bacterias. Los hidroxamatos bacterianos se sintetizan a partir de alquilaminas y los fúngicos tienen como base la ornitina.

Los sideróforos de los tipos ferricromo, coprogeno, ferrioxamina, fusarina y micobactina han sido estudiados constantemente y revisados, por lo que se sabe que la estructura de hidroxamato es un ligando bidentado formado por un grupo acil y un grupo N-hidroxi; todos los hidroxamatos se originan de la L-ornitina la cual está N $\delta$ -hidroxilada o N $\delta$ -acilada. En la naturaleza, los sideróforos hidroxamatos son predominantemente hexadentados. En bajas concentraciones, un ligando hexadentado es un quelato mucho más poderoso que los ligandos de baja densidad.

El grupo hidroxamato tiene dos híbridos de resonancia principales, uno con una carga negativa en un sólo átomo de oxígeno y una carga positiva para el nitrógeno. El otro con una carga negativa para el oxígeno y positiva para el nitrógeno pero con la liberación del hidrógeno. La naturaleza de los sustituyentes carbonil y nitrógeno, R1 y R2, juega un papel importante en la distribución de la carga. La estabilidad del complejo metal-sideróforo es importante cuando R1 y R2 promueven la donación de electrones desde el nitrógeno al oxígeno del carbonilo; así ambos átomos de oxígeno están cargados negativamente (Stintzi y Raymond, 2001).

Los sideróforos de la familia ferricromo son hexapéptidos cíclicos en los cuales un tripéptido (de glicina, serina o alanina) está unido al segundo tripéptido de N $\delta$ -acil-N $\delta$ -hidroxiornitina. Estos compuestos son producidos exclusivamente por hongos como los basidiomicetos y ascomicetos, el ácido rodotorúlico tetradentado es el sideróforo primario de los basidiomicetos. Este ácido es un hidroxamato compuesto por la dicetopiperazina de la

Nδ-acetil-L-Nδ-hidroxiornitina. El ácido dimerómico es un derivado del ácido rodotorúlico y ambos sideróforos forman complejos diméricos de dos iones de hierro y tres moléculas de sideróforo (Stintzi y Raymond, 2001). La figura 4 muestra algunas estructuras de sideróforos tipo hidroxamato.

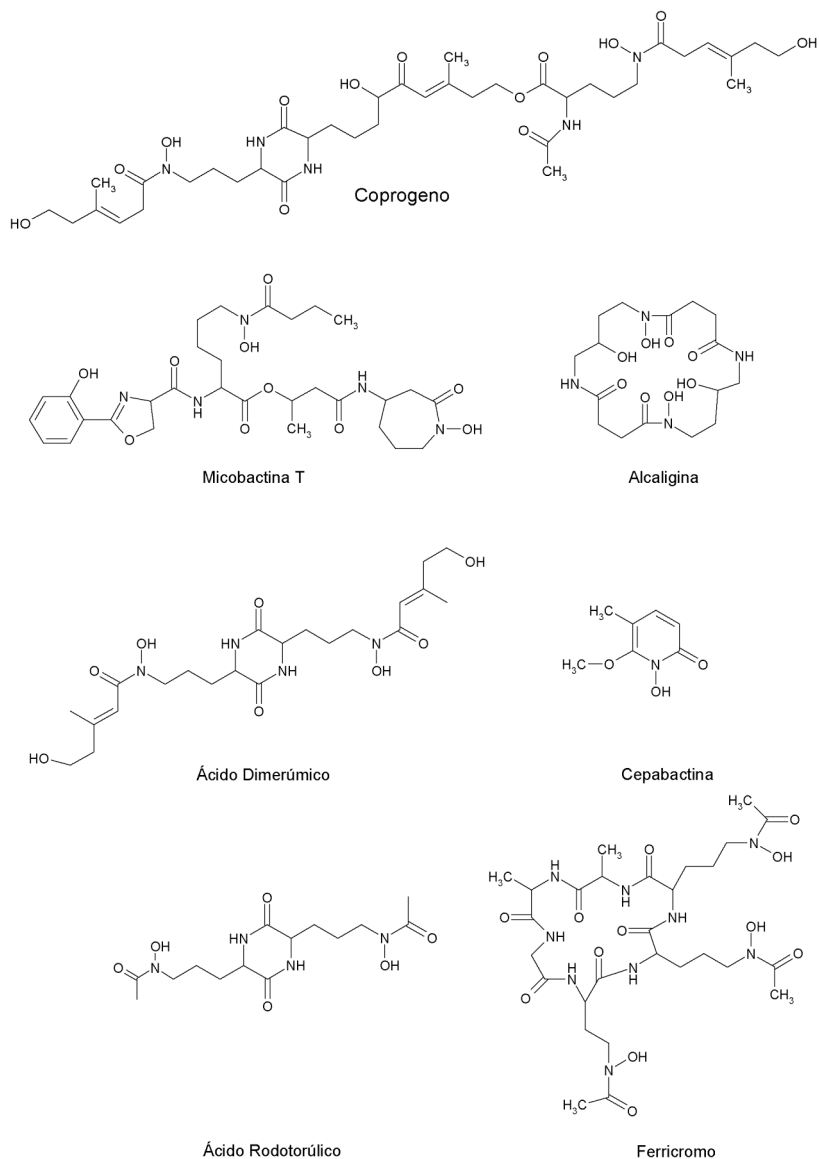


Figura 4. Sideróforos tipo hidroxamato: coprogeno de *Neurospora crassa*, micobactina T de *Mycobacterium tuberculosis*, alcaligina de *Alcaligenes xylosoxidans*, cepabactina de *Pseudomonas cepacia*, ácido dimerómico de *Verticillium dahliae*, ácido rodotorúlico de *Rhodotorula rubra*, ferricromo de *Ustilago sphaerogena*.

### II.10.3.2 Catecoles

De todos los sideróforos de tipo catecol, la enterobactina producida por Enterobacteriaceae como *E. coli* ha recibido la mayor atención. La mayor información sobre esta molécula se tiene en las áreas de la termodinámica, transporte microbiano, síntesis de sideróforos tipo catecol y vías biosintéticas. La molécula de enterobactina posee una simetría  $C_3$  y está compuesta por tres grupos de ácido 2,3-dihidroxibenzóico, cada uno enlazado a un grupo L-serina. Las tres serinas forman un esqueleto macrocíclico de trilactona. La coordinación con el metal a pH neutro ocurre por medio de los seis oxígenos del catecol.

Un sideróforo relacionado, la corinebactina (producida por *Corynebacterium glutamicum*) también ha sido caracterizado. La corinebactina es otro ejemplo de un sideróforo que contiene una estructura de trilactona, además está compuesta de tres unidades idénticas de ácido 2,3-dihidroxibenzóico, glicina y L-treonina.

También se han identificado varios catecoles lineales, incluyendo protoquelina, cepaciaquelina, azotobactina y aminoquelina. Todos ellos, excepto la cepaciaquelina (de *Burkholderia cepacia*), son producidos por *Azotobacter vinelandii*. La protoquelina contiene tres unidades de ácido 2,3-dihidroxibenzóico enlazado a la estructura lineal formada por la amida de lisina con diaminobutano. Tanto cepaciaquelina como azotoquelina pueden ser considerados como productos de degradación de la protoquelina.

La aminoquelina contiene sólo una unidad de ácido 2,3-dihidroxibenzóico y puede ser considerada como una parte complementaria de la azotoquelina para formar protoquelina. Generalmente, en este tipo de compuestos, una densidad alta del ligando genera un fuerte complejo hierro-sideróforo. Aún cuando la constante de formación de un complejo hierro-sideróforo es la misma para ligandos de diferente densidad, puede favorecerse la formación de un complejo hierro-sideróforo hexadentado sobre uno bidentado o tetradentado (Khodr *et al.*, 2002).

Otros catecoles contienen la espermidina triamina como estructura principal, incluyéndose en este grupo la parabactina, agrobactina, vibriobactina y fluvibactina. Los cuatro tipos de Bis (catecoles) amonabactinas producidas por *Aeromonas hydrophila* están compuestas por dos lisinas, una fenilalanina o triptofano y una glicina opcional. Los catecoles son producidos únicamente por bacterias (Stintzi y Raymond, 2001).

La figura 5 muestra algunas estructuras de sideróforos tipo catecol.



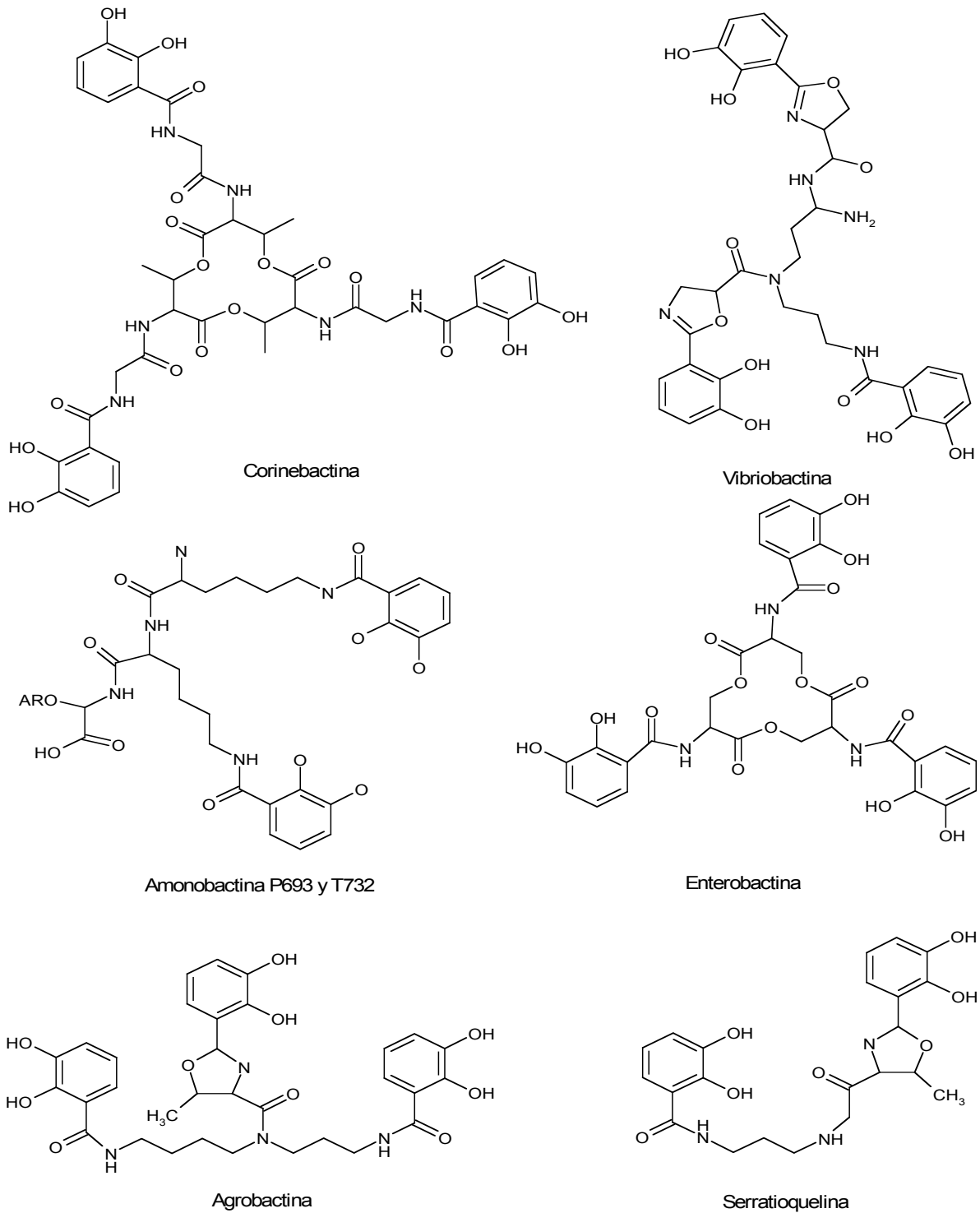


Figura 5. Sideróforos tipo catecol: corinebactina de *Corynebacterium glutamicum*, vibriobactina de *Vibrio cholerae*, enterobactina de *E. coli*, amonobactina de *Aeromonas hydrophila*, agrobactina de *Agrobacterium tumefaciens*, serratioquelina de *Serratia marcesens*.

### II.10.3.3 $\alpha$ -hidroxiácidos

Los  $\alpha$ -hidroxiácidos son producidos por hongos pertenecientes al grupo de los zigomicetos (mucorales) y unas pocas bacterias, como *Rhizobium meliloti* y *Staphylococcus hyicus*. Coordinan el hierro por medio de grupos hidroxilo y carboxilo (Drechsel *et al.*, 1995).

Existen muy pocos sideróforos caracterizados que contengan grupos carboxilato y  $\alpha$ -hidroxi como quelantes de hierro; ejemplos de ellos son la estafiloferrinas A y B, producidas por estafilococos, la rizobactina, producida por *Rhizobium meliloti*, y la rizoferina, producida por hongos mucorales.

La estafiloferrina A, producida por *Staphylococcus hyicus*, está formada por D-ornitina sustituida en N-1 y N-5 por enlaces amida unida a los grupos  $\beta$ -hidroxi de dos moléculas de citrato. Este sideróforo forma un complejo 1:1 con el ión férrico.

La estafiloferrina B ha sido aislada como un producto minoritario de *Staphylococcus hyicus*. Este sideróforo consiste de una estructura de ácido L-diaminopropionico, citrato, etilendiamina y ácido  $\alpha$ -cetoglutárico. La rizoferina es estructuralmente similar a la estafiloferrina A, faltándole sólo un residuo de carboxilato en su estructura (Stintzi y Raymond, 2001). La figura 6 muestra algunas estructuras de sideróforos tipo hidroxiácidos.

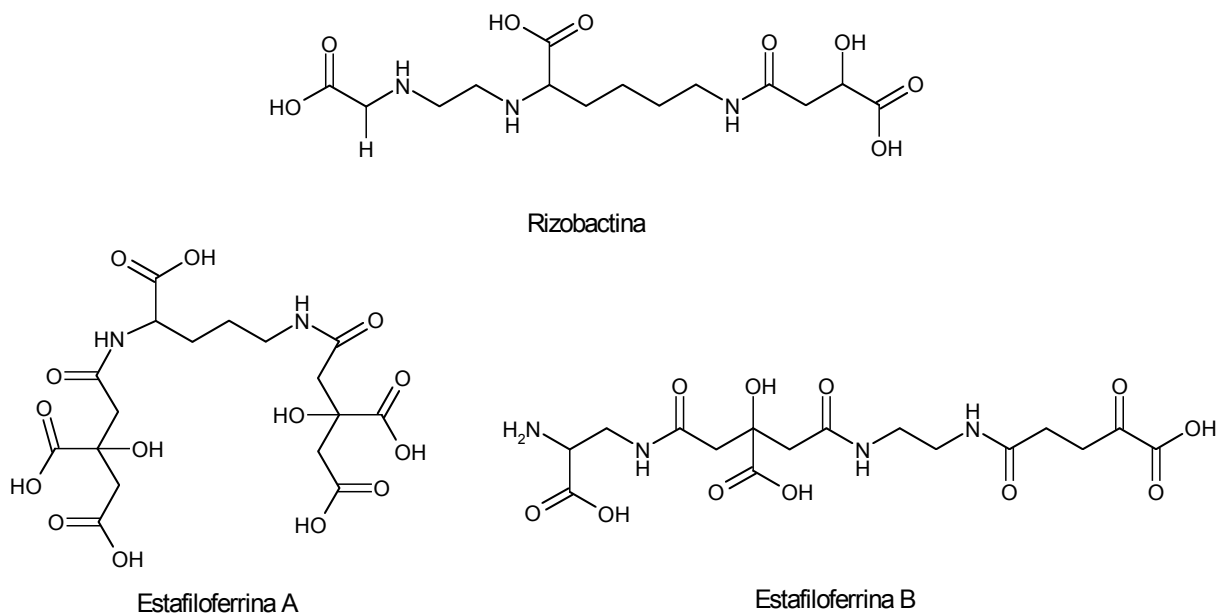


Figura 6. Sideróforos tipo  $\alpha$ -hidroxiácido: rizobactina de *Rhizobium meliloti*, estafiloferriina A y B de *Staphylococcus hyius*.

### II.10.3.4 Mezclas

Existen sideróforos que contienen mezclas de los grupos funcionales antes mencionados y otros que contienen estructuras poco comunes. Se ha reportado el aislamiento de varios sideróforos con la mezcla carboxilato/hidroxamato, entre los que se incluyen aerobactina, artrobactina, shizoquenina, acinetoferrina y nanoquelina.

La aerobactina es un sideróforo lineal con una estructura de citrato que contiene dos ácidos hidroxámicos y un ácido  $\alpha$ -hidroxicarboxílico como quelatos. Ha sido aislada de *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas sp* y muchas otras bacterias (Buyer *et al.*, 1991).

La artrobactina, producida por *Arthrobacter*, difiere de la aerobactina solamente en la falta de dos carboxilatos. La shizoquenina contiene una estructura de citrato sustituida con 1-amino-3-(N-acetil-N-hidroxilamino) propano (Budzikiewics, 2005).

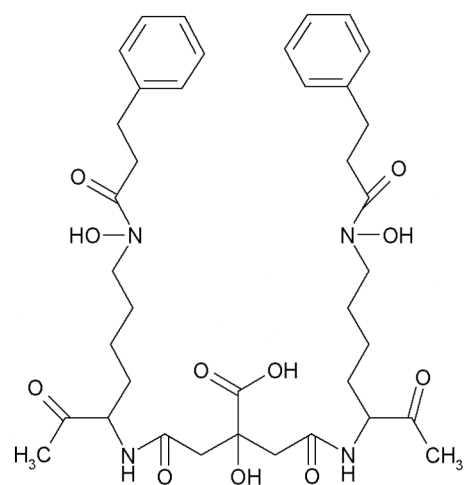
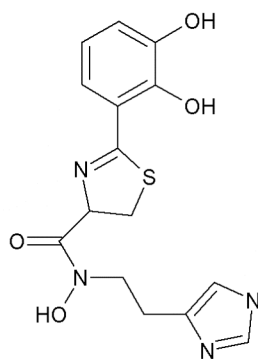
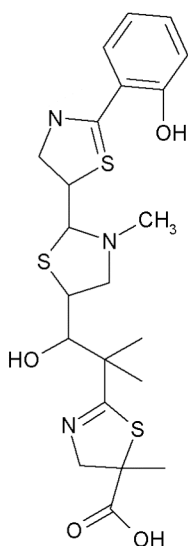
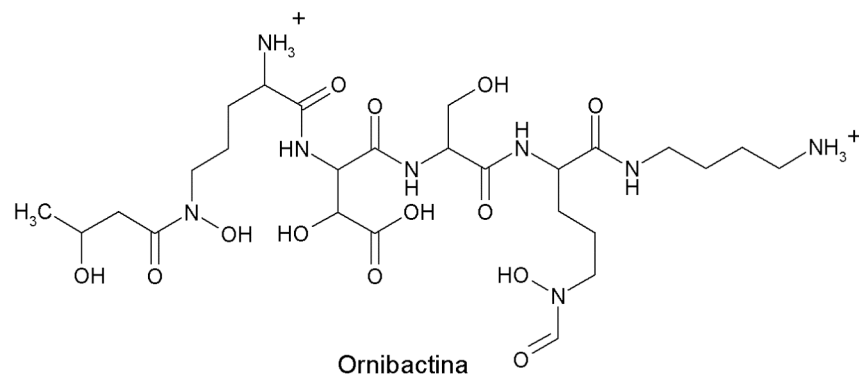
La acinetoferrina ha sido purificada del caldo de cultivo de *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906. Es un derivado del ácido cítrico en el cual los dos grupos carboxílicos son simétricamente sustituidos con (E)-2-ácido octanoíco-N<sup>1</sup>-hidroxi-N<sup>3</sup>-(E)-2-octenoildiaminopropano.

Las nanoquelinas A, B y C son tres sideróforos hidroxamato-citrato producidas por la mixobacteria *Nannocystis exedens* cepa Na e485. Las nanoquelinas contienen una estructura simétrica de ácido cítrico unida a dos unidades de N<sup>6</sup>-cinamoil-N<sup>6</sup>-hidroxi-L-lisina (Stintzi y Raymond, 2001).

Las alterobactinas A y B han sido aisladas de *Alteromonas luteoviolacea* y son los primeros sideróforos de origen marino caracterizados estructuralmente. Estos sideróforos tienen una estructura peptídica cíclica con un catecol y dos unidades de hidroxicarboxilatos como grupos quelantes de hierro (Reid *et al.*, 1993).

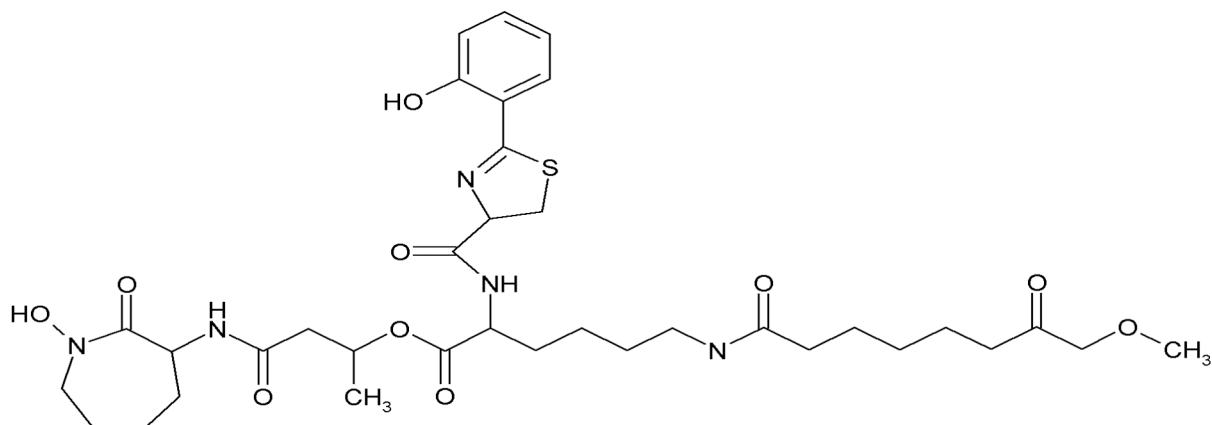
La petrobactina y petrobactina sulfonada fueron aisladas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* tienen una estructura base de citrato y **bis-espermidina** y dos grupos de ácido 2,3-dihidroxibenzóico, además de un grupo carboxilato (Barbeau *et al.*, 2002; Bergeron *et al.*, 2003). La petrobactina sulfonada tiene una sustitución 3,4-dihidroxi por el grupo SO<sub>3</sub>H (Hickford *et al.*, 2004).

La figura 7 muestra algunas estructuras de sideróforos que contienen los principales grupos funcionales en mezcla.

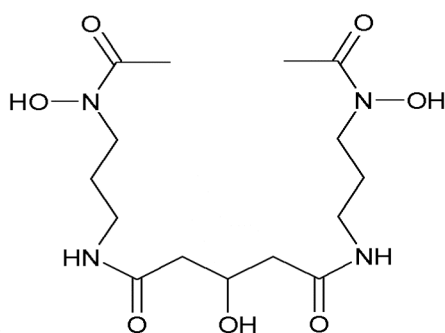


*continúa en la siguiente página.*

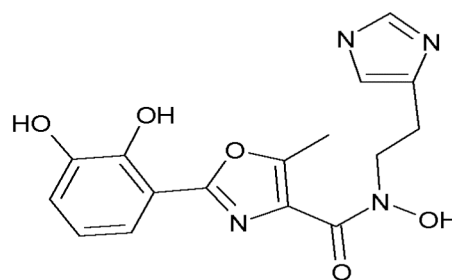
## Continuación figura 7



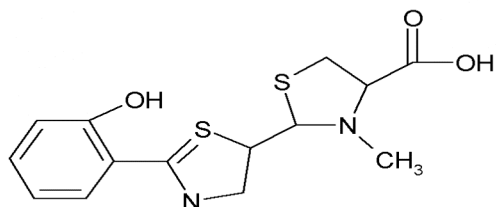
Exoquelina



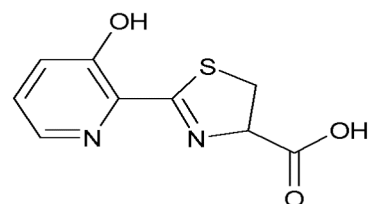
Shizoquenina



Acinetobactina



Pioquelina



Ferritocina

Figura 7. Sideróforos en mezcla: ornibactina de *Burkholderia cepacia*, yersiniabactina de *Yersinia pestis*, anguibactina de *Vibrio angillarum*, nanoquelina de *Nannocystis excedens*, exoquelina de *Mycobacterium tuberculosis*, shizoquenina de *Bacillus subtilis*, acinetobactina de *Acinetobacter baumannii*, pioquelina de *Pseudomonas aeruginosa*, ferritocina de *Streptomyces*.

### II.10.3.5 Anfifílicos

Los sideróforos son generalmente polares, aunque recientemente se han reportado algunos tipos de sideróforos anfifílicos, entre ellos las marinobactinas y las aquaquelinas, los cuales son producidos por géneros distintos de bacterias marinas (Martínez *et al.*, 2000). Las marinobactinas, producidas por *Marinobacter sp* cepa DSM40M6, están compuestas por una estructura base de 6 aminoácidos peptídicos que coordinan el hierro por medio de dos grupos hidroxamato y un residuo de ácido  $\beta$ -hidroxi-aspartico; el residuo N-terminal contiene un apéndice de una serie de ácidos grasos, en un rango de C-12 a C-16. Las aquaquelinas son producidas por *Halomonas aquamarina* y están compuestas por una estructura base de 7 aminoácidos peptídicos con un apéndice N-terminal de ácido graso en el rango de C-12 a C-14. El tipo de ácidos grasos encontrados en las marinobactinas y aquaquelinas son cadenas alifáticas saturadas e insaturadas, con un doble enlace en la configuración *cis*. Se ha demostrado que las marinobactinas pueden estar dentro de vesículas semisintéticas, lo que indica que estos sideróforos anfifílicos podrían potencialmente asociarse con membranas bacterianas como un medio de prevención de la difusión de los mismos. Aunque las aquaquelinas y marinobactinas pueden asociarse a membranas biológicas, son muy solubles en agua (Martínez *et al.*, 2003).

Los sideróforos producidos por las micobacterias, un grupo de bacterias Gram positivas, están asociados a la membrana bacteriana y no son secretados al medio de cultivo. Las micobactinas producidas por *Mycobacter*

son un tipo de sideróforos lipídicos que difieren principalmente en la longitud de la cadena de ácidos grasos (C9-C21) o modificaciones menores en la cabeza del grupo. Coordinan el hierro por medio de los átomos de oxígeno del grupo hidroxamato y del nitrógeno y oxígeno del grupo 2-hidroxifeniloxazolina (Ferrerías *et al.*, 2005).

Las anfibactinas son producidas por una bacteria marina Gram negativa (*Vibrio sp* R-10). Se caracterizan por poseer una cabeza de grupo peptídica corta y una serie de apéndices de ácidos grasos saturados e insaturados en el rango de C14 a C18. Las anfibactinas difieren de las marinobactinas y aquaquelinas por una cabeza de grupo menor (cuatro contra seis y siete aminoácidos, respectivamente) y colas de ácidos grasos generalmente más largas (Martínez *et al.*, 2003).

Otros sideróforos anfifílicos incluyen las ornitobactinas producidas por *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis* y *Burkholderia cepacia*, la corrugatina producida por *Pseudomonas corrugata*, la rizobactina 1021 producida por *Sinorhizobium meliloti* y las carboximicobactinas, producidas por micobacterias. Todos estos sideróforos son producidos y secretados dentro del medio de cultivo por bacterias terrestres. La ornibactina es una mezcla hidroxamato/carboxilato. Las ornibactinas son sideróforos tetrapeptídicos lineales que contienen un residuo de 1-4 diaminobutano (putrescina) y una cadena acil de ácido 3-hidroxiбутanóico, ácido 3-hidroxihexanóico o ácido 3-hidroxiocetanóico, dando tres especies diferentes de ornibactinas: C4, C6 y C8 (Stintzi y Raymond, 2001).



Las formobactinas, nocobactinas y amamistatinas, aisladas de *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus bronchialis*, *Rhodococcus rubropertinctus* y *Rhodococcus terrae*, tienen estructuras similares a los sideróforos de tipo micobactina, tanto en las cabezas de grupo como en la cola hidrocarbonada, y también se asocian con la membrana celular bacteriana (Hall y Ratledge, 1986). La figura 8 muestra algunas estructuras de sideróforos anfifílicos.

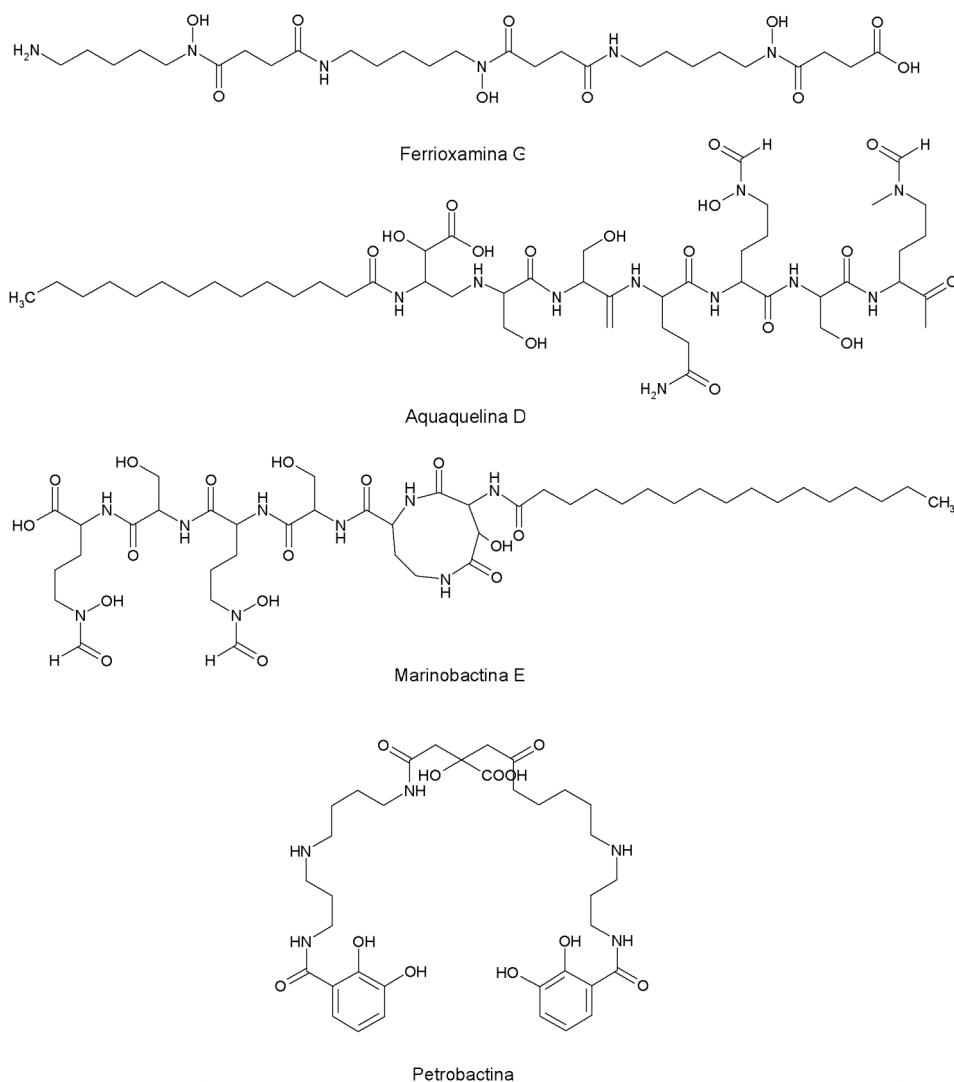


Figura 8. Sideróforos anfifílicos: ferrioxamina G de *Vibrio sp*, aquaquelina D de *Halomonas aquamarina*, marinobactina E de *Marinobacter sp*, petrobactina de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

### II.10.3.6 Biosíntesis de sideróforos

Las vías de biosíntesis de los sideróforos están estrechamente conectadas con el metabolismo aeróbico, involucrando el uso de oxígeno molecular como activador y de mono-, di- y N-oxigenasas, así como de ácidos originados al final del ciclo del ácido cítrico (como citrato, succinato y acetato). Los precursores comunes para la biosíntesis de sideróforos incluyen citrato, aminoácidos y sideróforos sintéticos, como la desferroxiamina (DEF) y la lactona de la N-acil homoserina (HSL), entre otros (Guan y Kamino, 2001) Muchos sideróforos de naturaleza peptídica se encuentran frecuentemente en forma cíclica y son sintetizados por sintetisas no ribosomales, similares a las existentes en las rutas de biosíntesis de antibióticos (Winkelmann, 1992). De este modo, la síntesis de sideróforos es en gran parte independiente del metabolismo primario (Neilands, 1995).

Una vez biosintetizado el sideróforo, éste se enlaza al hierro y forma el complejo hierro-sideróforo. Este complejo no puede atravesar directamente los poros de la membrana plasmática, debido a que el tamaño límite es de aproximadamente 600 Da (Stinzi *et al.*, 2000). Por esta razón, existen mecanismos diferentes que se siguen para que el sideróforo libere al hierro dentro de la célula, que serán explicados a continuación.

### II.10.3.7 Transporte del complejo $\text{Fe}^{3+}$ /sideróforo en bacterias

En bacterias Gram negativas el complejo hierro-sideróforo es tomado por receptores específicos de la membrana externa, en un proceso que es regido por el potencial de la membrana citosólica a través de la energía transferida a los sistemas de transporte periplásmicos (TonB-ExbD-ExbB) (Larsen *et al.*, 1994; Higgs *et al.*, 1998). Estos sistemas periplásmicos transfieren el complejo al citosol, por medio de proteínas que enlazan ATP (complejo de permeasas ABC), y el complejo es probablemente disociado por reducción (figura 9).

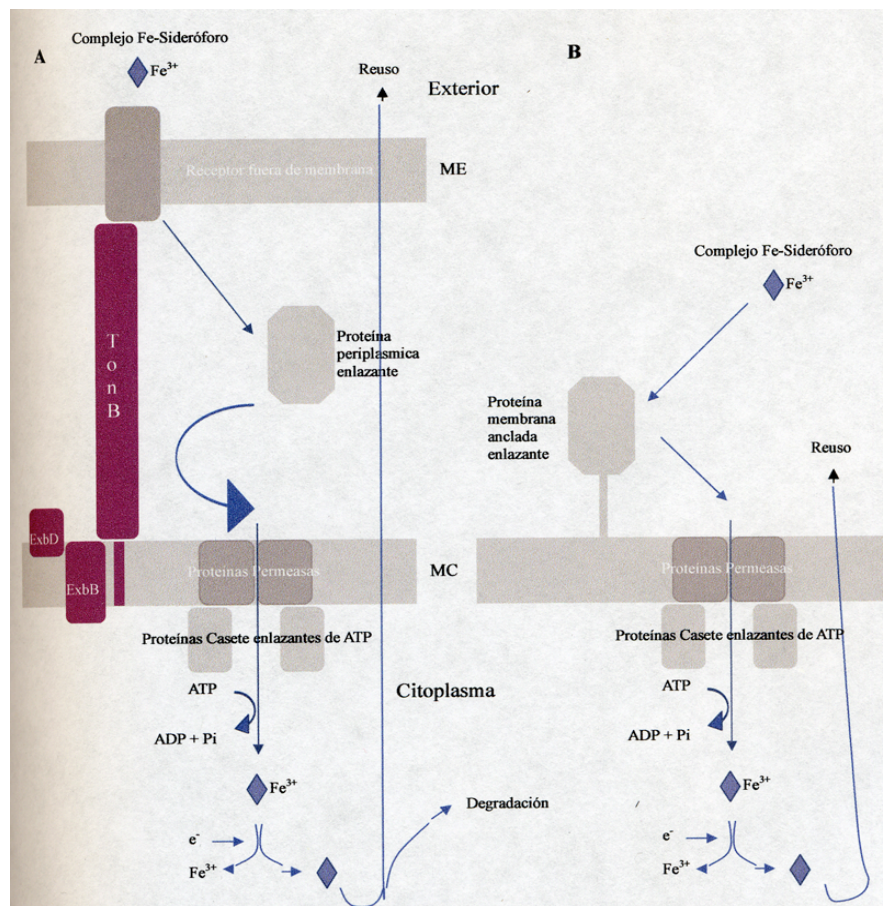


Figura 9. Captación de hierro por sideróforos en bacterias.

Gram negativas (A) y Gram positivas (B).

Los receptores de la membrana externa mejoran la velocidad de captación del complejo, lo que permite que las bacterias sean más eficientes en la adquisición de éste en el ambiente. Los complejos presentan gran afinidad ( $K_d$  0.1-100 nM) por sus receptores, dependiendo del sideróforo de que se trate (tabla 9) (Stinzi *et al.*, 2000). Se han caracterizado al menos tres estructuras de estos receptores de la membrana externa: FepA, FecA y FhuA (Ferguson *et al.*, 1998 y 2002; Buchanan *et al.*, 1999).

Tabla 9. Receptores específicos de sideróforos

Receptor	Sideróforos
Hidroxamato	
IutA	Aerobactina
FhuA	Ferricromo
FhuE	Ácido rodotorúlico/ Coprógeno/ Ferroxiamina B
FhuF	Ferroxiamina B
Catecol	
FepA	Enterobactina/ Dihidroxi-bencilserina
Cir	Dihidroxi-benzoilserina
Fiu	Dihidroxi-benzoilserina/Ácido Dihidroxi-benzóico
Carboxilatos	
FecA	Citrato/ Dicitrato

La aparición de los receptores de sideróforos generalmente se induce a nivel genético por la falta de hierro, no estando presentes en condiciones suficientes de hierro. Las bacterias, además, poseen generalmente múltiples

receptores específicos de sideróforos (se sabe, por ejemplo, que *E. coli* K-12 posee al menos seis tipos de receptores diferentes, los cuales son capaces de adquirir hasta ocho complejos distintos hierro-sideróforo).

El complejo TonB-ExbD-ExbB es utilizado por las bacterias Gram negativas, siendo el sistema más conocido el de *E. coli*. En este complejo, el proceso de transferencia de energía requiere contacto directo entre TonB y los receptores de membrana externa. La proteína TonB tiene un segmento conservado de siete aminoácidos hidrofóbicos y el aminoácido N-terminal de este bloque debe enlazarse al complejo hierro-sideróforo para que pueda ser captado. Sustituciones de aminoácidos en esta región son capaces de inactivar la capacidad de transporte del receptor correspondiente, pero los efectos pueden ser revertidos por sustituciones complementarias en la proteína TonB, por lo que se piensa que esta región conservada debe estar localizada en el periplasma y tener una interacción física con la proteína.

ExbB y ExbD son proteínas integrales de la membrana citosólica, mientras que TonB se encuentra en el periplasma y está anclada a la membrana citosólica por el extremo N-terminal hidrofóbico. Después de que el complejo hierro-sideróforo atraviesa el complejo TonB, éste pasa a través del espacio periplásmico y la membrana citosólica, transporte mediado por las proteínas enlazadas al periplasma y los transportadores de la membrana citosólica.

Cada proteína periplásmica capta un complejo hierro-sideróforo, pero aún no se sabe si las proteínas toman el complejo hierro-sideróforo directamente

del receptor de membrana externa o si simplemente lo recogen del espacio periplásmico (Köster, 2001). El complejo de permeasas ABC es específico para la captación de complejos hierro-sideróforos, especificidad determinada por los receptores de membrana externa. Una vez dentro de la célula, el complejo hierro-sideróforo debe ser disociado para liberar el hierro y que éste sea usado en el metabolismo celular.

Este proceso involucra la reducción del hierro y han sido identificadas varias enzimas intracelulares con actividad de reductasa férrica (flavin reductasa, sulfito reductasa y flavo hemoglobina, por ejemplo), aunque no existe evidencia suficiente para decir que estas enzimas tengan un papel importante en el metabolismo del hierro (Fontecave *et al.*, 1994).

En bacterias Gram positivas no se requiere de receptores de membrana externa ni de sistemas periplásmicos (figura 9B). Estas bacterias permiten que el complejo atraviese su membrana citosólica utilizando permeasas de tipo ABC, que son análogas a aquellas empleadas por las bacterias Gram negativas, excepto en que la proteína ligante es generalmente una lipoproteína anclada a la superficie externa de la membrana citosólica (Winkelmann, 2002).

### II.10.3.8 Transporte del complejo Fe<sup>3+</sup>/sideróforo en hongos

En hongos, el hierro del complejo sigue dos posibles vías: en la primera, el hierro es reducido después de entrar a la célula. El mecanismo que se lleva a cabo antes de la reducción ha sido objeto de un gran número de investigaciones para diversos hongos y numerosos sideróforos (Winkelmann, 1991b y 1992). En la figura 10 se muestra este mecanismo, el esquema muestra la síntesis del sideróforo, la captación del complejo, la liberación del hierro y el reciclado del sideróforo. Este mecanismo comienza cuando el complejo es captado por una permeasa específica, la ferrioxamina B permeasa en *Saccharomyces cerevisiae* (Lesuisse *et al.*, 1998). Estas proteínas utilizan una fuerza motriz de protones semejante a la producida por el complejo ABC en bacterias. Una vez que el complejo está dentro de la célula, la liberación reductiva del hierro se da mediante NAD<sup>+</sup>/NADH o NADP<sup>+</sup>/NADPH. Se ha reportado evidencia de este tipo de reacciones en *Neurospora crassa* (Huschka *et al.*, 1986), *Aspergillus fumigatus* (Hider, 1984) y *Ustilago sphaerogena* (Ecker y Emery, 1983; Matzanke *et al.*, 2006).

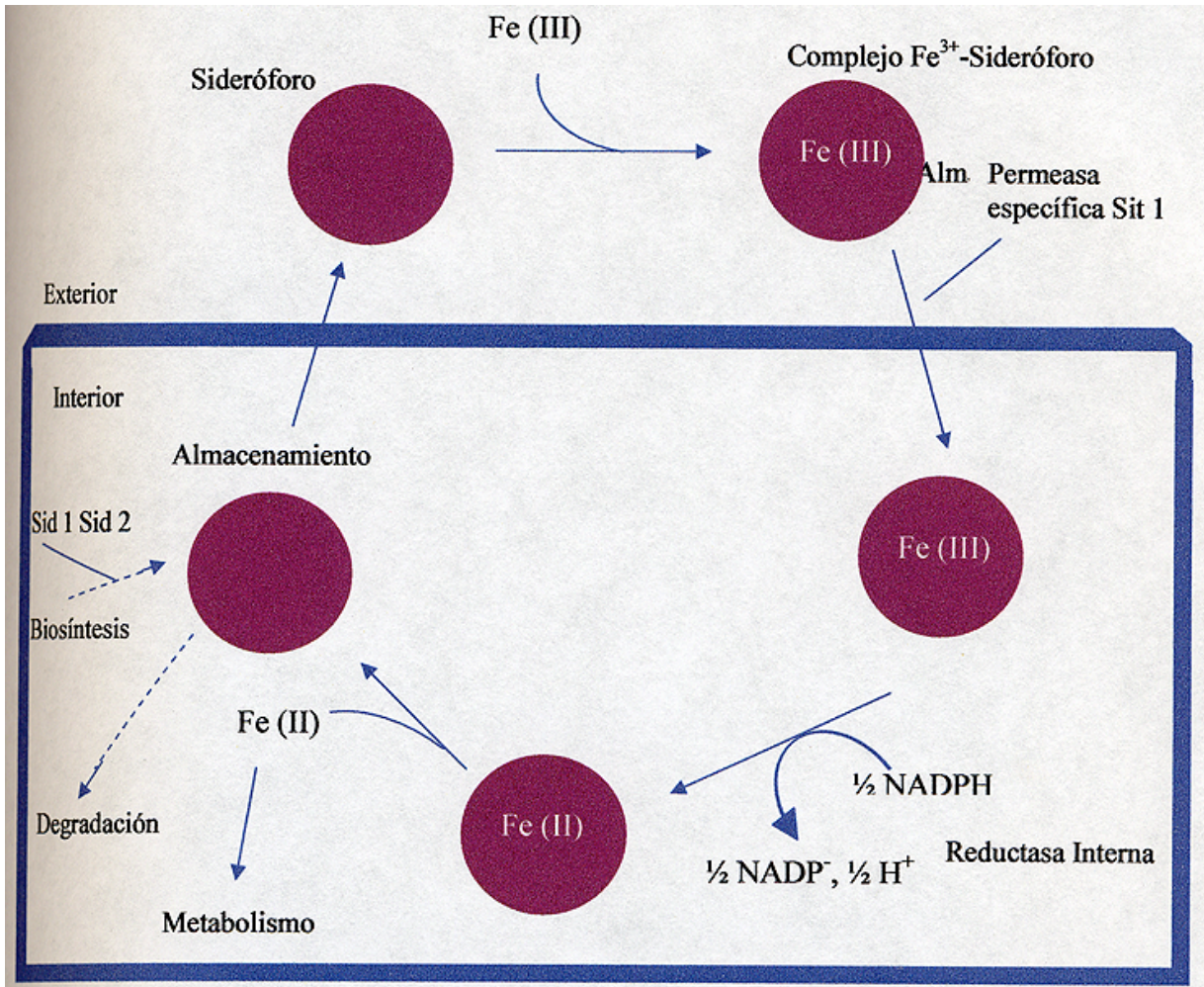


Figura 10. Mecanismo de captación de hierro con reducción interna por sideróforos en hongos.



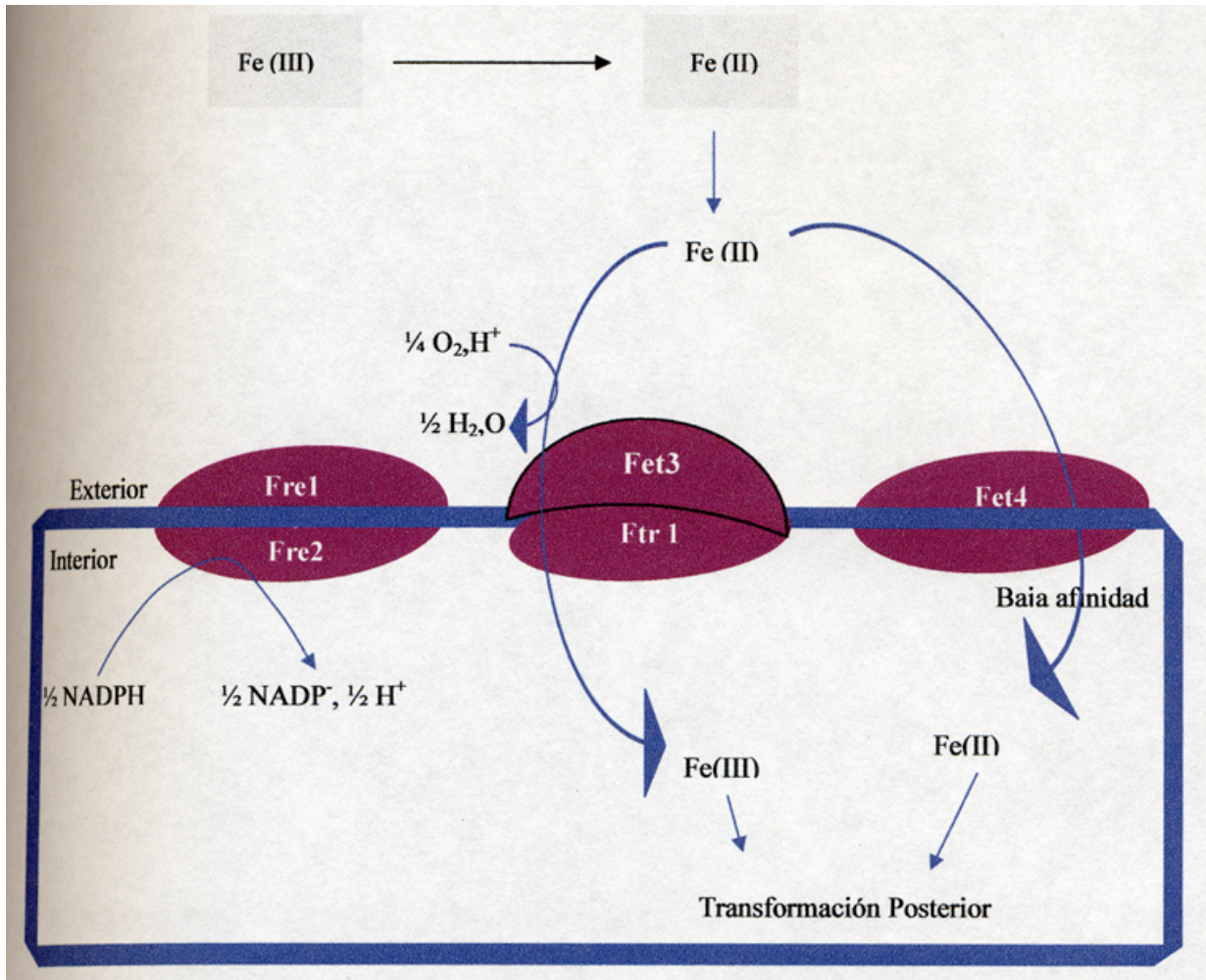
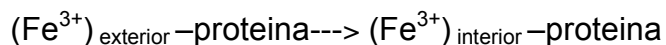
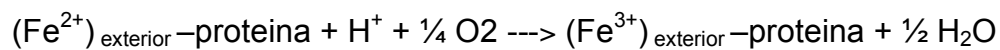


Figura 11. Mecanismo de captación de hierro con reducción externa por sideróforos en hongos.

Se tienen dos opciones para la reducción: mediada por (NADPH) o por un reductor extracelular. Si la reducción la lleva a cabo el NADPH, la enzima que interviene es la NADPH oxidasa (Green y Wu, 1985); los reductores extracelulares empleados pueden ser citrato, ácido 3-hidroxiantranílico, melanina, celobiosa, ferricrocina y ferricromos A y B, entre otros (De Luca y Wood, 2000). Una vez reducido el hierro, éste tiene dos opciones para entrar a la célula: por medio de una permeasa de  $Fe^{2+}$  o por medio de una reoxidación

del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  mediante el sistema de transporte Fet3, según la siguiente reacción:



En este caso, no existe el problema de que el receptor pueda captar otro catión divalente, debido a que la mayoría de los cationes divalentes no pueden ser reoxidados.

# JUSTIFICACIÓN

## Capítulo III

La corrosión es un fenómeno que se manifiesta de múltiples formas en nuestra vida diaria, debido al deterioro y degradación de los materiales. Es un hecho que causa efectos indeseables en cualquier área. En la práctica, estos efectos pueden ser reducidos, siendo el camino más fácil, efectivo y económico la aplicación de inhibidores de corrosión (ampliamente usados como la alternativa más eficiente y económica para prevenir el deterioro de las superficies metálicas). El empleo de este tipo de compuestos en la industria del petróleo está bien establecido, y aunque cada día se están diseñando nuevos inhibidores con propiedades mejoradas, que cumplen con la normatividad ambiental a nivel mundial, existen líneas de investigación que pueden dar paso a una nueva generación de bio-inhibidores producidos mediante el desarrollo de metodologías biotecnológicas, con las cuales no existan riesgos para la salud ni para el ambiente.

De esta manera, se planteó la utilización de sideróforos que cumplan con las características estructurales específicas de los inhibidores de corrosión, significando una alternativa de origen biológico, no tóxica, biodegradable y no bioacumulable.

# HIPÓTESIS

## Capítulo IV

---

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS MICROBIANAS  
CON APLICACIÓN COMO INHIBIDORES DE CORROSIÓN

Los sideróforos presentan características estructurales óptimas para funcionar como inhibidores de corrosión, los volúmenes moleculares mayores a  $1000 \text{ \AA}^3$  indican eficiencias aceptables y los coeficientes de partición menores a 3 que presentan estos compuestos aseguran que no son bioacumulables, por lo que no presentarán problemas de toxicidad y serán biodegradables.

# OBJETIVOS

## Capítulo V

---

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS MICROBIANAS  
CON APLICACIÓN COMO INHIBIDORES DE CORROSIÓN

## General

Identificar y caracterizar un sideróforo que pueda tener aplicación como inhibidor de corrosión para los medios ácidos característicos de la industria petrolera, además de identificar al microorganismo productor de la molécula.

## Particulares

- Determinar a través de cálculos teóricos las características estructurales que afectan el desempeño de los sideróforos como inhibidores de corrosión ecológicos.
- Aislar y seleccionar microorganismos productores de sideróforos.
- Caracterizar estructuralmente los grupos funcionales de los sideróforos aislados.
- Determinar la eficiencia de inhibición a la corrosión de los sideróforos aislados y seleccionar el mejor de ellos.
- Identificar por técnicas de biología molecular la cepa seleccionada como productora de sideróforos y producirlo mediante cultivos líquidos.
- Purificar el sideróforo por medio de cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC).
- Identificar y caracterizar el tipo de sideróforo producido mediante técnicas de RMN e IR.
- Evaluar la funcionalidad del compuesto como inhibidor de corrosión a través de técnicas gravimétricas.



# MATERIALES

Y

# MÉTODOS

## Capítulo VI

---

### VI.1 Materiales y reactivos

Todos los materiales y reactivos utilizados se encuentran en el Apéndice A-1.

### VI.2 Cálculos teóricos

Los cálculos semiempíricos para determinar energías de reacción, fuerza de interacción y coeficientes de partición (Log P) de sideróforos se realizaron mediante el software *Hyperchem* 6.0 y una computadora PC-PIII a 800 MHz. Se obtuvo la estructura de mínima energía para todos los compuestos.

### VI.3 Microorganismos

Todos los microorganismos empleados durante el desarrollo de esta tesis fueron aislados de tres distintos ambientes naturales: **agua dulce**, del sitio Los Dinamos, ubicado en la delegación Magdalena Contreras, **suelo con alta y baja salinidad**, del ex-lago de Texcoco, proporcionado por el doctor Luc Dendooven (Cinvestav-IPN) y **agua de mar**, de Tecolutla, Veracruz.

#### **VI.4 Selección y aislamiento de colonias productoras de sideróforos**

Los medios de cultivo utilizados para la selección y aislamiento de microorganismos fueron: medio agar nutritivo para bacterias, medio Grimm-Allen para ascomicetos (Grim y Allen, 1954) y medio modificado M9 para zigomicetos (Shenker *et al.*, 1992), siendo de gran interés estos últimos por ser productores característicos de sideróforos de tipo carboxilato. Todos los microorganismos se cultivaron en condiciones deficientes en hierro.

Se vertieron 20 mL de cada medio en cajas de Petri y se sembraron 200  $\mu$ L por estría de cada muestra (agua dulce, suelo salino y agua de mar). Se incubaron las cajas a 28 °C y se mantuvieron hasta observar crecimiento de microorganismos (aproximadamente a las 24 horas). Se realizó la siembra de cada muestra por triplicado y se utilizó como control una caja de Petri sin sembrar.

Una vez que crecieron los microorganismos, se aislaron en los mismos medios desferrados (cada colonia en una caja), se mantuvieron bajo las mismas condiciones y una vez que crecieron se vertió la cobertera de medio O-CAS (Pérez Miranda *et al.*, 2007), observándose después de 15 minutos cambios de color en el medio. La siembra de microorganismos en todo el ensayo se realizó por triplicado. Los microorganismos elegidos como productores de sideróforos se conservaron en glicerol a -20 °C, en una concentración final del 20% (v/v) para el caso de bacterias y del 40% (v/v) en el caso de hongos.

**VI.5 Método O-CAS (Pérez Miranda *et al.*, 2007. Apéndice A-6)**

Es un ensayo específico para la detección de sideróforos en medio sólido. El ensayo tradicionalmente usado (CAS), basado en el empleo del cromo azurol S, sólo puede utilizarse para la detección de sideróforos producidos por bacterias Gram negativas (el bromuro de hexadeciltrimetil amonio, HDTMA, presente en el medio resulta ser inhibidor del crecimiento para cualquier otro tipo de microorganismo). Este nuevo ensayo es rápido, fácil de usar, no tóxico y utilizable en la detección de una gran diversidad de microorganismos productores de este tipo de compuestos. El ensayo permite además identificar más de un microorganismo productor al mismo tiempo, debido a que el medio revelador se añade en cobertera (de ahí el nombre O-CAS, por "Overlayered CAS") una vez que se han desarrollado los microorganismos productores sobre el medio de cultivo más apropiado a sus características.

***Procedimiento:***

Para 1 L de cobertera O-CAS: Se disuelven 72.9 mg de HDTM en 40 mL de H<sub>2</sub>O calidad Milli-Q, evitando la formación de espuma. En un vaso aparte, se disuelven 60.5 mg de CAS en 50 mL de H<sub>2</sub>O calidad Milli-Q y se agregan 10 mL de FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O 1 mM disuelto en HCl 10mM. El color de la solución se intensifica en este momento. Esta solución de CAS se añade sobre la solución de HDTM y el color cambia a azul. En un vaso aparte se disuelven 30.24 g de PIPES en 800 mL de H<sub>2</sub>O calidad Milli-Q y se ajustan a pH 6.8, se agrega la agarosa al 0.9% (p/v).

Se esterilizan las dos soluciones por separado y se mezclan sólo cuando se alcanza una temperatura de aproximadamente 55 °C, evitando que el medio llegue a gelificar y que precipite el hierro.

Una vez incubados los microorganismos a probar en el medio de cultivo óptimo para su desarrollo (es muy importante que hayan sido desferrados cuidadosamente antes; Cox, 1994) se vierte una cobertera de medio O-CAS sobre ellos (10 mL de medio para placas estándar de 90 mm de diámetro y 30 mL de medio para placas de 150 mm de diámetro). Se deja gelificar la cobertera y se pueden observar los resultados después de 15 minutos.

## **VI.6 Ensayos químicos para comprobar la producción de sideróforos**

Se realizaron las siguientes pruebas, sólo para comprobar los resultados obtenidos con el ensayo O-CAS.

### **VI.6.1 Hidroxamatos**

Prueba de  $\text{FeCl}_3$  (Neilands, 1981). A 1 mL de medio de cultivo filtrado se le añaden 5 mL de solución al 2% de cloruro férrico. La formación de color rojo o púrpura indica la presencia de sideróforos. Un pico entre 420 y 450 nm del complejo hierro-sideróforo indica que es hidroxamato.

### VI.6.2 Catecoles

Prueba de Arnow (Arnow, 1937). A 1 mL del medio de cultivo filtrado se le añade 0.1 mL de 5 N HCl y 0.5 mL de la solución de Arnow, la cual contiene 10 g de NaNO<sub>2</sub> y 10 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O en 50 mL de agua Milli-Q. Después de la formación de color amarillo, se agregan 0.1 mL de 10 N NaOH (resultando un color rojo) y se agrega suficiente agua Milli-Q hasta un volumen de 5 mL. Se lee la absorbancia a 515 nm.

Prueba de FeCl<sub>3</sub> (Neilands, 1981). A 1 mL de medio de cultivo filtrado se le añaden 5 mL de solución al 2% de cloruro férrico. La formación de color rojo o púrpura indica la presencia de sideróforos. Un pico a 495 nm del complejo hierro-sideróforo indica la presencia de sideróforos de tipo catecol.

### VI.6.3 Hidroxiácidos

Prueba de Shenker (Shenker *et al.*, 1992). A 1 mL del medio de cultivo filtrado, se le añade 1 mL de 250 µM CuSO<sub>4</sub> y 2 mL de amortiguador de acetato a pH 4. El complejo de cobre-sideróforo formado se lee en una longitud de onda entre 190 y 280 nm.

Todas las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un espectrómetro UV / VIS Lambda 35 Perkin Elmer Instruments.

## **VI.7 Producción de sideróforos**

### **Producción general de sideróforos**

Las cepas seleccionadas se pusieron a incubar en matraces de 500 mL con 350 mL del medio de cultivo líquido desferrado específico para cada cepa, utilizando un 25% (v/v) de inóculo, durante 15 días a 30 °C y 250 rpm. Se produjo 1 L de medio de cultivo por cepa, para obtener una concentración alta del sideróforo. Las células de los cultivos líquidos fueron recolectadas por centrifugación (11000 x g durante 20 minutos), el sobrenadante y el precipitado fueron evaluados para la producción de sideróforos con solución de cromo azurol S. Tanto la biomasa como el sobrenadante fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

### **Mejoramiento en la producción de sideróforos**

Se usaron matraces de 500 mL con 100 mL de caldo nutritivo. Los matraces fueron inoculados e incubados durante cuatro días a 30 °C y 120 rpm. Las células fueron cosechadas y con ellas se inoculó un reactor de 2 L, con un volumen útil de medio caldo nutritivo mejorado (apéndice A-2) de 1.6 L, la temperatura fue controlada y monitoreada a 30 °C. El pH fue medido con un electrodo de vidrio y controlado a  $7.0 \pm 0.05$  a través de la adición de 10 M NaOH ó 1 N HCl. La velocidad de agitación se mantuvo a 250 rpm y la aireación fue de 0.24 vvm.

### **VI.7.1 Métodos analíticos**

Determinación de biomasa. La evaluación del crecimiento microbiano se realizó por medio del peso seco de la biomasa. Se tomaron 5 mL del caldo de cultivo y fueron depositados en papel de filtro previamente ajustado a peso constante en la estufa a 100 °C. Los papeles de filtro con la muestra húmeda se colocaron en la estufa a 100 °C durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron en un desecador durante 15 minutos, para después ser pesados en la balanza analítica. Esta dinámica se repitió hasta alcanzar un peso constante.

Determinación de azúcares totales. La cuantificación de azúcares totales se realizó por el método de DNS modificado. Muestras de 1 mL de caldo de cultivo fueron tratadas según el protocolo detallado en el apéndice A-1.

Cuantificación de sideróforos. Para poder realizar la cuantificación de los sideróforos se realizó una curva patrón con solución de cromo azurol S, utilizando ferricromo como estándar (metodología descrita en el apéndice A-1).

Determinación de pH. La determinación del pH se realizó directamente del medio de cultivo.

Análisis estadístico. El análisis de datos se llevó a cabo mediante análisis paramétricos. Para los experimentos se realizaron análisis de varianza de medias (GLM-ANOVA) que permitieron el estudio de efectos individuales de varios factores en un sólo experimento, así como el estudio de las interacciones entre experimentos. Para controlar la posibilidad de error global del experimento se realizó también un análisis de comparación múltiple Tukey-Kramer. Ambos



análisis se realizaron con el paquete estadístico NCSS97. En las gráficas de resultados se reporta la desviación estándar de las repeticiones, representadas como barras de error (apéndice A-2).

### **VI.8 Caracterización de grupos funcionales de sideróforos**

Se realizó una concentración de sideróforos por evaporación del sobrenadante, consiguiendo con esto eliminar el agua del medio. A continuación se realizaron dos extracciones sucesivas con solventes orgánicos, la primera con metanol y la segunda con cloroformo. Tanto la fase acuosa como la orgánica fueron evaporadas y se caracterizaron por espectroscopia IR y RMN. Con parte de este concentrado de sideróforos se realizaron las pruebas de aplicación, descritas en el apartado V.12 de esta sección.

### **VI.9 Purificación del sideróforo**

Después de centrifugar el medio de cultivo a 20000 x g durante 20 minutos, se añadió la resina Amberlita XAD-2 al sobrenadante decantado (100 g de resina por litro). La mezcla resultante fue agitada durante al menos 4 horas a 100 rpm. La resina, lavada previamente con un volumen de columna de agua Milli-Q, fue vertida en una columna (3 cm de diámetro × 40 cm de longitud). La elución se realizó de

forma sucesiva con un volumen de columna de los siguientes solventes: H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O-MeOH (50:50), MeOH y finalmente CHCl<sub>3</sub>. Las fracciones de los solventes fueron recolectadas según el color de elución y se evaluaron para la detección de sideróforos con solución de cromo azurol S (CAS) (Macrellis *et al.*, 2001). La purificación final se realizó por medio de HPLC de fase inversa, utilizando un equipo Agilent 1200 Series Quaternary LC System. Las columnas utilizadas fueron Agilent Zorbax SB-C18 (3.5 μm, 4.6 mm × 150 mm) y Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (5 μm, 4.6 mm × 150 mm). Todos los solventes fueron filtrados a través de filtros con tamaño de poro 0.45 μm. Para la columna C18 el gradiente utilizado fue 100 a 0 (A%/B%) a 0/100 durante 35 minutos [A=99.95% dH<sub>2</sub>O y 0.05% TFA; B=19.95% dH<sub>2</sub>O, 0.05% TFA y 80% MeOH], [A=99.95% dH<sub>2</sub>O y 0.05% TFA; B=39.95% dH<sub>2</sub>O, 0.05% TFA y 60% MeOH] y para la columna C8 el gradiente fue 100 a 0 (A%/B%) a 0/100 durante 33 minutos [A=99.95% dH<sub>2</sub>O y 0.05% TFA; B=0.05% TFA, 99.95% ACN]. Se utilizó un volumen de inyección de 50 μL y un flujo de 1 mL/min para todas las corridas.

## **VI.10 Elucidación estructural**

Para realizar la elucidación estructural, se utilizó un espectrómetro de infrarrojo (IR) Bruker Tensor 27 y uno de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C a 200 Mhz (espectrómetro VARIAN, modelo Mercury). Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (ppm) utilizando como solvente agua (D<sub>2</sub>O) deuterada y

como referencia el tetrametilsilano ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ). Los espectros obtenidos se muestran en el apéndice A-3.

## **VI.11 Ensayos de aplicación**

Estos ensayos se realizaron con el sobrante de los concentrados utilizados para la caracterización de grupos funcionales de sideróforos y con los dos compuestos purificados del concentrado S7 probado anteriormente. El análisis se realizó mediante la evaluación de la eficiencia de inhibición de la corrosión. La presencia de corrosión se evaluó mediante técnicas gravimétricas (pérdida de peso).

### **VI.11.1 Rueda dinámica (*wheel test*)**

La prueba de la rueda dinámica (figura 12) emplea cupones de acero al carbón 1010 de las siguientes dimensiones 2.540 cm × 1.270 cm × 0.025 cm, los cuales fueron samblasteados y se colocaron en el interior de botellas (envases de vidrio, figura 8b) con y sin la presencia de inhibidor (las concentraciones del inhibidor fueron variables). El medio agresivo utilizado fue una mezcla salmuera  $\text{H}_2\text{S}$  pH 4-querosina (80:20).

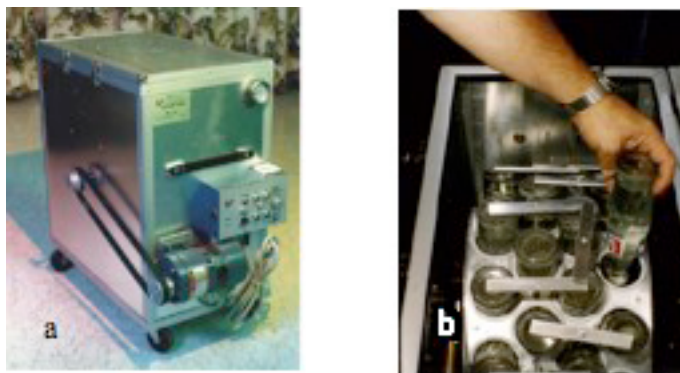


Figura 12. Equipo de rueda dinámica.

a) rueda dinámica, b) instalación de las botellas con medio y cupón.

Después de un periodo de 46 horas de agitación en la rueda a 70 °C, se retiraron los cupones del medio. El tratamiento seguido antes y después de la prueba para los cupones se explica en el apartado V.12 de esta sección.

## VI.12 Evaluación de pérdida de peso

Los cupones fueron desengrasados, primeramente con cloroformo y posteriormente con hexano. Una vez desengrasados, su manipulación se realizó con pinzas, evitando el contacto con las manos. Se pesaron por duplicado, con el fin de tener un peso promedio, obteniéndose así una mayor precisión en la prueba, al conocer la máxima variación permitida entre ambos pesos. Una vez pesados, fueron colocados dentro de botellas de vidrio de 200 mL (figuras 12a y 12b). Posteriormente se agregó el medio agresivo y la cantidad del inhibidor de corrosión a evaluar. Las pruebas se realizaron por duplicado para la concentración del inhibidor, así como

para los blancos de cada prueba. Al final de la prueba, los cupones fueron lavados por inmersión, de manera consecutiva, en cloroformo, acetona, agua, ácido inhibido y una solución de bicarbonato de potasio al 5% (p/v). Posteriormente fueron limpiados con un escobillón de alambre, enjuagados con agua y jabón y secados en una estufa a 60 °C durante una hora, para finalmente pesarse. En función de la pérdida de peso promedio de los cupones en presencia y en ausencia del inhibidor, y tomando como referencia el blanco, la eficiencia de protección y la velocidad de corrosión se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% E = [(\Delta P_{\text{blanco}} - \Delta P_{\text{inh}}) / \Delta P_{\text{blanco}}] \times 100$$

En donde % E es la eficiencia de protección del inhibidor,  $\Delta P_{\text{blanco}}$  y  $\Delta P_{\text{inh}}$  son la diferencia en pérdida de peso promedio de los cupones en ausencia y presencia del inhibidor, respectivamente.

$$\text{Velocidad de Corrosión} = [(3.45 \times 10^6 \times \Delta P) / ADT]$$

En donde  $\Delta P$  es la diferencia en pérdida de peso promedio de los cupones en gramos, A es el área del cupon en  $\text{cm}^2$ , D es la densidad del metal en  $\text{cm}^3$  y T es el tiempo de exposición en horas.

### **VI.13 Determinación de toxicidad (IMP61800-10/2008)**

Para evaluar la toxicidad aguda del sideróforo aislado se utilizó el protocolo del equipo MICROTOX® (apéndice A-4).

### **VI.14 Identificación molecular del microorganismo**

La identificación se realizó por medio de la comparación de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para el ARNr 16S.

- Se verificó la pureza de la cepa por tinción de Gram.
- Extracción de ADN.

Se utilizó el sistema Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, Cat. # A1120).

- Comprobación de la obtención de ADN

Para comprobar la calidad del ADN extraído se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (p/v) con amortiguador TAE 1×. La muestra cargada en el gel contuvo 2 µL de ADN, 2 µL de colorante y 16 µL de H<sub>2</sub>O. Las condiciones de electroforesis fueron 40 minutos a 90 volts. Después de ese tiempo, se reveló el gel con una solución de bromuro de etidio y se fotografió con un equipo de foto documentación GelDoc (Bio-Rad).

- Amplificación por PCR

Se utilizaron los cebadores E9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y E939R (5'-CCGICIATTIITTTIAGTT-3') específicos para eubacterias (Forney *et al.*, 2004), obteniéndose un fragmento amplificado del gen ADNr 16S de 930 pb. Se realizaron reacciones de 50  $\mu$ L de volumen final, los reactivos y concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 10. Las condiciones para el PCR se muestran en la tabla 11. Para comprobar la obtención del tamaño del producto de PCR, se realizó una nueva electroforesis.

- Purificación del producto de PCR

Para la purificación del producto de PCR se utilizó el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, Cat. # A A9281).

Tabla 10. Protocolo para amplificar los genes codificantes para ARNr 16S por PCR.

Reactivo	Concentración		Volumen ( $\mu$ L)
	Stock	final	
ADN molde	–	100 ng	2.5
Cebador E9F	20 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5
Cebador E939R	20 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2.5
dNTP	10 $\mu$ M	200 $\mu$ M	1
Amortiguador	10 $\times$	1 $\times$	5
MgCl <sub>2</sub>	50 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	2.5
Enzima	5U/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ M	0.5
Milli-Q	–	–	33.5

Tabla 11. Condiciones de PCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	3
30	94	30
	55	30
	72	90
1	72	3

- Secuenciación

El análisis de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados se realizó en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Se utilizó la técnica de Dye-Terminator y un equipo ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems). Una vez obtenidas las secuencias, se sometieron a una comparación en las bases de datos mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con el objeto de poder conseguir la identificación.



# RESULTADOS

Y

# DISCUSIÓN

## Capítulo VII

---

## VII.1 Cálculos teóricos

En la literatura se reporta que los principales grupos funcionales que se encuentran dentro de los sideróforos son los hidroxamatos, catecoles e hidroxiaácidos (Stintzi y Raymond, 2001). Aunado a esto, Ramachandran *et al.* (1997) y Zamudio-Rivera *et al.* (2002) reportaron que la eficiencia de inhibición de la corrosión de compuestos anfifílicos en ambiente ácidos depende de la fuerza de interacción de la cabeza de la molécula con la superficie metálica y del volumen molecular de la cola hidrocarbonada del inhibidor.

Tomando en consideración los antecedentes mencionados, se procedió a simular, a través de cálculos teóricos, la interacción entre los complejos de coordinación  $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3$  (1),  $\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_4$  (2),  $\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_4$  (3) que representan a superficies infinitas de hematita (Ramachandran *et al.*, 1997), pirita (Qiu *et al.*, 2004) y una superficie híbrida que representaría ambos ambientes, con los compuestos **4** a **6** que contienen dentro de su estructura a los grupos funcionales hidroxamato, catecol e hidroxiaácido, característicos de sideróforos, y el compuesto **7** que contiene al grupo funcional imidazolina y que forma parte de una amplia cantidad de inhibidores de corrosión que se han utilizado en la industria petrolera, (Wang *et al.*, 1999) (figura 13).

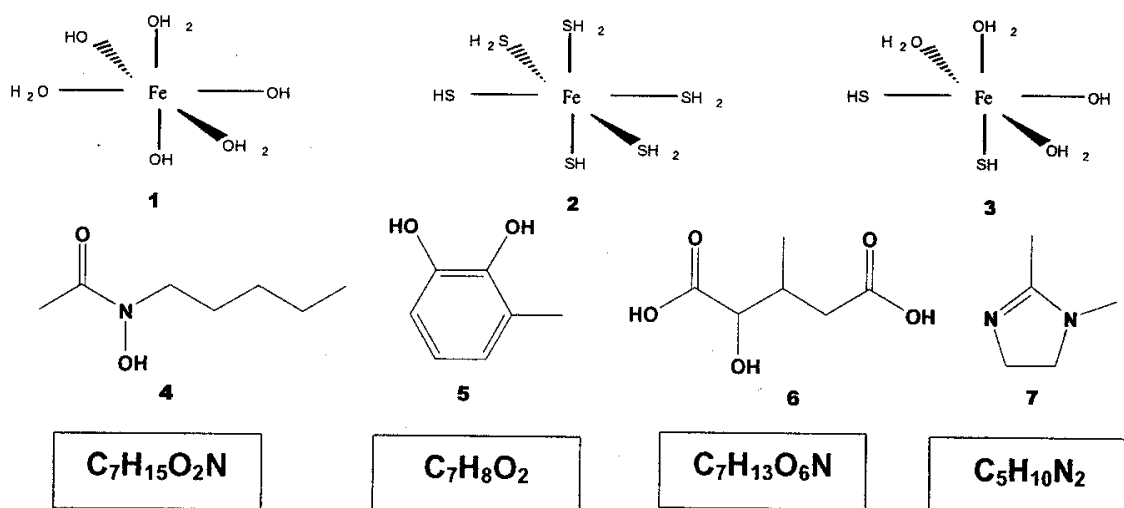


Figura 13. Estructura de compuestos de coordinación 1 a 3 y estructuras de los compuestos coordinantes 4 a 7.

La interacción del complejo de coordinación **1** (superficie de hematita) con los compuestos **4** a **7** se llevó a cabo a través de cálculos semiempíricos, utilizando el método PM3. Los resultados de entalpía de reacción " $\Delta H_r$ " determinados a 298 K (tabla 12) mostraron que la formación de los quelatos **8** a **10**, así como el aducto **11** (figura 14) son procesos exotérmicos, favorecidos termodinámicamente, en los cuales se formaría una película protectora que serviría como inhibidor de corrosión en ambientes neutros característicos de la industria petrolera. Los resultados de la tabla 12 muestran que la interacción del complejo **1** con el compuesto **7** es el proceso exotérmico principalmente favorecido.

Tabla 12. Entalpías de reacción para superficies de hematita.

Compuesto	Fórmula	$\Delta H_f$ (Kcal/mol)	$\Delta H_r$ (Kcal/mol)
1	$\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3$	-576.34	
4	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$	-79.17	
8	$\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N})$	-563.28	
<b><math>\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3 + \text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}) + 2\text{H}_2\text{O}</math></b>			<b>-14.68</b>
5	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	-73.14	
9	$\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2)$	-546.15	
<b><math>\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3 + \text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2) + 2\text{H}_2\text{O}</math></b>			<b>-3.6</b>
6	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}$	-234.95	
10	$\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N})$	-724.26	
<b><math>\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3 + \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}) + 2\text{H}_2\text{O}</math></b>			<b>-19.89</b>
7	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2$	4.13	
11	$\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2)$	-564.53	
<b><math>\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_3 + \text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2 \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2) + \text{H}_2\text{O}</math></b>			<b>-45.79</b>

La entalpía de formación del agua fue de -53.46 kcal/mol

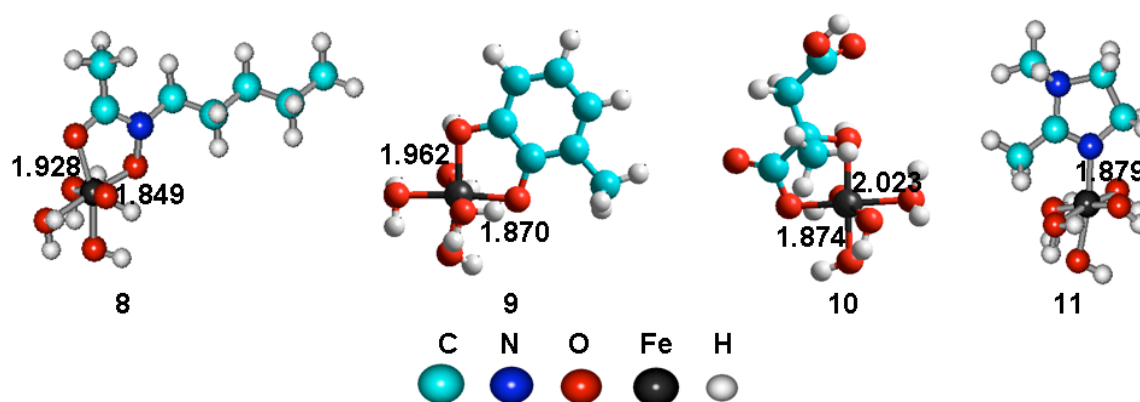


Figura 14. Estructura de los quelatos 8 a 10 y el aducto 11.

El análisis de las distancias de los enlaces de coordinación que se tienen en los quelatos **8** a **10** y en el aducto **11** (figura 14) indica que la película protectora más resistente sería la generada por la interacción del compuesto **7** con el compuesto **1** (distancia de enlace 1.879 Å) y la más débil la que genera la interacción del compuesto **6** con el compuesto **1** (distancia de enlace 2.023 Å).

Asimismo, en los quelatos **8** a **10**, y de acuerdo al modelo propuesto se tiene la ventaja con respecto al aducto **11** de que los compuestos **4** a **6** se unirían a la superficie a través de un enlace formal.

Los resultados de entalpía de reacción “ $\Delta H_r$ ” derivados de la interacción del complejo de coordinación **2** (superficie de pirita) con los compuestos **4** a **7** (tabla 13) indican que la formación del quelato **12** y el complejo de coordinación **15** son procesos exotérmicos, favorecidos termodinámicamente, y en los cuales se formaría una película protectora que serviría como inhibidor de corrosión en ambientes ácidos característicos de la industria petrolera y donde el contaminante principal es sulfuro de hidrógeno. Asimismo, se observa que la formación de los quelatos **13** y **14** son procesos endotérmicos que conllevarían a no generar películas protectoras en este ambiente y a concluir que los grupos funcionales que están presentes en los compuestos **5** y **6** no serían adecuados para ser utilizados en el diseño de nuevos prototipos de inhibidores de corrosión para ambientes donde el contaminante principal es sulfuro de hidrógeno.

El análisis de las distancias de los enlaces de coordinación que se tiene en el quelato **12** y en el aducto **15** (figura 15) indica que la película protectora más resistente sería la que se tiene en el aducto **15** (distancia de enlace 1.871 Å) y la más débil la que se tiene en el quelato **12** (distancia de enlace 1.919 Å).

Tabla 13. Entalpías de reacción para superficies de pirita.

Compuesto	Fórmula	$\Delta H_f$ (Kcal/mol)	$\Delta H_r$ (Kcal/mol)
1	$\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_4$	-318.28	
4	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$	-79.17	
12	$\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_2\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$	-399.45	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_4 + \text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N} \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_2(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}) + 2\text{H}_2\text{S}</math></b>			<b>-3.86</b>
5	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	-73.14	
13	$\text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{S})_3(\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2)$	-374.57	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_4 + \text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_2(\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2) + 2\text{H}_2\text{S}</math></b>			<b>14.98</b>
6	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}$	-234.35	
14	$\text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{S})_3(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N})$	-527.44	<b>23.92</b>
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_4 + \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N} \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_2(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}) + 2\text{H}_2\text{S}</math></b>			
7	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2$	4.13	
15	$\text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{S})_3(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2)$	-325.88	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_4 + \text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2 \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{S})_3(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2) + \text{H}_2\text{S}</math></b>			<b>-12.67</b>

La entalpía de formación del ácido sulfhídrico fue de -0.93 kcal/mol

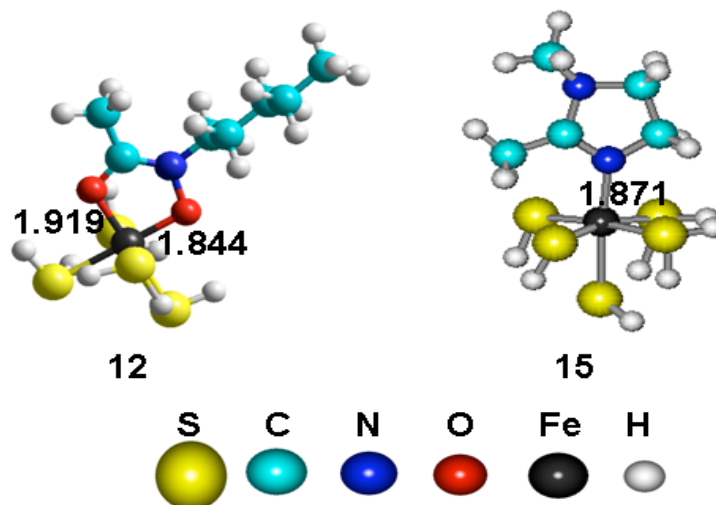


Figura 15. Estructura del quelato **12** y el aducto **15**.

En el quelato **12**, y de acuerdo al modelo propuesto, se tiene la ventaja con respecto al complejo **15** de que el compuesto **4** se uniría a la superficie a través de un enlace formal.

Los resultados de entalpía de reacción “ $\Delta H_r$ ” derivados de la interacción del complejo de coordinación **3** (superficie híbrida) con los compuestos **4** a **7** (tabla 14) indican que la formación de los quelatos **16** a **18** y el aducto **19** son procesos exotérmicos, favorecidos termodinámicamente, en los cuales se formaría una película protectora que serviría como inhibidor de corrosión en ambientes ácidos de la industria petrolera donde se tuviera como contaminante sulfuro de hidrógeno y la presencia de altas cantidades de agua.

El análisis de las distancias de los enlaces de coordinación de los quelatos **16** a **18** y el aducto **19** (figura 16) indica que la película protectora más resistente sería la generada por la interacción del compuesto **7** con el complejo **3** (distancia de

enlace 1.863 Å) y la más débil la que genera la interacción del compuesto **6** con el complejo **3** (distancia de enlace 2.007 Å). Asimismo, en los quelatos **8** a **10**, y de acuerdo al modelo propuesto, se tiene la ventaja con respecto al complejo **11** de que los compuestos **4** a **6** se unirían a la superficie a través de un enlace formal.

Tabla 14. Entalpías de reacción para superficie híbrida.

Compuesto	Fórmula	$\Delta H_f$ (Kcal/mol)	$\Delta H_r$ (Kcal/mol)
1	$\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_4$	-457.71	
4	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$	-79.17	
16	$\text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N})$	-496.42	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_4 + \text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N} \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{S}</math></b>			<b>-13.93</b>
5	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	-73.14	
17	$\text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2)$	-486.22	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_4 + \text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{S}</math></b>			<b>-9.77</b>
6	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}$	-234.35	
18	$\text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N})$	-679.59	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_4 + \text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N} \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}) + \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{S}</math></b>			<b>-41.32</b>
7	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2$	4.13	
19	$\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2)$	-441.29	
<b><math>\text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_4 + \text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2 \rightarrow \text{Fe}(\text{SH})_2(\text{H}_2\text{O})_3(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2) + \text{H}_2\text{O}</math></b>			<b>-41.16</b>

La entalpía de formación del agua fue de -53.46 kcal/mol  
y del ácido sulfhídrico fue de -0.93 kcal/mol



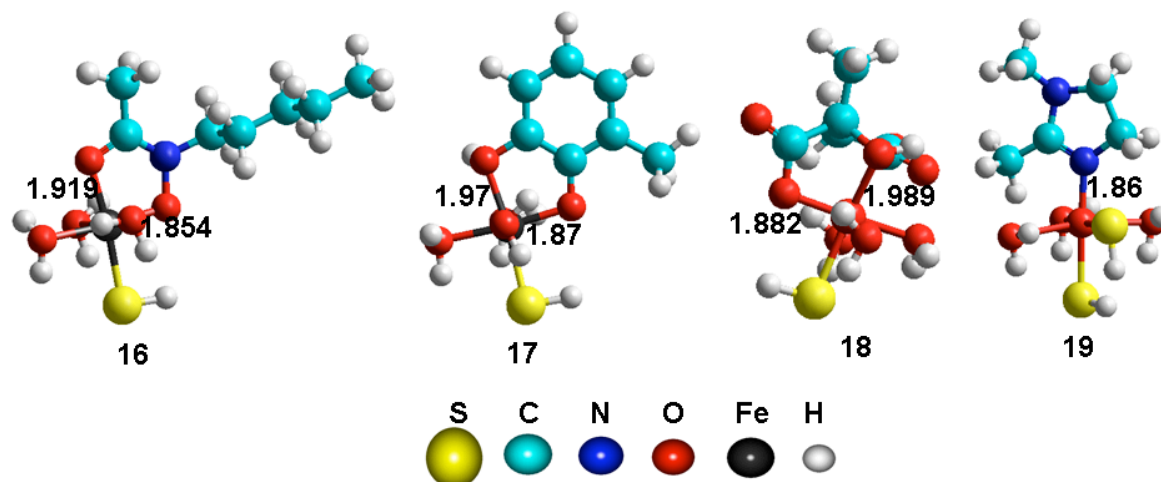


Figura 16. Estructura de los quelatos 16 a 18 y el aducto 19.

El análisis de los resultados de la interacción de los compuestos **4** a **7** con los complejos de coordinación **1** a **3** indica que la presencia del grupo funcional hidroxamato en compuestos orgánicos podría ser utilizado en el diseño y desarrollo de nuevos prototipos de inhibidores de corrosión para ambientes ácidos y neutros característicos de la industria petrolera, y que las eficiencias que se obtendrían podrían ser similares a las obtenidas con el uso de inhibidores de corrosión base imidazolinas.

Recientemente, Martínez *et al.* (2003) reportaron la existencia de sideróforos anfifílicos con base hidroxamatos que contienen en su estructura grupos 2-(2-hidroxifenil)-oxazolinas, como es el caso del sideróforo micobactina (figura 17). La presencia de este grupo generaría inhibidores de corrosión que potencialmente formarían películas más resistentes que en las producidas por los hidroxamatos e incluso por los inhibidores de base imidazolina.

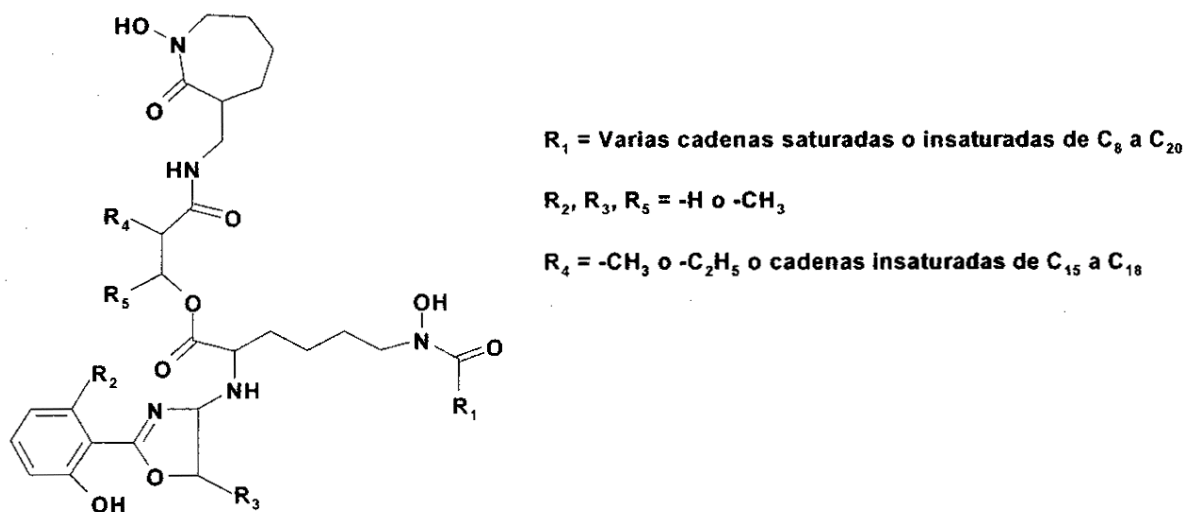


Figura 17. Sideróforo anfifílico micobactina.

En función de este antecedente, se procedió a realizar la interacción a través de cálculos teóricos de los complejos de coordinación **1**, **2** y **3** con el compuesto **20** (figura 18) obteniéndose los quelatos **21**, **22** y **23** (figura 19).

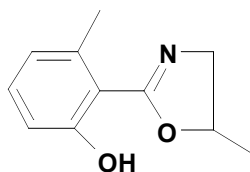


Figura 18. Estructura de la 2-(2-hidroxi-6-metil-fenil)-5-metil-oxazolina.

Las entalpías de reacción obtenidas para el caso de los quelatos **21** a **23** se muestran en la tabla 15, e indican que en los tres casos los procesos son exotérmicos, termodinámicamente factibles y que en los tres ambientes corrosivos

característicos de la industria petrolera el compuesto **20** formaría una película protectora que serviría como inhibidor de corrosión.

Tabla 15. Entalpías de reacción de la interacción del compuesto **20** con los complejos de coordinación **1** a **3**.

Compuesto	Fórmula	$\Delta H_f$ (Kcal/mol)	$\Delta H_r$ (Kcal/mol)
20	$C_{11}H_{13}O_2N$	-56.59	
1	$Fe(OH)_3(H_2O)_3$	-576.39	
21	$Fe(OH)_2(H_2O)_2(C_{11}H_{13}O_2N)$	-561.49	
<b><math>Fe(OH)_3(H_2O)_3 + C_{11}H_{13}O_2N \rightarrow Fe(OH)_2(H_2O)_2(C_{11}H_{13}O_2N) + 2H_2O</math></b>			<b>-35.48</b>
2	$Fe(SH)_2(H_2S)_4$	-318.28	
22	$Fe(SH)(H_2S)_3(C_{11}H_{13}O_2N)$	-401.96	
<b><math>Fe(SH)_2(H_2S)_4 + C_{11}H_{13}O_2N \rightarrow Fe(SH)(H_2S)_3(C_{11}H_{13}O_2N) + 2H_2S</math></b>			<b>-28.96</b>
3	$Fe(SH)_2(H_2O)_4$	-457.71	
23	$Fe(SH)(H_2O)_3(C_{11}H_{13}O_2N)$	-499.13	
<b><math>Fe(SH)_2(H_2O)_4 + C_{11}H_{13}O_2N \rightarrow Fe(SH)(H_2O)_3(C_{11}H_{13}O_2N) + H_2O + H_2S</math></b>			<b>-39.22</b>

El calor de formación del agua es -53.46 kcal/mol y el del ácido sulfhídrico -0.93 kcal/mol

El análisis de las distancias de enlace en los quelatos **21** a **23** indica que el compuesto **20** formaría películas más resistentes en ambientes corrosivos donde el principal producto de corrosión es la pirita (distancia de enlace más corta, figura 19). Una comparación de los resultados obtenidos con el compuesto **20** (quelatos **21** a **23**) y el compuesto **7** (complejos de coordinación **11**, **15** y **19**) indica que los sideróforos que tengan en su estructura el grupo 2-(2-hidroxifenil)-oxazolina potencialmente podrían ser igual o más eficientes que los inhibidores de corrosión de base imidazolina que actualmente se aplican en la industria petrolera.

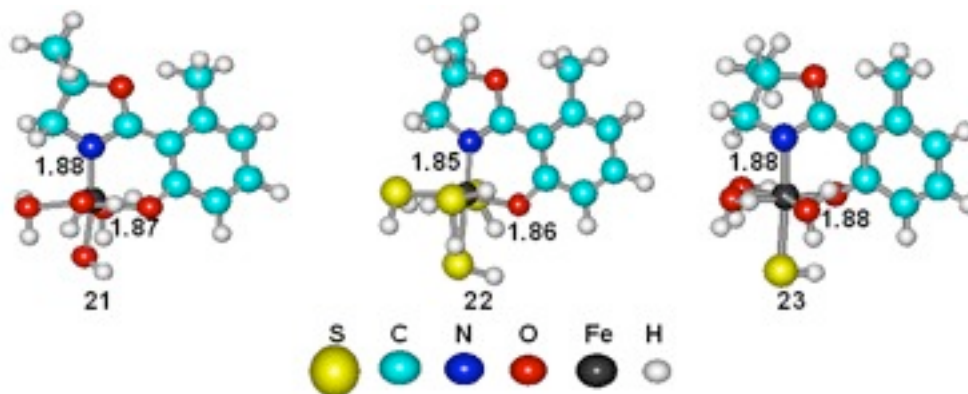
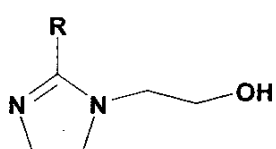


Figura 19. Estructura de los quelatos **21** a **23**.

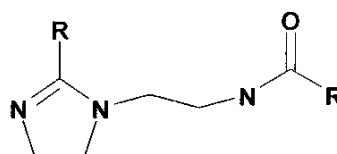
Por otra parte, la industria petrolera internacional ha reconocido la necesidad de minimizar el impacto ambiental que genera el uso de productos químicos en los procesos de extracción, transporte y procesamiento de aceite crudo. En consideración a esta necesidad, se han realizado esfuerzos para desarrollar nuevos prototipos de inhibidores de corrosión ecológicos que presenten características de baja toxicidad, no bioacumulables y biodegradables.

Recientemente, Duda y colaboradores (2005) utilizaron el paquete computacional *Hyperchem* para determinar el coeficiente de partición (Log P) y el volumen molecular de una serie de inhibidores de corrosión base imidazolina (figura 20), y encontraron que estos dos parámetros físicos son las principales variables que afectan la eficiencia de inhibición a la corrosión, de forma que, a mayor volumen molecular o coeficiente de partición se obtienen mayores eficiencias. Asimismo, los compuestos más eficientes para el caso de las 2-alkuil-1-(2-hidroxietil)-imidazolinias presentan coeficientes de partición mayores a 6, mientras que para el caso de las 2-alkuil-1-(2-alkuionilaminoetil)-imidazolinias son mayores a 7. Una comparación de

estos valores con lo especificado por la PARCOM para compuestos bioacumulables ( $\text{LogP} > 3$ ) indica que estos inhibidores de corrosión son bioacumulables, y por lo tanto no ecológicos.



2-alkyl-1-(2-hidroxietyl)-imidazolinas



2-alkyl-1-(2-alkionilaminoetyl)-imidazolinas

Figura 20. Inhibidores de corrosión base imidazolina.

Aunado a esto, en el caso de las 2-alkyl-1-(2-hydroxyethyl)imidazolinas, el compuesto que presentó la mejor eficiencia tiene una cadena hidrocarbonada de 17 carbonos, un volumen molecular de  $1309.65 \text{ \AA}^3$  y un coeficiente de partición de 6.28; mientras que para el caso de las 2-alkyl-1-(2-alkylaminoethyl)imidazolinas el compuesto que presentó la mejor eficiencia tiene dos cadenas hidrocarbonadas de 11 carbonos cada una, un volumen molecular de  $1682.85 \text{ \AA}^3$  y un coeficiente de partición de 7.57.

Flores y colaboradores (2007) demostraron que los compuestos base bis-imidazolinas (figura 21) tienen las propiedades de ser eficientes como inhibidores de la corrosión en ambientes característicos de la industria petrolera, ser biodegradables y de baja toxicidad. Las características estructurales para alcanzar estos resultados implicaron el tener dos sitios de interacción con la superficie a proteger y cadenas hidrofóbicas ramificadas. El compuesto más eficiente en ese

sentido tiene dos cadenas hidrocarbonadas de 7 carbonos cada una, una biodegradabilidad de 89.73% y una  $EC_{50}$  de 130.5 ppm. El volumen molecular y el coeficiente de partición de este compuesto, obtenidos teóricamente a través del paquete *Hyperchem*, son de  $1463.96 \text{ \AA}^3$  y 4.94, respectivamente.

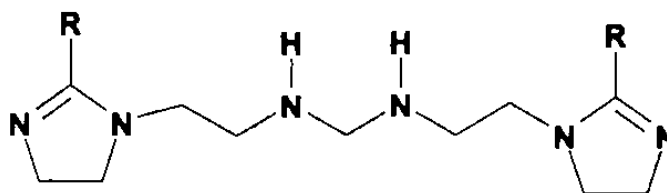
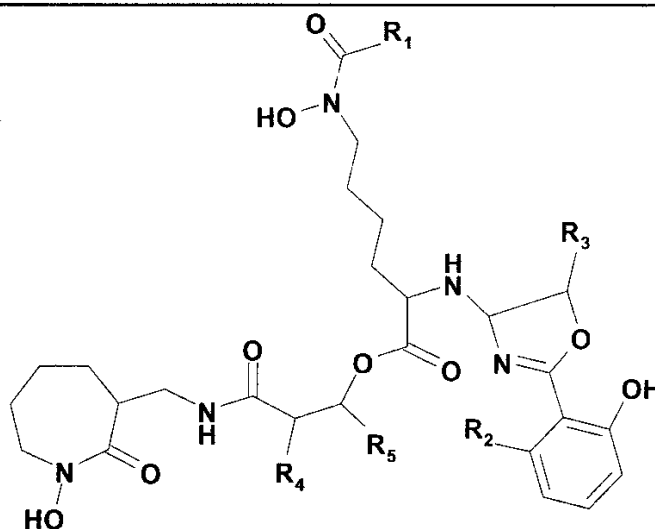


Figura 21. Inhibidores de corrosión base bis-imidazolinas.

En consideración a lo anteriormente descrito, para que los sideróforos pudiesen ser usados exitosamente como nuevos inhibidores de corrosión ecológicos en ambientes ácidos y/o neutros característicos de la industria petrolera, deberán contener en su estructura dos o más grupos funcionales que interactuen con la superficie a proteger, volúmenes moleculares mayores a  $1463.96 \text{ \AA}^3$  y coeficientes de partición menores a 3. El sideróforo deberá ser tipo hidroxamato y preferentemente contener en su estructura el grupo 2-(2-hidroxifenil) oxazolina. Prototipos de sideróforos potencialmente útiles serían los anfifílicos producidos por algún tipo de micobacterias, como son las micobactinas (figura 17), cuyos coeficientes de partición y volúmenes moleculares, calculados a través del paquete *Hyperchem* (tabla 16), varían en el intervalo de 1.89 a 4.68 y de  $1649.4$  a  $1994.2 \text{ \AA}^3$ , respectivamente.

Tabla 16. Coeficientes de partición y volumen molecular de micobactina.



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Coeficiente de Partición (Log P)	Volumen Molecular (Å <sup>3</sup> )
A	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	2.31	1678.9
B	-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	3.10	1788.3
<b>C</b>	<b>-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub></b>	<b>-H</b>	<b>-H</b>	<b>-CH<sub>3</sub></b>	<b>-H</b>	<b>3.89</b>	<b>1897.9</b>
D	-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	4.68	1994.2
E	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-H	-H	-H	-H	1.89	1694.4
F	-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	-H	-H	-H	-H	2.69	1756.8
<b>G</b>	<b>-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub></b>	<b>-H</b>	<b>-H</b>	<b>-H</b>	<b>-H</b>	<b>3.48</b>	<b>1865.0</b>
H	-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	-H	-H	-H	-H	4.27	1961.4

## VII.2 Aislamiento de microorganismos y producción de sideróforos

La primera etapa consistió en aislar microorganismos productores de sideróforos provenientes de diferentes ambientes (agua de mar, agua dulce y suelo alcalino). La elección de estos sitios se debió a que sólo existen reportes de

aislamiento de microorganismos productores de sideróforos de tipo anfífilos en agua de mar (Martínez *et al.*, 2003; Hickford *et al.*, 2004) y no en suelo alcalino o agua dulce, esperándose con ello que potencialmente en estos dos últimos ambientes se pudiesen encontrar microorganismos que produjeran nuevos sideróforos anfífilos que contuvieran en su estructura grupos funcionales hidroxamato y 2-(2-hidroxifenil) oxazolina. Aunado a esto en los tres ambientes la concentración del ion férrico es de trazas, lo cual facilitaría el aislamiento de microorganismos productores de sideróforos. La selección de los microorganismos se realizó mediante el ensayo O-CAS y el tipo de sideróforo producido se corroboró posteriormente por medio de los ensayos químicos específicos (ver capítulo VI).

### **VII.2.1 Muestra de agua dulce**

De esta muestra se lograron aislar 25 colonias. En la tabla 17 se muestran las 13 colonias productoras sensibles al método O-CAS que dieron origen a complejos de coordinación o quelatos (sideróforos) y sus respuestas a los ensayos químicos específicos. 2 de estas colonias producen hidroxamatos, 2 colonias producen carboxilatos, 7 colonias producen hidroxamatos y carboxilatos, 1 colonia produce los tres tipos de sideróforos y 1 colonia no tuvo respuesta a las pruebas de detección química.



Tabla 17. Detección del tipo de sideróforo para muestras de agua dulce.

Colonia	O-CAS	FeCl <sub>3</sub> (hidroxamato)	Arnou (catecol)	Shenker (α-hidroxiácido)
A1	+	+	-	-
A3	+	+	-	+
A4	+	-	-	-
A5	+	+	-	-
A6	+	+	-	+
A7	+	+	-	+
A8	+	+	+	+
A9	+	-	-	+
A10	+	+	-	+
A11	+	-	-	+
A12	+	+	-	+
A13	+	+	-	+
A14	+	+	-	+

+ producción de sideróforos                      - sin producción de sideróforos

### VII.2.2 Muestra de suelo alcalino

De esta muestra se lograron aislar 9 colonias. En la tabla 18 se muestran las 8 colonias sensibles al método O-CAS, las cuales dieron origen a complejos de coordinación o quelatos (sideróforos) y sus respuestas a los ensayos químicos específicos. De estas ocho colonias 3 producen sideróforos tipo hidroxamato, 2 colonias producen hidroxamatos y carboxilatos, 1 colonia produce carboxilatos y catecoles y 2 colonias no tuvieron respuesta a las pruebas de detección química.

Tabla 18. Detección del tipo de sideróforo para muestras de suelo.

Colonia	O-CAS	FeCl <sub>3</sub> (hidroxamato)	Arnow (catecol)	Shenker (α -hidroxiácido)
S1	+	-	+	+
S2	+	+	-	+
S3	+	+	-	+
S4	+	+	-	-
S5	+	+	-	-
S6	+	-	-	-
S7	+	+	-	-
S8	+	-	-	-

+ producción de sideróforos      - sin producción de sideróforos

### VII.2.3 Muestra de agua de mar

Se aislaron 23 colonias en este ambiente. En la siguiente tabla se muestran las 14 colonias sensibles al ensayo O-CAS y las 12 colonias productoras de sideróforos detectadas por los ensayos químicos específicos. De las 12 colonias 3 producen hidroxamatos, 3 colonias producen carboxilatos, 3 colonias producen hidroxamatos y carboxilatos, 1 colonia produce hidroxamatos y catecoles y 2 colonias producen los tres tipos de sideróforos (tabla 19). Al igual que en las muestras anteriores, también se detectaron 2 colonias que no tuvieron respuesta a las pruebas químicas.

Tabla 19. Detección del tipo de sideróforo para muestras de agua de mar.

Colonia	O-CAS	FeCl <sub>3</sub> (hidroxamato)	Arnou (catecol)	Shenker (α -hidroxiácido)
M1	+	-	-	+
M2	+	-	-	+
M3	+	+	-	-
M4	+	+	-	-
M5	+	-	-	-
M6	+	+	-	+
M7	+	-	-	-
M8	+	-	-	+
M9	+	+	-	-
M10	+	+	-	-
M11	+	+	-	+
M12	+	+	-	+
M13	+	+	+	+
M14	+	+	+	+

+ producción de sideróforos      - sin producción de sideróforos

De las 30 cepas seleccionadas como productoras de sideróforos, y de acuerdo a los cálculos teóricos, se eligieron sólo aquellas que fueron productoras de sideróforos tipo hidroxamato (estuviera sólo el grupo funcional o en mezclas) por ser inhibidores de corrosión potenciales para los ambientes ácidos característicos de la industria petrolera.

En las tablas 20, 21 y 22 se muestran las colonias elegidas, provenientes de los tres sitios: agua dulce, suelo alcalino y agua de mar, respectivamente. En ellas se muestra su caracterización morfológica, tinción de Gram y el tipo de sideróforo producido.

Tabla 20. Microorganismos de agua dulce productores de sideróforos seleccionados como posibles inhibidores de corrosión.

<b>Colonia</b>	<b>Morfología</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Sideróforo</b>
A1	cocobacilo	-	hidroxamato
A3	coco	-	hidroxamato/carboxilato
A5	bacilo	+	hidroxamato
A6	coco	-	hidroxamato/carboxilato
A7	bacilo	+	hidroxamato/carboxilato
A8	coco	-	hidroxamato/carboxilato/catecol
A10	filamento	-	hidroxamato/carboxilato
A12	cocobacilo	-	hidroxamato/carboxilato
A14	cocobacilo	-	hidroxamato/carboxilato

Tabla 21. Microorganismos de suelo alcalino productores de sideróforos seleccionados como posibles inhibidores de corrosión.

<b>Colonia</b>	<b>Morfología</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Sideróforo</b>
S3	coco	-	hidroxamato/carboxilato
S4	coco	-	hidroxamato
S5	bacilo	-	hidroxamato
S7	bacilo	+	hidroxamato

Tabla 22. Microorganismos de agua marina productores de sideróforos seleccionados como posibles inhibidores de corrosión.

Colonia	Morfología	Tinción Gram	Sideróforo
M3	coco y bacilo	-	hidroxamato
M4	coco y bacilo	-	hidroxamato
M6	bacilo	-	hidroxamato/carboxilato
M10	bacilo	-	hidroxamato
M11	cocobacilo	+	hidroxamato/carboxilato
M12	cocobacilo	+	hidroxamato

Después de haber realizado la selección de las cepas productoras de sideróforos y la producción a pequeña escala de los mismos se eligió el sobrenadante del caldo de cultivo como fuente, en función de que se ha descrito que su concentración extracelular es mayoritaria (Reid y Butler, 1991; Martínez *et al.*, 2003). Aún así, se cuantificó también la presencia de sideróforos en los precipitados bacterianos, no resultando significativa. Las concentraciones obtenidas a través del método CAS ensayo líquido (ver capítulo VI) fueron variables y se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Muestras de sideróforos seleccionados y sus concentraciones.

Concentración		Concentración		Concentración	
Muestra	(mg/L)	Muestra	(mg/L)	Muestra	(mg/L)
A1	6.5	A12	72	M4	9.5
A3	21.45	A14	38.43	M6	56.28
A5	99.5	S3	62.6	M10	86.85
A6	25.9	S4	38.45	M11	23.35
A7	66.46	S5	70.85	M12	94.5
A8	64.98	S7	60.19		
A10	46.67	M3	9.5		

### VII.3 Concentración de las muestras que contienen sideróforos y caracterización de grupos funcionales

Conforme a lo establecido en la metodología que se tiene para la identificación de posibles sideróforos anfifílicos que contengan en su estructura grupos hidroxamatos, se procedió a realizar la concentración de las 19 muestras que contienen sideróforos provenientes de las colonias seleccionadas como productoras. Una vez obtenidos los 19 concentrados, éstos fueron caracterizados a través de espectroscopia de infrarrojo (IR) y de resonancia magnética nuclear de líquidos (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Todos los espectros de IR y de RMN de los 19 concentrados mostraron señales que indican la presencia de colas hidrofóbicas unidas a los sideróforos, y por lo tanto indican que podrían ser inhibidores de corrosión potenciales para medios ácidos característicos de la industria petrolera. A manera de ejemplo, en las figuras 22, 23 y 24 se muestran los espectros de IR y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos para el concentrado de la muestra A3.

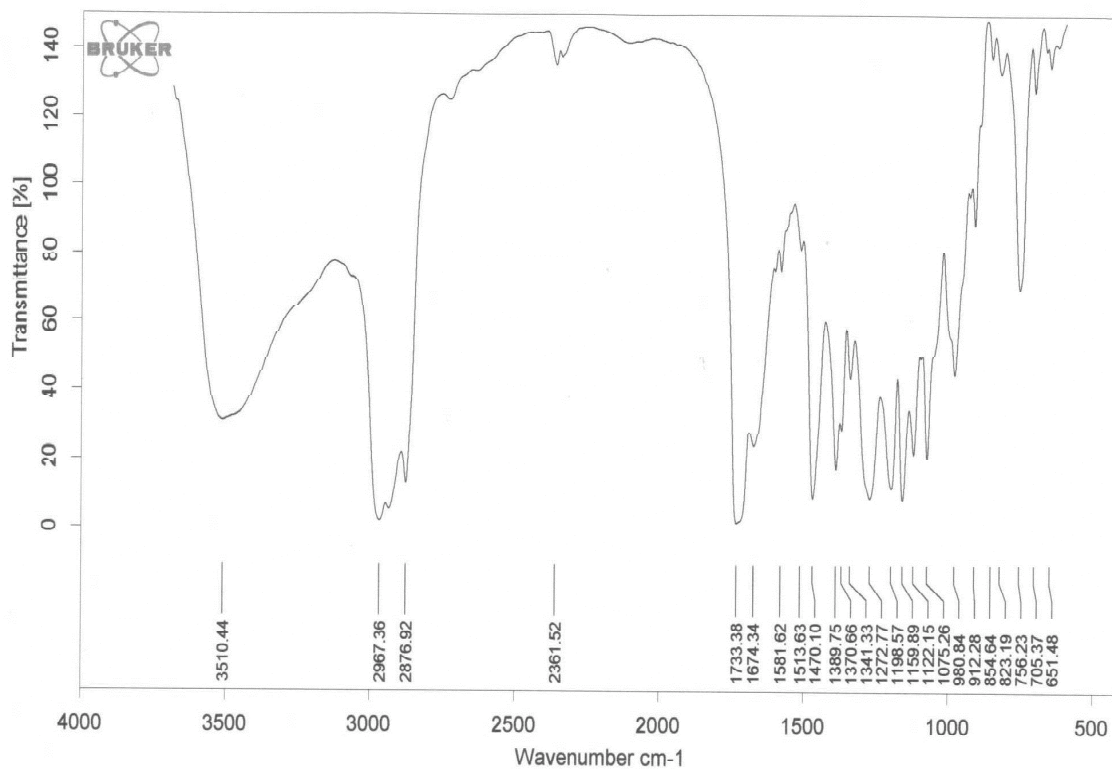
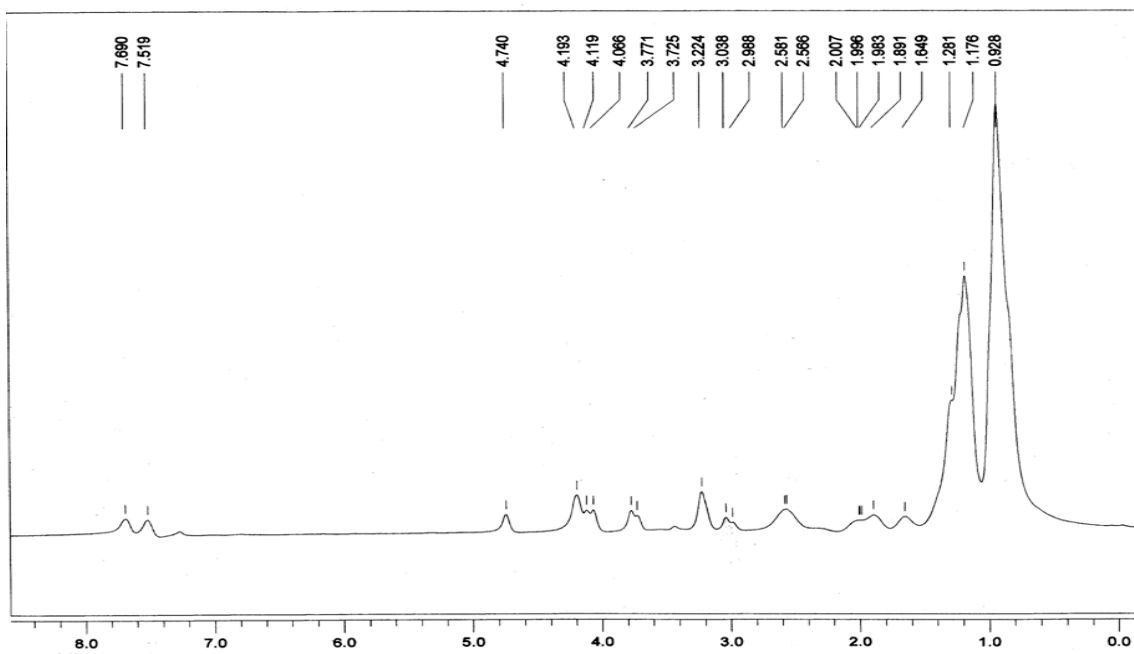
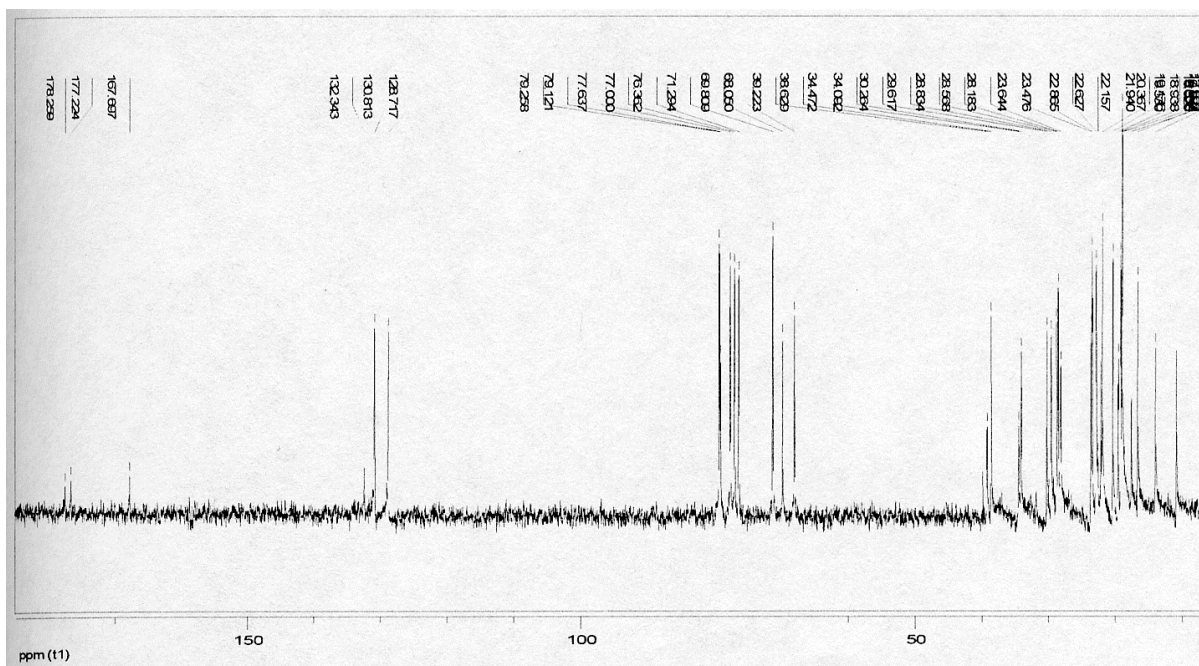


Figura 22. IR muestra A3.

Figura 23. RMN  $^1\text{H}$  muestra A3.

Figura 24. RMN  $^{13}\text{C}$  muestra A3.

Asimismo, y debido a su solubilidad en agua, a la presencia de colas hidrofóbicas cortas y a que el grupo hidroxamato tiene la capacidad de quelar a los átomos de calcio y magnesio (Browner *et al.*, 1995, Grams *et al.*, 1995, Siebner-Freibach *et al.*, 2006), se decidió realizar la evaluación de los concentrados de las muestras A7 y A8 como inhibidores de corrosión e incrustación potenciales para ambientes acuosos característicos de sistemas de enfriamiento que se utilizan en la industria petrolera.

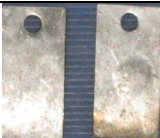



#### VII.4 Evaluación de la eficiencia de inhibición a la corrosión

La determinación de la eficiencia de inhibición a la corrosión se realizó a través de la prueba gravimétrica dinámica, conocida a nivel mundial como prueba de la











rueda (ver capítulo VI). La temperatura a la cual se realizó la evaluación fue 70 °C, se utilizó una salmuera amarga que simula las condiciones que se tienen en medios ácidos característicos de la industria petrolera, el tiempo de evaluación fue de 46 horas y la concentración de muestra utilizada que contiene a los sideróforos fue de 10 ppm. La concentración de 10 ppm se seleccionó debido a que los inhibidores más eficientes que se aplican a nivel industrial tienen especificado obtener eficiencias arriba del 90% para que su desempeño a esta concentración sea considerado adecuado (NRF-005-PEMEX-2000). Los resultados obtenidos de la evaluación se presentan en la tabla 24.






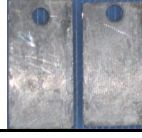
Tabla 24. Eficiencias de inhibición a la corrosión para muestras de sideróforos seleccionados.

Muestra	Sideróforo	Cupones	Velocidad de corrosión (mpa)	Eficiencia de inhibición (%)
A1	1		13.62	51.61
A3	2		6.47	77.01
A5	1		12.26	56.45
A6	2		8.85	68.54

Continuación tabla 24

Muestra	Sideróforo	Cupones	Velocidad de corrosión (mpa)	Eficiencia de inhibición (%)
A10	2		6.13	71.77
A12	2		9.99	64.51
S3	2		12.94	54.03
S4	1		8.67	69.21
S5	1		12.94	54.03
S7	1		2.27	91.93
M3	1		7.72	72.58
M4	1		8.17	70.96

Continuación tabla 24

Muestra	Sideróforo	Cupones	Velocidad de corrosión (mpa)	Eficiencia de inhibición (%)
M6	2		8.85	68.54
M10	1		6.85	75.80
M11	2		5.68	79.83
M12	2		5.45	80.64
Inhibidor Comercia I	Base Imidazolina		2.8	90.05
	Blanco		28.15	0

1: Hidroxamato; 2: Hidroxamato/carboxilato




El análisis de los resultados de la tabla 24 muestra que el concentrado de la muestra S7 a 10 ppm tiene eficiencias superiores a 90%, con lo cual podría ser utilizado como inhibidor de corrosión para medios ácidos característicos de la industria petrolera. Asimismo, estos resultados indican que se deberían de enfocar todos los esfuerzos a su purificación y caracterización, con la finalidad de determinar el tipo de sideróforo responsable de que se obtengan estas eficiencias y establecer si

se tiene un nuevo tipo de sideróforo anfifílico base hidroxamato proveniente de muestras de suelo alcalino. Cabe mencionar que hasta donde es de nuestro conocimiento no existen reportes de sideróforos anfifílicos tipo hidroxamato provenientes de muestras de suelo (Hall y Ratledge, 1986; Stintzi y Raymond, 2001).

Por otra parte, se observa que dos candidatos potenciales más serían los concentrados de las muestras M11 y M12, que tienen eficiencias de 79.83 y 80.64%, respectivamente. Sin embargo, ambos concentrados provienen de muestras de agua de mar, donde ya existen reportes de encontrarse sideróforos anfifílicos (Martínez *et al.*, 2000, Martínez *et al.*, 2003, Butler, 2005), con lo cual se hacen menos atractivas para proceder a su purificación y posterior caracterización.

Con la finalidad de observar la repetibilidad de los resultados y el impacto que tiene la concentración sobre la eficiencia y la velocidad de corrosión, se realizó una segunda evaluación para el concentrado de la muestra S7 a una dosificación de 10 y 25 ppm y los resultados se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Eficiencias de inhibición a la corrosión para la muestra S7.

Muestra	Sideróforo	Concentración (ppm)	Cupones	Velocidad de corrosión (mpa)	Eficiencia de Inhibición (%)
S7	1	10		2.78	89.66
		25		0.89	96.69
		Blanco		26.87	0

1: hidroxamato




Una comparación de los resultados de la tabla 25 con los de la tabla 24 indica que la eficiencia de inhibición a la corrosión a 10 ppm que se obtienen con el concentrado de la muestra S7 es repetitivo y que la diferencia de 2.6% obtenida está dentro del intervalo de confianza de la prueba ( $\pm 5\%$ ). Asimismo, los resultados de la tabla 23 indican que un incremento en la concentración del concentrado conlleva a un incremento de la eficiencia de inhibición a la corrosión.

El análisis de las velocidades de corrosión obtenidas con ambas concentraciones muestra que están por debajo de 5 milésimas de pulgada por año (mpa), con lo cual se cumpliría con los criterios establecidos por Pemex-Refinación para inhibidores de corrosión que se quieren aplicar en medios ácidos característicos de esta industria (PEMEX-REFINACIÓN, GPASI-IT-5200, 1994).

Con la finalidad de determinar una aplicación viable de los sideróforos presentes en los concentrados de las muestras A7 y A8 en sistemas característicos

de aguas de enfriamiento, se procedió a realizar su evaluación en la prueba dinámica, utilizando una salmuera sintética corrosiva e incrustante, característica de medios neutros. La temperatura y el tiempo de evaluación fueron de 40 °C y 6 horas, respectivamente, y los resultados obtenidos a diferentes concentraciones se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Eficiencias de inhibición a la corrosión para las muestras A7 y A8.

Muestra	Concentración		Cupones	Eficiencia de Inhibición (%)
	Sideróforo	(ppm)		
A7	2	50		34
A8	3	50		41
Inhibidor comercial Belcor		50		56

2: hidroxamato/carboxilato; 3: hidroxamato/carboxilato/catecol

El análisis de los resultados de la tabla 26 indica que los sideróforos presentes en los concentrados de las muestras A7 y A8 no serían buenos candidatos para ser usados como base en el desarrollo de inhibidores de corrosión e incrustación potenciales que se aplican en sistemas de enfriamiento característicos de la industria petrolera. Debido a que la eficiencia de inhibición a la corrosión, en ambos casos, está significativamente por debajo de la del inhibidor comercial.

## VII.5 Identificación molecular de la cepa productora

### del sideróforo presente en la muestra S7

La identificación del microorganismo productor del sideróforo se realizó comparando la secuencia del gen bacteriano para el ADNr 16S. Los resultados del análisis de la secuencia de nucleótidos mostraron que existió un 99.9% de similitud entre la secuencia obtenida y la secuencia perteneciente a dos especies del género *Bacillus*, *Bacillus atrophaeus* y *Bacillus vallismortis*. Para poder determinar qué tipo de microorganismo es con exactitud, se requeriría obtener un fragmento mayor a 930 pb, o recurrir a secuencias intergénicas u otro tipo de técnicas de identificación microbiológica.

En la figura 25 se muestra la secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S ADNr de la cepa S7.

```

TTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAG 60
CACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG 120
GGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAG 180
AGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAA 240
TTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC 300
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAAATTC 360
GGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTT 420
CTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACAAC 480
AGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGT 540
CCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCCTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC 600
AGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCATTACCT 660
CACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTAT 720
GTTTGAACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCC 780
CAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACATCAGGGGAGC 840
AAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTC 896

```

Figura 25. Secuencia obtenida tras la amplificación de parte del gen 16S ADNr de la cepa S7.

En la figura 26 se muestran los geles A, donde se observa el ADN genómico de la cepa S7 y el gel B que es el producto de la amplificación por PCR con los cebadores indicados (ver sección de materiales y métodos).

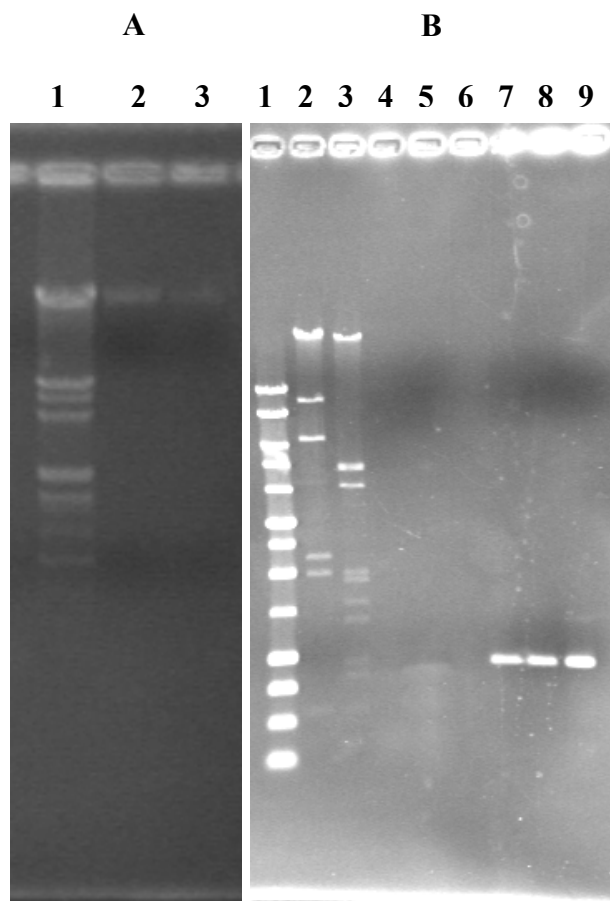


Figura 26. A. ADN genómico de la cepa S7 (carriles 2 y 3, duplicados). Marcador de tamaño (carril 1). B. Producto de la amplificación por PCR con los cebadores E9F y E939R (carriles 7, 8 y 9, triplicados). Marcadores de tamaño (carriles 1, 2 y 3).

En la tabla 27, se observan los diez mejores resultados obtenidos en la búsqueda BLAST con la secuencia de nucleótidos correspondiente a la cepa S7.



Tabla 27. Resultados obtenidos con BLAST  
para la secuencia de nucleótidos de la cepa S7.

<b>Accession</b>	<b>Descripción</b>	<b>Max score</b>	<b>Total score</b>	<b>Query coverage</b>	<b>E value</b>	<b>Max ident</b>
EU855193.1	Bacillus sp. CTSP11 gen16S ARNr, secuencia parcial	1655	1655	100%	0.0	100%
AY881241.1	Bacillus atrophaeus isolate SCH0408 gen16S ARNr, secuencia parcial	1655	1655	100%	0.0	100%
AB017587.1	Bacillus sp. gen16S ARNr, secuencia parcial, cepa:SSA3	1655	1655	100%	0.0	100%
AB021198.1	Bacillus vallismortis gen16S ARNr	1655	1655	100%	0.0	100%
AB363731.1	Bacillus atrophaeus gen16S ARNr, secuencia parcial, cepa: NBRC 15539	1650	1650	100%	0.0	99%
DQ316093.1	Bacillus sp. DAU101 gen16S ARNr, secuencia parcial	1650	1650	100%	0.0	99%
DQ993677.1	Bacillus atrophaeus cepa BCRC 17530 gen16S ARNr, secuencia parcial	1650	1650	100%	0.0	99%
AY176768.1	Bacillus subtilis cepa HJ19 16S secuencia parcial	1650	1650	100%	0.0	99%
AF287011.1	Bacillus subtilis cepa O9 gen16S ARNr, secuencia parcial	1650	1650	100%	0.0	99%
AB021181.1	Bacillus atrophaeus gen16S ARNr	1650	1650	100%	0.0	99%

La literatura menciona que *Bacillus atrophaeus* produce un pigmento de color café oscuro (Burke *et al.*, 2004), y el caldo de cultivo después de la producción del sideróforo proveniente de la muestra S7 se tornaba de ese color. Aún así, se tomó la decisión de denominar a la cepa *Bacillus sp.*

## VII.6 Producción del sideróforo proveniente de la muestra S7

Producción de sideróforo en matraz.

En la figura 27 se presenta la cinética de producción, consumo de fuente de carbono y crecimiento microbiano de *Bacillus sp.* A las 96 horas se obtuvo la producción máxima de biomasa con una velocidad específica de crecimiento de  $0.0207 \text{ h}^{-1}$  y un  $Y_{x/s}$  de  $0.594 \text{ g.g}^{-1}$ , la glucosa fue metabolizada rápidamente para el mismo tiempo pero el cultivo microbiano se mantuvo hasta las 192 horas. Después de este tiempo comenzó a disminuir la biomasa. La producción máxima de sideróforo fue de  $48 \text{ mg/L}$  a las 144 horas, durante un  $Y_{p/s}$  de  $0.0078 \text{ g.g}^{-1}$ . El metabolismo microbiano se mantuvo constante por aproximadamente cuatro días, debido probablemente a la formación de ácidos orgánicos (que son producto del metabolismo propio del microorganismo), los cuales fueron posiblemente utilizados como fuente alterna de carbono. Las concentraciones de sideróforo y rendimiento obtenidos se debieron a que el microorganismo sólo produjo la cantidad necesaria del mismo para su crecimiento. En consideración a que los resultados obtenidos bajo las condiciones de cultivo mencionadas no eran alentadores, se decidió variar las

condiciones en la biosíntesis y con ello tratar de incrementar la producción de sideróforo.

Recientemente Drews y Kraume (2006) mencionaron que no existe represión por glucosa durante la biosíntesis de sideróforos del tipo rizoferrina a una concentración de la misma de 50 g/L en reactores batch con aireación, y que no fue significativa la variación en la aireación. Del mismo modo, la literatura menciona que el uso de precursores tales como succinato y/o oxalato de sodio coadyuva a incrementar la producción de sideróforos (Andriollo *et al.*, 1992; Braud *et al.*, 2006).

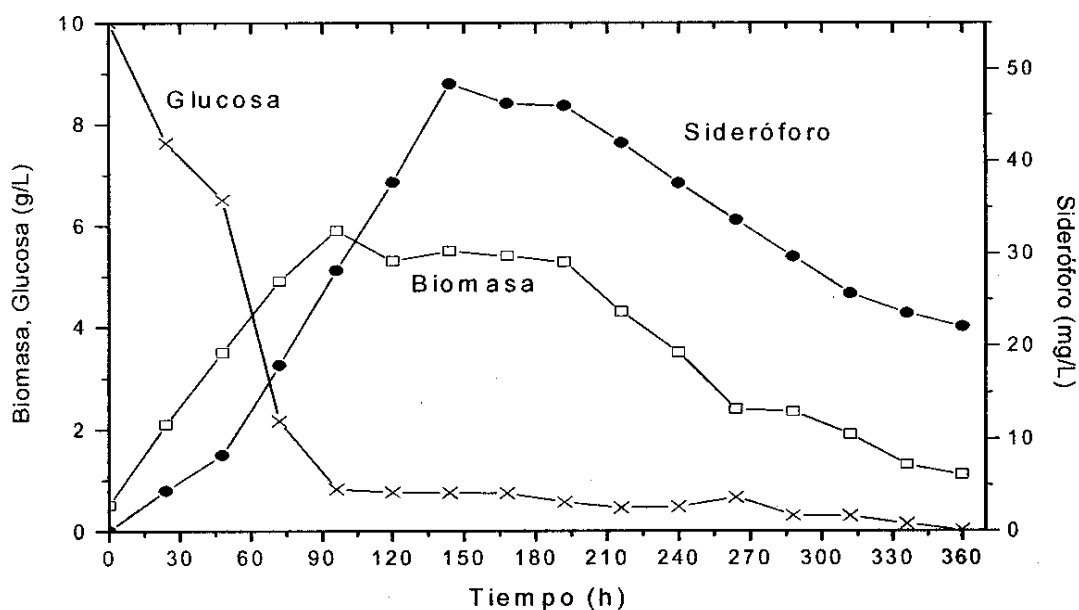


Figura 27. Cinética de *Bacillus sp.* con medio de cultivo sin mejorar.

En consideración a este antecedente, se procedió a realizar pruebas en un reactor tipo batch variando la velocidad del flujo de aire, en el intervalo de 0.16, 0.24 y 0.32 vvm, utilizando una concentración de glucosa de 50 g/L y una de 5 g/L de succinato de sodio como precursor.

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas indican que la mayor producción proveniente de la muestra S7 se obtuvo con una velocidad de aireación de 0.24 vvm (ver apéndice 2).

Producción de sideróforo en reactor.

En la figura 28 se observa la cinética de producción, consumo de fuente de carbono y crecimiento microbiano de *Bacillus sp.*

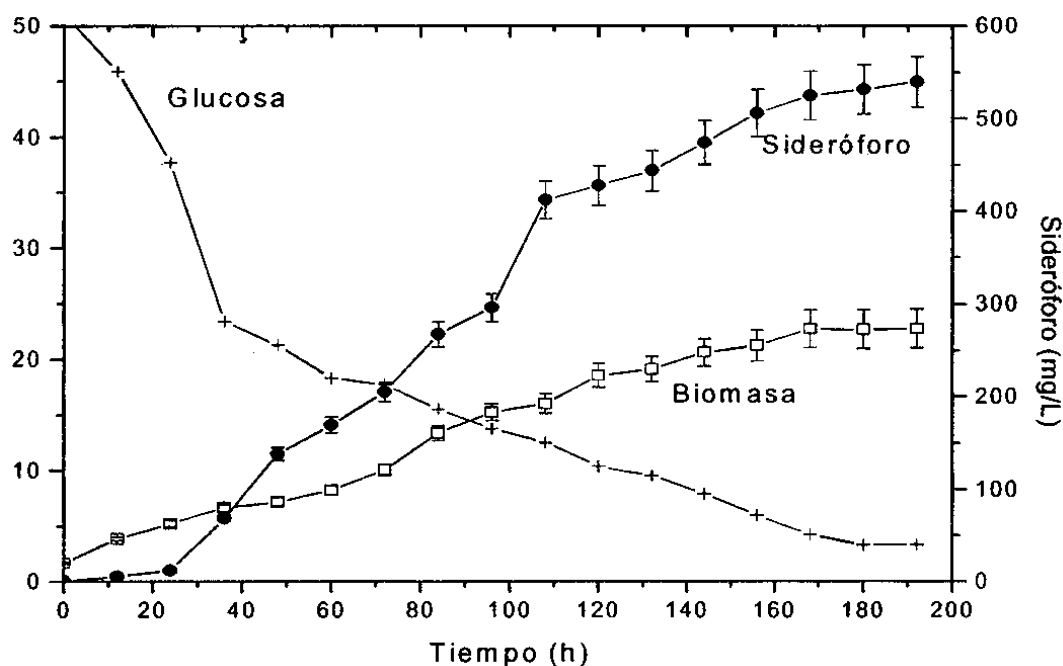


Figura 28. Cinética de *Bacillus sp.* con medio de cultivo mejorado.

La formación de biomasa y la producción del sideróforo mostraron un efecto significativo en función de la concentración de la fuente de carbono y la aireación. En la gráfica anterior se puede observar que con la concentración de glucosa utilizada (50 g/L) no causó ningún efecto de represión, y sí se produjo una cantidad

mayor de biomasa (22.8 g/L) a una velocidad específica de crecimiento de  $0.0137 \text{ h}^{-1}$  y un  $Y_{x/s}$  de  $0.44 \text{ g.g}^{-1}$ . La fase de crecimiento exponencial se prolongó al incrementarse la concentración de la fuente de carbono y se observó un incremento en la producción de sideróforo desde las 36 horas hasta las 180 horas, momento en que el cultivo microbiano comenzó a entrar en fase estacionaria. La producción de sideróforo comenzó a las 24 horas, su producción máxima fue de 535.29 mg/L a las 192 horas con un  $Y_{p/s}$  de  $0.011 \text{ g.g}^{-1}$ , lo cual demuestra que al haber agregado el succinato de sodio como precursor de sideróforos al medio de cultivo se logró obtener una mayor concentración de ellos (Zähner *et al.*, 1983).

### **VII.7 Purificación del sideróforo proveniente de la muestra S7 y evaluación de su eficiencia de inhibición a la corrosión**

En una primera etapa, el caldo de cultivo se pasó a través de una columna empacada con resina Amberlita XAD-2, y se colectaron diversas fracciones en función de la coloración del solvente eluido (la coloración varió de un amarillo tenue a un café intenso). La presencia de sideróforos en cada una de las fracciones fue determinada por medio de una solución de cromo azurol S, y sólo cinco de las fracciones colectadas dieron respuesta positiva a la prueba. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Fracciones colectadas por cromatografía en columna y su concentración de sideróforos.

<b>Fracción</b>	<b>Solvente de elución</b>	<b>Coloración del solvente</b>	<b>Concentración de Sideróforos (mg/L)</b>
A	H <sub>2</sub> O:MeOH	amarillo	94.5
B	H <sub>2</sub> O:MeOH	amarillo intenso	25.5
C	MeOH	café rojizo	264
D	MeOH	café intenso	93
E	CHCl <sub>3</sub>	café	49.5

El hecho de que cinco fracciones dieran positivo a la prueba podría sugerir que *Bacillus sp.* produjo más de un tipo de sideróforo o algún análogo que tuviera sus cualidades. Este hecho se encuentra reportado en la literatura (Gobin *et al.*, 1995; Gobin y Horwitz, 1996).

Después de la pre-purificación, se realizaron pruebas de eficiencia de inhibición a la corrosión con el fin de comprobar cual de ellas proveía las mejores eficiencias, para posteriormente realizar su purificación a través de cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC) y su caracterización a través de técnicas espectroscópicas. Los resultados de evaluación de desempeño como inhibidores de la corrosión de las cinco fracciones obtenidas de la muestra S7 se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Eficiencias de inhibición a la corrosión para las fracciones colectadas por cromatografía en columna.

Fracción	Concentración (ppm)	Velocidad de corrosión (mpa)	Eficiencia de inhibición (%)
A	10	23.62	9.42
	25	15.35	41.16
B	10	21.07	19.20
	25	13.54	48.07
C	10	9.8	62.43
	25	1.72	93.41
D	10	20.37	21.89
	25	14.63	43.89
E	10	19.55	25.05
	25	9.89	62.06
Blanco	0	26.08	0

El análisis de los resultados de la tabla 29 muestra que las mejores eficiencias de inhibición a la corrosión se obtuvieron con la fracción C. En consideración a este resultado se decidió proceder a la purificación y caracterización del sideróforo presente en esta fracción.

La separación cromatográfica a través de HPLC de la fracción C se realizó con dos columnas del tipo C18 y C8, utilizando como eluyente para la columna C18 el sistema H<sub>2</sub>O/Metanol/Ácido trifluoroacético y para la columna C8 H<sub>2</sub>O/Acetonitrilo/Ácido trifluoroacético. En ambos casos, el volumen de inyección fue de 50 µL y la velocidad de flujo de 1 mL/min. En la columna C18 se observaron dos compuestos principales con tiempos de elución muy cercanos (2.99 y 3.11 minutos, respectivamente) que no pudieron ser separados de forma adecuada.

La mezcla de compuestos obtenidos de la separación cromatográfica con la columna C18 fue separada utilizando una columna C8 obteniéndose dos compuestos con tiempos de retención de 2.99 (compuesto 1) y 20.75 (compuesto 2) minutos, respectivamente. El compuesto 1 resultó ser un polvo blanco del que se obtuvieron 150 mg; mientras que el compuesto 2 fue un líquido amarillo del cual se obtuvieron 50 mg.

Los compuestos 1 y 2 fueron caracterizados a través de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , observándose para el caso del compuesto 1 una estructura definida que contiene cadenas alifáticas y heteroátomos, así como la presencia de grupos funcionales hidroxamatos y/o amidas y que no contiene anillos aromáticos ni dobles enlaces, con lo cual se confirma la existencia de un sideróforo (figuras 29 y 30). Asimismo, los espectros de RMN del compuesto 2 mostraron la presencia de un sistema complejo de apariencia polimérica con un alto grado de polidispersidad y desorden, que contiene en su estructura cadenas alifáticas, heteroátomos, grupos carbonilos y anillos aromáticos (figuras 31 y 32). Las características estructurales del compuesto 2 indican que probablemente éste podría provenir del medio de cultivo utilizado para la producción del sideróforo o ser otro compuesto resultante del metabolismo de *Bacillus sp.* y por lo tanto no sería de interés determinar su eficiencia como inhibidor de corrosión potencial.



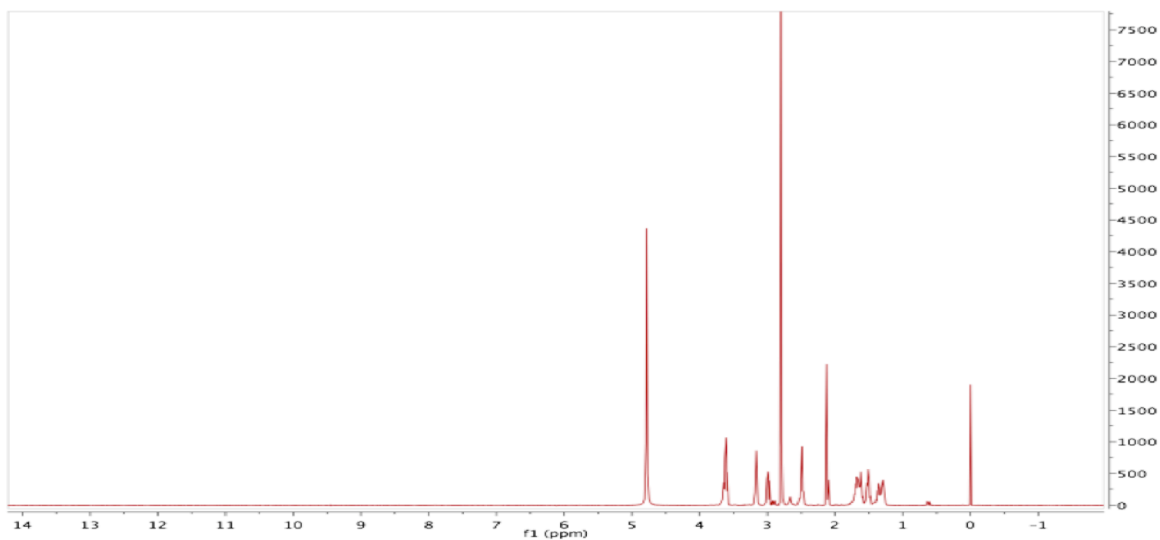


Figura 29. RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 1 en  $\text{D}_2\text{O}$  a 500 MHz.

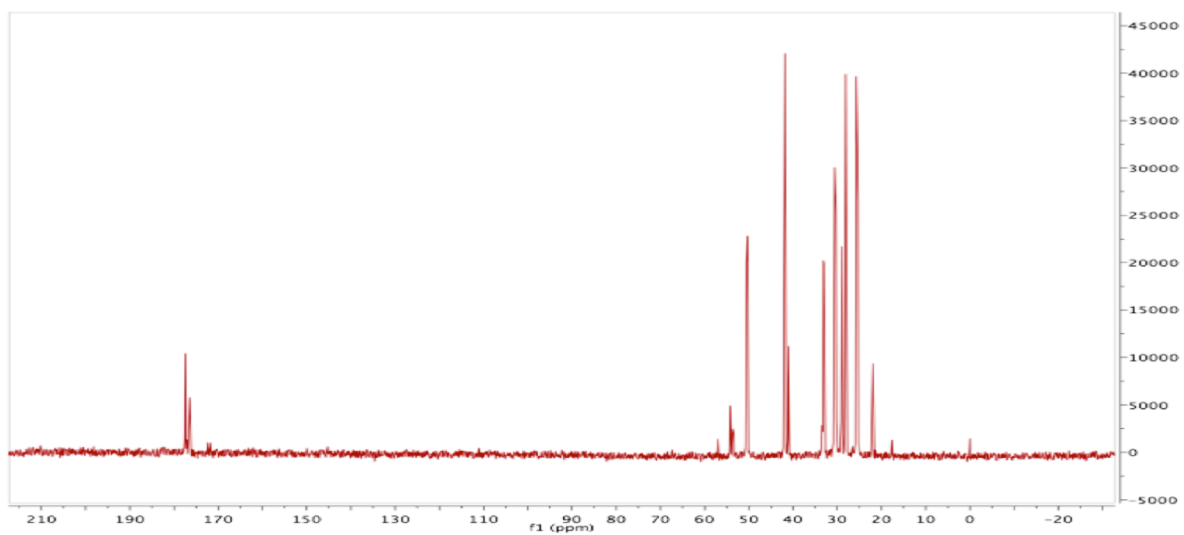


Figura 30. RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1 en  $\text{D}_2\text{O}$  a 125 MHz.

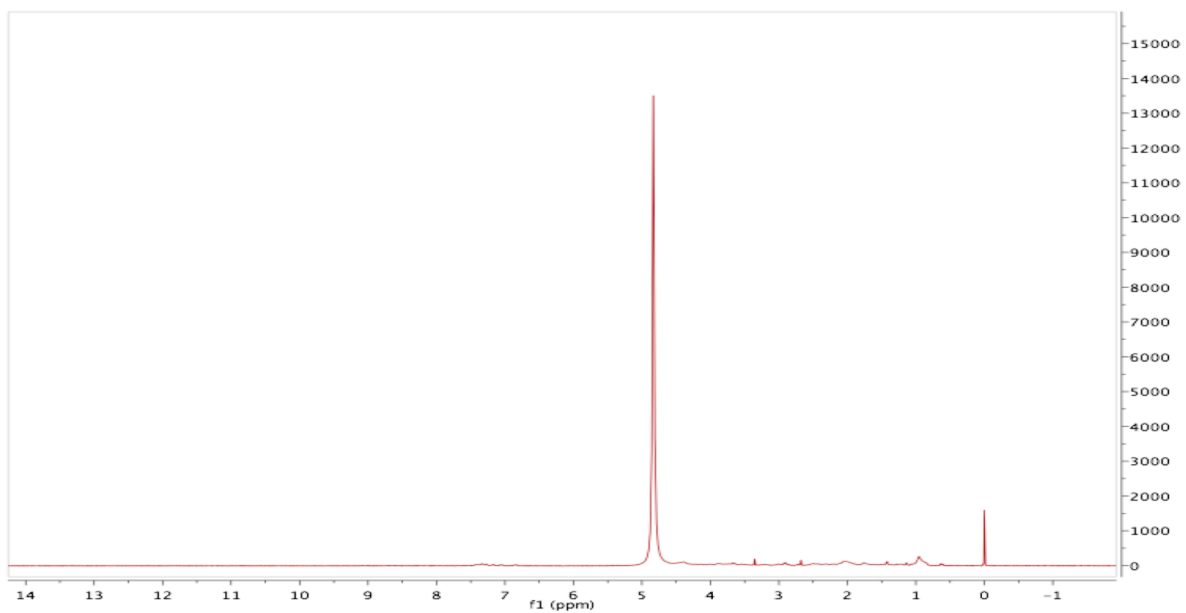


Figura 31. RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 2  $\text{D}_2\text{O}$  a 500 MHz.

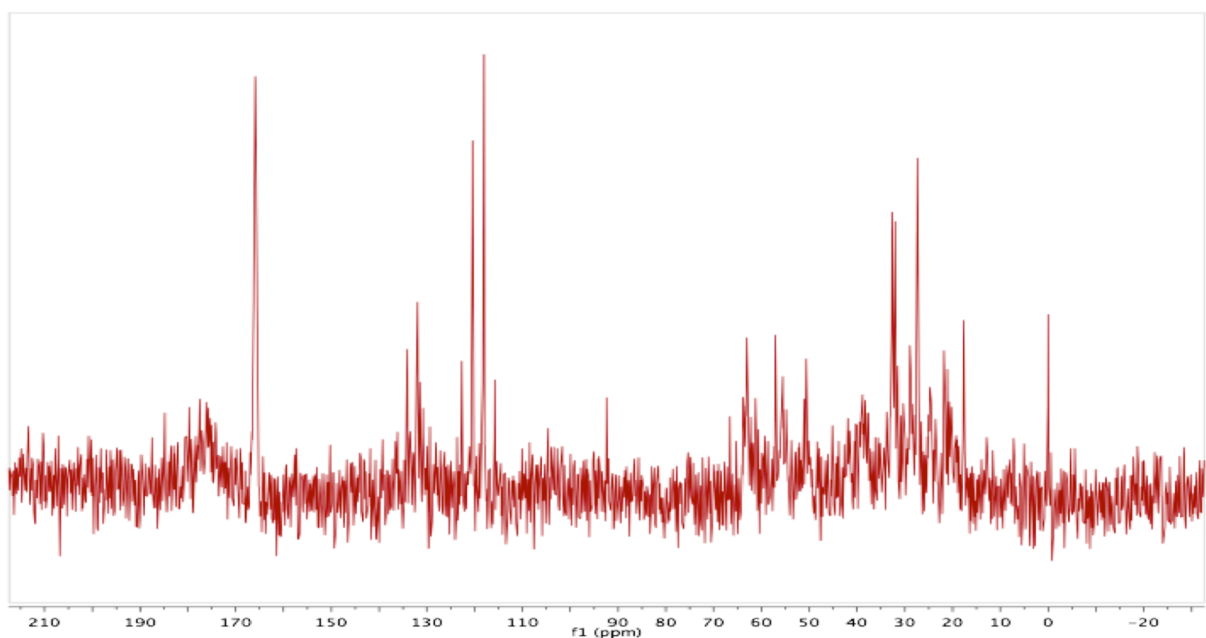


Figura 32. RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2  $\text{D}_2\text{O}$  a 125 MHz.

Los resultados de la prueba de inhibición a la corrosión del compuesto 1 se presentan en la tabla 30. El análisis de los resultados de la tabla 30 muestra que para alcanzar eficiencias de inhibición a la corrosión mayores a 90%, y con ello poder tener el mismo nivel de desempeño que los inhibidores comerciales más eficientes, se requiere de 75 ppm del compuesto 1, lo que significa que en masa se requieren para tal fin 7.5 veces más de este compuesto que de dichos inhibidores comerciales (10 ppm). De la misma forma para su uso potencial a nivel industrial se tendría que realizar un estudio técnico-económico, en donde el compuesto 1 tendría que ser al menos 7.5 veces más económico o servir como base para ser modificado sintéticamente y poder alcanzar la misma eficiencia a menores concentraciones.

Tabla 30. Eficiencias de inhibición a la corrosión para el compuesto 1.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Velocidad de corrosión (mpa)</b>	<b>Eficiencia de inhibición (%)</b>
1	10	4.48	84.14
	25	5.89	79.13
	50	5.89	79.13
	75	2.75	90.26
	100	1.99	92.95
Blanco	0	28.23	0

En la tabla 31 se muestra una comparación de los resultados de eficiencias de inhibición a la corrosión obtenidos con concentraciones de 10 y 25 ppm, para la

muestra S7, la fracción C y el compuesto 1. Cabe recordar que el compuesto 1 fue obtenido a través del proceso de purificación de la muestra S7 que dio origen a la fracción C y de la cual se obtuvo el compuesto 1.

Tabla 31. Comparación de las eficiencias de inhibición a la corrosión para el compuesto 1, la fracción C y la muestra S7.

<b>Compuesto</b> <b>Fracción muestra</b>	<b>Concentración</b> <b>(ppm)</b>	<b>Eficiencia de Inhibición</b> <b>(%)</b>
1	10	84.14
	25	79.13
C	10	62.43
	25	93.41
S7	10	89.66
	25	96.69

El análisis de los resultados de la tabla 29 muestra que la presencia de los subproductos en la muestra S7 y la fracción C contribuyen a incrementar la eficiencia de inhibición a la corrosión del compuesto 1. Una explicación potencial y conforme a las características estructurales obtenidas para el compuesto 2, que está presente en la mezcla con el compuesto 1 en la fracción C, sería el hecho de que existen interacciones supramoleculares entre los compuestos 1 y 2 que generan un efecto aditivo que se ve reflejado en el uso de concentraciones menores para alcanzar eficiencias de inhibición mayores a 90%. Además, uno de los principales contribuyentes a la generación de este efecto sinérgico es el hecho de que en la

muestra S7 y en la fracción C se tiene un mayor grado de hidrofobicidad que en el compuesto 1.

Potencialmente, se podría pensar que utilizar la muestra S7 como inhibidor de la corrosión en lugar del compuesto 1 representaría ventajas técnicas y económicas, sin embargo el hecho de que no se tiene un control sistemático sobre la producción de los subproductos implica que no sería posible reproducir la composición que está presente en la muestra S7, por lo que no se tendría una calidad de producto que garantice la misma eficiencia de inhibición a la corrosión.

## **VII.8 Elucidación estructural del sideróforo (compuesto 1)**

### **proveniente de la muestra S7**

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1 (figura 30) muestra un conjunto de señales en el intervalo de 171.8 a 177.5 ppm correspondiente a la presencia de carbonilos típicos de grupos hidroxamatos o amidas que están presentes en sideróforos (Demange *et al.*, 1990; Jang *et al.*, 2007), un conjunto de señales simples en el intervalo de 41.1 a 54.2 ppm, correspondientes a carbonos alifáticos que están unidos a heteroátomos, y un conjunto de señales simples en el intervalo de 21.9 a 33.5, correspondientes a carbonos alifáticos de tipo metilénicos y metílicos característicos de cadenas grasas.

En todo el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observan un par de conjuntos de señales de diferentes intensidades, lo que podría indicar la presencia de isómeros geométricos (E/Z) en diferentes proporciones (Zamudio- Rivera, 2001),

---

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 29) muestra un conjunto de señales múltiples en el intervalo de 3.59 a 3.65 ppm, que corresponden a dos tripletes de protones metilénicos cuyos carbonos se encuentran unidos a heteroátomos, que podrían ser nitrógenos de grupos hidroxamatos; una señal triple en 3.16 ppm de protones metilénicos cuyos carbonos se encuentran unidos a heteroátomos, que podrían ser nitrógenos de grupos amida; una señal triple en 2.99 ppm, correspondiente a protones metilénicos cuyos carbonos se encuentran unidos a heteroátomos y que podrían ser nitrógenos de grupos aminas que se encuentran en forma de sal; una señal simple en 2.80 ppm correspondiente a protones metílicos cuyo carbono se encuentra unido a heteroátomos, que podrían ser azufre, una señal triple en 2.79 ppm correspondiente a protones metilénicos cuyos carbonos se encuentran unidos a carbonilos de grupos hidroxamatos; una señal triple en 2.49 ppm correspondiente a protones metilénicos cuyos carbonos se encuentran unidos a carbonilos de grupos amida; una señal simple en 2.13 ppm correspondiente a protones metílicos cuyos carbonos se encuentran unidos a carbonilos de grupos hidroxamato; tres conjuntos de señales múltiples complejas en el intervalo de 1.26 a 1.71 ppm, correspondientes a protones metilénicos de cadenas alifáticas.

En el espectro de infrarrojo del compuesto 1 (ver figura 33) se observa la presencia de una banda ancha que abarca el intervalo de 2300 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual indica que el compuesto 1 se encuentra en forma de sal, de una amina primaria. Igualmente, dentro de esta banda ancha se encuentran definidos cuatro picos de la misma intensidad en 3325, 3128, 2934, 2864  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Los picos en 3325 y 3128  $\text{cm}^{-1}$  corresponderían a vibraciones de tensión de protones ácidos

unidos a átomos de nitrógeno presentes en grupos amida y/o aminas y a átomos de oxígeno presentes en grupos hidroxamatos. Por otra parte, las vibraciones en 2934 y 2864  $\text{cm}^{-1}$  se encuentran asociadas con vibraciones de tensión de carbonos metilénicos. Aunado a esto, en 1158 y en 1046  $\text{cm}^{-1}$ , se tienen dos bandas de vibración de tensión correspondientes al grupo  $\text{S}(=\text{O})_2$  de sulfonatos que se encuentran en forma de sal y en 1599 y 1537  $\text{cm}^{-1}$  se observan dos bandas de vibración de flexión correspondiente al grupo  $\text{NH}^{3+}$ ; con lo cual se confirma que en la estructura del compuesto 1 se tiene la presencia de una sal de amina primaria derivada de un ácido sulfónico (sulfonato de alquilamonio). En adición, en el espectro de infrarrojo se observa en 1652  $\text{cm}^{-1}$  una banda de vibración de tensión de un carbonilo asociado a un grupo amida y una banda de vibración de tensión de un carbonilo asociado a un grupo hidroxamato en 1624  $\text{cm}^{-1}$ .

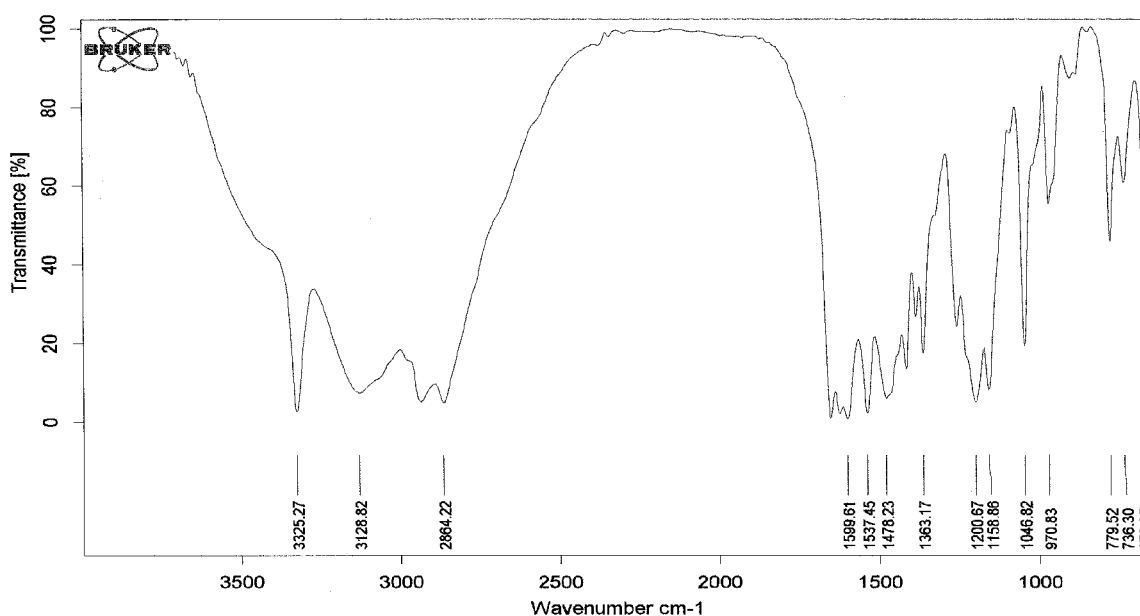


Figura 33. IR de compuesto 1.

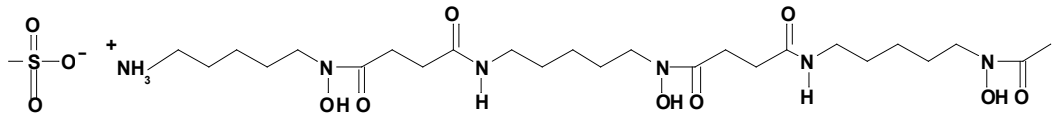
El análisis de la caracterización a través de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como de IR indica que estructuralmente el compuesto 1 está constituido por grupos hidroxamatos y amidas, que tiene en su estructura cadenas alifáticas constituidas principalmente por grupos metilénicos, que existe la presencia de una sal de amina primaria derivada de un ácido sulfónico y que el azufre en el grupo sulfonato está unido únicamente a un metilo. Asimismo, dentro del compuesto 1 no se observa la presencia de heterociclos ni carbonos metínicos, por lo cual no existen ramificaciones.

Una búsqueda sistemática en la literatura especializada en la caracterización estructural de sideróforos producidos por diferentes microorganismos que tuvieran en su estructura las características moleculares que fueron determinadas para el compuesto 1 a través de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  e IR mostró que en el año de 1989 Borgias y colaboradores habían caracterizado a través de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (utilizando como disolvente agua deuterada) el sulfonato de ferrioxamina B. Una comparación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que describieron estos investigadores para el sulfonato de ferrioxamina B con los determinados para el compuesto 1 indica de forma inequívoca que el sideróforo aislado de *Bacillus sp.* es la ferrioxamina B (tabla 32) y hasta donde es de nuestro conocimiento ésta es la primera vez que se logra aislar al sideróforo ferrioxamina B por biosíntesis a partir de *Bacillus sp.*

Existe una diferencia en los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  entre lo reportado por Borgias y en la presente tesis de alrededor de 1.8 ppm en todos los casos, lo cual se debe al hecho de que en la presente tesis se utilizó como referencia una frecuencia electrónica a 50 MHz en lugar de una referencia externa.



Tabla 32. Comparativo de desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos para la ferrioxamina B en agua deuterada por Borgias y en la presente tesis.

Estructura	Borgias		Tesis	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^*$
				
$\text{CH}_3$	2.14	20.11	2.13	21.93
$\text{C=O}$		174.34		176.20
$\text{N-OH}$				
$\text{CH}_2$	3.62	48.53, 48.70	3.62	50.37, 50.54
$\text{CH}_2$	1.63	26.30	1.62	27.94
$\text{CH}_2$	1.31	23.91	1.30	25.72
$\text{CH}_2$	1.52	28.75	1.51	30.57
$\text{CH}_2$	3.17	40.01	3.16	41.85
$\text{NH}$				
$\text{C=O}$		175.55		177.45
$\text{CH}_2$	2.50	31.18, 31.31	2.49	33.00, 33.13
$\text{CH}_2$	2.80	28.43, 28.49	2.79	30.23, 30.30
$\text{C=O}$		174.61, 174.75		176.46, 176.60
$\text{N-OH}$				
$\text{CH}_2$	3.64	48.47	3.64	50.30
$\text{CH}_2$	1.67	26.11	1.66	30.23
$\text{CH}_2$	1.37	23.49	1.36	25.32
$\text{CH}_2$	1.70	27.12	1.68	28.11
$\text{CH}_2$	3.00	40.11	2.99	42.00
$\text{NH}_3^+$				
$\text{CH}_3\text{SO}_3^-$	2.81	39.31	2.80	41.11

## VII.9 Determinación de la toxicidad aguda de la ferrioxamina B (compuesto 1)

La toxicidad aguda de la ferrioxamina B fue determinada a través de la técnica Microtox®, usando el protocolo de 90% (apéndice A-4). Los resultados obtenidos de la prueba se muestran en la tabla 33.

Tabla 33. Toxicidad aguda de la ferrioxamina B.

5 minutos		15 minutos	
[EC <sub>50</sub> ]	IC 95%	[EC <sub>50</sub> ]	IC 95%
773.0 mg/L	558 -1071	992.0 mg/L	653 -1508

Una comparación de los resultados de toxicidad aguda obtenidos para la ferrioxamina B con la clasificación establecida por la PARCOM para productos químicos que se aplican en el Mar del Norte, indica que este sideróforo está clasificado como bajamente tóxico (LC<sub>50</sub> 100 a 1000 mg/L). Cabe mencionar que este resultado es sumamente alentador, debido a que los inhibidores comerciales más eficientes que se utilizan en la industria petrolera para controlar problemas de corrosión en medios ácidos están en las categorías de moderado a ligeramente tóxicos.

## VII.10 Determinación del coeficiente de partición y del volumen

### molecular a través de cálculos teóricos de la ferrioxamina B

La determinación del volumen molecular y el coeficiente de partición del sulfonato de ferrioxamina B a través de cálculos teóricos no se pudo realizar a través del paquete *Hyperchem*, debido a que en éste no se tiene parametrizado al átomo de azufre y por lo tanto los valores de coeficiente de partición que se obtendrían no serían confiables. Ante esta situación, se decidió utilizar como modelo a la ferrioxamina B, que sería el precursor para la formación del sulfonato de amina (figura 34). Aunado a esto, al encontrarse en la ferrioxamina B un grupo de amina primaria se podría realizar reacciones con ácidos carboxílicos que permitían incrementar su hidrofobicidad, su volumen molecular y por ende, su eficiencia de inhibición a la corrosión.

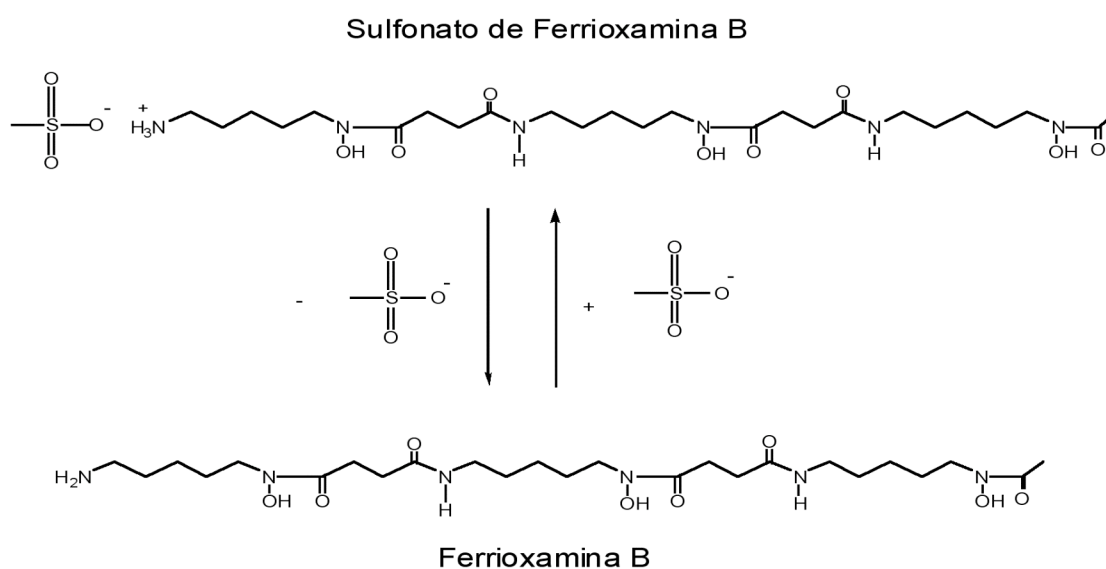


Figura 34. Proceso para la obtención de ferrioxamina B.

El volumen molecular y el coeficiente de partición obtenidos para la ferrioxamina B fueron de  $1760 \text{ \AA}^3$  y  $-1.00$ , respectivamente. Una comparación del coeficiente de partición obtenido para la ferrioxamina B con los criterios establecidos por la PARCOM para bioacumulación indica que este compuesto no es bioacumulable. Asimismo, de manera indirecta se puede inferir que el sulfonato de ferrioxamina B sería también un compuesto no bioacumulable, debido a que las sales de alquil-sulfonatos de sodio hasta de una longitud de cadena de 10 tienen coeficientes de partición menores a 3 (Roberts, 2002 y Hodges *et al.*, 2006).

Con los resultados de toxicidad y bioacumulación obtenidos para la ferrioxamina B, se puede afirmar que este sideróforo sería un inhibidor de corrosión ecológico.

### **VII.11 Simulación de la interacción de la ferrioxamina B con una superficie de hematita**

Con la finalidad de determinar si la ferrioxamina B forma una película protectora sobre superficies corroidas, donde el producto de corrosión principal es hematita, se simuló a través de cálculos teóricos con un nivel de mecánica molecular y a través del programa *Material Studio* la interacción de la ferrioxamina B con una superficie de hematita.

La simulación muestra que la ferrioxamina B interactúa a través de dos grupos hidroxamato con la superficie de hematita (figura 35). En función de las distancias de enlace encontradas, solamente el grupo hidroxamato central forma un quelato, por lo

que este tipo de sideróforos forma una película protectora que funciona como inhibidor de corrosión. De la misma forma, la geometría que presenta la ferrioxamina B después de la interacción con la superficie corroida indica que si al grupo amino se le añadiera una cadena alifática la superficie que se cubriría sería mucho mayor y se generarían inhibidores de corrosión más eficientes para medios corrosivos característicos de la industria petrolera.

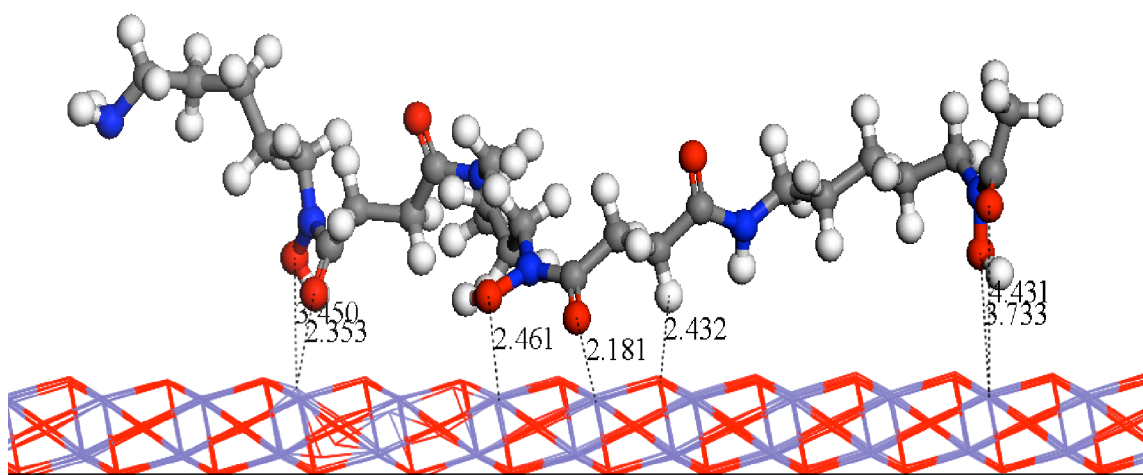


Figura 35. Ferrioxamina B interactuando con la superficie de hematita.

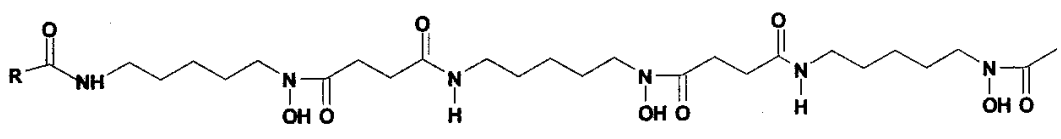
## VII.12 Diseño de nuevos prototipos de inhibidores de corrosión ecológicos derivados de la ferrioxamina B

En consideración a las características estructurales de la ferrioxamina B, a los parámetros físicos que determinan la bioacumulación y eficiencia de inhibición a la corrosión y a los resultados que muestran que la ferrioxamina B es un inhibidor ecológico, del cual se requieren al menos 75 ppm para controlar eficientemente la

corrosión que se presenta en medios agresivos característicos de la industria petrolera, se procedió a diseñar nuevos prototipos de inhibidores de corrosión más eficientes potencialmente, que sigan cumpliendo con los criterios de bioacumulación, biodegradabilidad y toxicidad que especifica la PARCOM.

Los nuevos prototipos de potenciales inhibidores de corrosión base sideróforos anfífilos sintéticos derivados de la ferrioxamina B se muestran en la tabla 34.

Tabla 34. Coeficientes de partición y volumen molecular de prototipos de sideróforos anfífilos sintéticos derivados de la ferrioxamina B.



Compuesto	R	Coeficiente de Partición (Log P)	Volumen Molecular (Å <sup>3</sup> )
FO-BS-1	-CH <sub>3</sub>	-1.17	1875.1
FO-BS-2	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-0.15	1984.2
FO-BS-3	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	0.64	2093.3
FO-BS-4	-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	1.44	2202.8
<b>FO-BS-5</b>	<b>-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub></b>	<b>2.23</b>	<b>2312.5</b>
<b>FO-BS-6</b>	<b>-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub></b>	<b>3.02</b>	<b>2421.1</b>
FO-BS-7	-C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	3.81	2528.3
FO-BS-8	-C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	4.61	2639.6

El análisis de los resultados de la tabla 34 indica que los principales candidatos de prototipos a sintetizar que tendrían las características idóneas para funcionar como inhibidores de corrosión base sideróforos anfífilos sintéticos derivados de la ferrioxamina B serían **FO-BS-5 y FO-BS-6**.

# CONCLUSIONES

## Capítulo VIII

---

*Bacillus sp.* produce ferrioxamina B, la cual es un sideróforo tipo hidroxamato que mostró ser un inhibidor ecológico del cual se requieren al menos 75 ppm para controlar eficientemente la corrosión que se presenta en medios agresivos característicos de la industria petrolera.

En consideración a las características estructurales de la ferrioxamina B, se pueden diseñar nuevos prototipos de inhibidores de corrosión ecológicos base sideróforos anfifílicos sintéticos que serían potencialmente más eficientes, seguirían cumpliendo con los criterios de bioacumulación, biodegradabilidad, toxicidad; y además podrían ser utilizados a nivel industrial.

El trabajo realizado sustenta que la biotecnología es una ciencia multidisciplinaria y una herramienta necesaria para el desarrollo de nuevos productos y proyectos que ayuden a generar soluciones ecológicas que resuelvan problemáticas nacionales, en donde el impacto ambiental es relevante.



# BIBLIOGRAFÍA

## Capítulo IX

---

- Actis** LA, Fish W, Crosa JH, Kellerman K, Ellenberger SR, Hauser FM, Sanders-Loehr J. 1986. "Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1)". *Journal of Bacteriology* **167**: 57-65.
- Adolphs** M, Taraz K, Budzikiewicz H. 1996. "Catecholate siderophores from *Chryseomonas luteola*". *Journal of Biosciences* **51**: 281-285.
- Andrews** SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. 2003. "Bacterial iron homeostasis". *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 215-237.
- Andriollo** N, Guarini A, Cassani G. 1992. "Isolation and characterization of Pseudobactin-type siderophore from *Pseudomonas* species strain PD 30". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 1245-1248.
- Arnow** LE. 1937. "Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures". *Journal of Biological Chemistry* **118**(2): 531-537.
- Baakza** A, Vala AK, Dave BP, Dube HC. 2004. "A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **311**: 1-9.
- Bachhawat** AK, Ghosh S. 1987. "Iron transport in *Azospirillum brasilense*: role of the siderophore spirolobactin" *Journal of General Microbiology* **133**: 1759-1765.
- Barbeau** K, Rue EL, Bruland KW, Butler A. 2001. "Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron (III) - binding ligands". *Nature* **413**: 409-413.
- Barbeau** K, Zhang G, Live DH, Butler A. 2002. "Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter*

*hydrocarbonoclasticus*". Journal of the American Chemical Society **124**(3): 378-379.

**Barelmann** I, Meyer JM, Taraz K, Budzikiewicz H. 1996. "Cepaciachelin, a new catecholate siderophore from *Burholderia (Pseudomonas) cepacia*". Journal of Biosciences **51**: 627-630.

**Barghouti** S, Young R, Olson MO, Arceneaux JE, Clem LW, Byers BR. 1989. "Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*". Journal of Bacteriology **171**(4): 1811-1816.

**Bergeron** RJ, Huang G, Smith RE, Bharti N, McManis JS, Butler A. 2003. "Total synthesis and structure revision of petrobactin". Tetrahedron **59**:2007–2014.

**Borgias** B, Hugi AD, Raymond KN. 1989. "Isomerization and solution structures of desferrioxamina B complexes of aluminum (3+) and gallium (3+)". Inorganic Chemistry **28**(18): 3538 -3545.

**Boukhalfa** H, Crumbliss A. 2002. "Chemical aspects of siderophore mediated iron transport". Biometals **15**(4): 325-339.

**Braud** A, Jézéquel K, Léger MA, Lebeau T. 2006. "Siderophore production by using free and immobilized cells of two Pseudomonads cultivated in a medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb)". Biotechnology and Bioengineering **94**(6): 1081-1088.

**Braun** V, Killmann H. 1999. "Bacterial solutions to the iron-supply problem". Trends in Biochemical Sciences **24**: 104-109.

- Brickman** TJ, Hansel JG, Miller MJ, Armstrong SK. 1996. "Purification, spectroscopic analysis and biological activity of the macrocyclic dihydroxamate siderophores alcaligin produced by *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*". *Biometals* **9**: 191-203.
- Browner** MF, Smith WW, Castelhana AL. 1995. "Crystal structures of matrilysin-inhibitor complexes". *Biochemistry* **34**(20): 6602-6610.
- Buchanan** SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, Van der Helm D, Deisenhofer J. 1999. "Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*". *Nature Structural Biology* **6**: 56-63.
- Budzikiewicz** H. 2005. "Bacterial Citrate Siderophores". *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2**(2): 119-124.
- Budzikiewicz** H. 1997. "Siderophores of *Pseudomonas fluorescens*". *Journal of Biosciences* **52**: 713-720.
- Budzikiewicz** H, Munzinger M, Taraz K, Meyer JM. 1997. "Schizokinen, the siderophore of the plant deleterious bacterium *Ralstonia solanacearum* ATCC 11696". *Journal of Biosciences* **52**: 496-503.
- Burke** SA, Wright JD, Robinson MK, Bronk BV, Warren R. 2004. "Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis". *Applied Environmental Microbiology* **70**: 2786-2790.
- Butler** A. 2005. "Marine siderophores and microbial iron mobilization". *Biometals* **18**(4): 369-374.

- Butler** A. 1998. "Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms". *Science: Chemistry and Biology of the Oceans* **280**: 206-210.
- Buyer** JS, De Lorenzo V, Neilands JB. 1991. "Production of the siderophore aerobactin by a *halophilic pseudomonad*". *Applied and Environmental Microbiology* **57**(8): 2246-2250.
- Cendrowski** S, MacArthur W, Hanna P. 2004. "Bacillus anthracis requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence". *Molecular Microbiology* **51**(2): 407-417.
- Cooper** SR, McArdle JV, Raymond KN. 1978. "Siderophore electrochemistry: relation to intracellular iron release mechanism". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**(8): 3551-3557.
- Cornish** AS, Page WJ. 1995. "Production of the triscatecholate siderophore protochelin by *Azobacter vinelandii*". *Biometals* **8**: 332-338.
- Cotton** FA, Wilkinson G. 1980. "Advanced inorganic Chemistry". Wiley-Interscience, New York p 744.
- Cowart** RE. 2002. "Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition". *Archives of Biochemical and Biophysics* **400**: 273-281.
- Cox** DC. 1994. "Deferration of laboratory media and assays for ferric and ferrous ions". *Methods in Enzymology* **235** (24):315-329.
- Cox** DC, Rinehart KL, Moore ML, Cook JC. 1981. "Pyochelin, a novel structure of iron chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**: 4256-4260.

- Cronin** MTD, Livingstone DJ. 2004. "Methology" y "QSARs for environmental toxicity and fate" in Predicting Chemical Toxicity and Fate. Ed. CRC-Press. pp. 15-151 y 263-373.
- De Luca** NG, Wood PM. 2000. "Iron uptake by fungi: contrasted mechanisms with internal or external reduction". *Advances in Microbial Physiology* **43**: 39-74.
- Demange** P, Bateman A, Dell A, Abdallah MA. 1988. "Structure of azobactin D, a siderophore of *Azotobacter vinelandii* strain D (CCM-289)". *Biochemistry* **27**: 2745-2752.
- Demange** P, Wendenbaum S, Linget C, Mertz C, Cung MT, Dell A, Abdallah MA. 1990. "Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins Pa, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692". *Biology of Metals* **3**: 155-170.
- Dilworth** MJ, Carson C, Giles RGF, Byrne LT, Gleen AR. 1998. "*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicbactin". *Microbiology* **144**: 748-791.
- Drechsel** H, Tschierske M, Thieken A, Jung G, Zahner H, Winkelmann G. 1995. "Siderophore rhizoferrin and its analogs produced by direct fermentations". *Journal of Indian Microbiology* **14**: 105-112.
- Drechsel** H, Friends S, Nicholson G. 1993. "Purification and chemical characterization of staphyloferrin B, a hydrophilic siderophore from *Staphylococci*". *Biomaterials* **6**: 185-192.

- Drechsel** H, Metzger J, Freund S, Jung G, Boelaert JR, Winkelmann G. 1991. "Rhizoferrin-a novel siderophore from the fungus *Rhizopus microsporus* of rhizopodiformis". *Biometals* **4**: 238-243.
- Drews** A, Kraume M. 2007. "On maintenance models in severaly and long-term limited membrane bioreactor cultivations". *Biotechnology and Bioengineering* **96**(5): 892-903.
- Duda** Y, Govea-Rueda R, Galicia M, Beltrán HI, Zamudio-Rivera LS. 2005. "Corrosion Inhibitors: Design, Performance, and Computer Simulations". *Journal of Physical Chemistry B* **109**(47): 22674-22684.
- Ecker** DJ, Emery T. 1983. "Iron uptake from ferrichrome A and iron citrate in *Ustilago sphaerogena*". *Journal of Bacteriology* **155**(2): 616-622.
- Ehlert** G, Taraz K, Budzikiewicz H. 1994. "Bacterial constituents, serratiochelin, a new catecholate siderophore from *Serratia marcescens*". *Journal of Biosciences* **49**: 11-17.
- Edwards** A, Osborne C, Webster S, Klenerman D, Joseph M, Ostovar P, Doyle M, 1994. "Mechanistic studies of the corrosion inhibitor oleic imidazoline". *Corrosion Science* **36**(2): 315- 325.
- Emery** T. 1965. "Isolation, Characterization, and Properties of Fusarinine, a  $\delta$ -Hydroxamic Acid Derivative of Ornithine". *Biochemistry* **4**(7): 1410- 1417.
- Feistner** G, Korth H, Ko H, Pulverer G, Budzikiewicz H. 1983. "Ferrosamine a siderophore from *Erwinia rhapontici*". *Current Microbiology* **8**: 239-243.

- Ferguson** AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W. 1998. "Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide". *Science* **282**: 2215-2220.
- Ferguson** AD, Chakraborty R, Smith BS, Esser L, Van der Helm D, Deisenhofer J. 2002. "Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA". *Science* **295**: 1715-1719.
- Ferreras** JA, Ryu JS, Di Lello F, Tan DS, Quadri LEN. 2005. "Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*". *Nature Chemical Biology* **1**:29-32.
- Fiss** EH, Yu SW, Jacobs WR. 1994. "Identification of genes involved in the sequestration of iron mycobacteria- the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways". *Molecular Microbiology* **14**: 557-569.
- Flores** OAE, Lozada y Cassou M, Galicia GM, Beltran CIH, George TR, Zamudio-Rivera LS, Morales PA, Benavides LA. 2007. "Inhibidores de la corrosión multifuncionales, biodegradables y de baja toxicidad". MX 2466403.
- Fontecave** M, Coves J, Pierre JL. 1994. "Ferric reductases or flavin reductases". *Biometals* **7**: 3-8.
- Forney** LJ, Zhou X. Brown JC. 2004. "Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king". *Current Opinion in Microbiology* **7**: 210-220.
- Frederick** CB, Bentley MD, Shive W. 1982. "The structure of the fungal siderophore, isotriornicin" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **105**: 133-138.



- Frederick** CB, Bentley MD, Shive W. 1981. "Structure of triornicin, a new siderophore". *Biochemistry* **20**(9): 2436-2438.
- Graham** HT. 1990. "Chemical inhibitors for corrosion control". *Royal Society of Chemistry* **4**: 7-15.
- Grams** F, Crimmin M, Hinnes L. Huxley P. 1995. "Structure determination and analysis of human neutrophil collagenase complexed with a hydroxamate inhibitor". *Biochemistry* **34**(43): 14012-14020.
- Green** TR, Wu DE. 1985. "Detection of NADPH diaphorase activity associated with human neutrophil NADPH-O<sub>2</sub> oxidoreductase activity" *FEBS Letters* **179**: 82-86.
- Griffiths** GL, Sigel SP, Payne SM, Neilands JB. 1984. "Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio Cholerae*". *Journal of Biological Chemistry* **259**: 383-385.
- Grimm** PW, Allen PJ. 1954. "Promotions by microorganisms in formation of cytochromes in *Ustilago sphaerogena*". *Plant Physiology* **29**:369-377.
- Gobin** J, Horwitz MA. 1996. "Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to Mycobactins in the *M.tuberculosis* cell wall". *Journal of Experimental Medicine* **183**: 1527-1532.
- Gobin** J, Moore CH, Reeve JR, Wong DK, Gibson BW, Horwitz MA. 1995. "Iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis*: isolation and characterization of a family of iron-binding exochelins". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 5189-5193:
- Guan** LL, Kamino K. 2001. "Bacterial response to siderophore and quorum-sensing chemical signals in the seawater microbial community". *BMC Microbiology* **1**: 7-37.

- Guan** LL, Sera Y, Adachi K, Nishida F, Shizuri Y. 2001. "Isolation and evaluation of nonsiderophore cyclic peptides from marine sponges". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**(4): 976-981.
- Guerinot** ML. 1994. "Microbial iron transport". *Annual Review of Microbiology* **48**: 743-772.
- Gutzeit** J. 1968. "Corrosion of steel by sulfides and cyanides in refinery condensate water". *Materials Protections and Performance* **12**: 17-24.
- Haag** H. 1993. "Purification of yersiniabactin, a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*". *Journal of General Microbiology* **139**: 2159-2165.
- Hall** RM, Ratledge C. 1986. "Distribution and application of mycobactins for the characterization of species within the genus *Rhodococcus*". *Journal of Genetical Microbiological* **132**(3):853-856.
- Hantke** K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. 2003. "Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains are recognized by the outer membrane receptor Iron". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 3677-3682.
- Harrington** GL, Neilands JB. 1982. "Isolation and characterization of dimerum acid from *Verticillium dahliae*". *Journal of Plant Nutrition* **5**: 675-682.
- Hider** RC. 1984. "Siderophore mediated absorption of iron". *Structure and Bonding* **58**: 25-87.
- Hickford** SJH, Küper FC, Zhang G, Carrano CJ, Blunt JW, Butler A. 2004. "Petrobactin Sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium

*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*". Journal of Natural Products **67**: 1897-1899.

**Higgs** PI, Myers PS, Pestle K. 1998. "Interactions in the Tomb-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers". Journal of Bacteriology **180**(22): 6031-6038.

**Hodges** G, Roberts DW, Marshall SJ, Dearden JC. 2006. "Defining the toxic mode of action of ester sulphonates using the joint toxicity of mixtures". Chemosphere. **64**: 17-25.

**Hohlneicher** U, Hartmann R, Taraz K, Budzikiewicz H. 1995. "A new triad of siderophores from *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 and its relation to *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525". Journal of Biosciences **50**: 337-344.

**Hohlneicher** U, Hartmann R, Taraz K, Budzikiewicz H. 1992. "Structure of ferribactin from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525". Journal of Biosciences **47**: 1633-1638.

**Hossain** MB, Jalal MAF, Van der Helm D. 1997. "6-L-alanineferrirubin, a ferrichrome-type siderophore from the fungus *Aspergillus ochraceus*". Acta crystallographica. Section C, Crystal structure communications **53** (6):716-718.

**Hossain** MB, Jalal MAF, Benson BA, Barnes CL, Van der Helm D. 1987. "Structure and conformation of two coprogen-type siderophores. Neocoprogen I and neocoprogen II". Journal of the American Chemical Society **109**(16): 4948-4954.

**Howard** DH. 1999. "Acquisition, Transport, and Storage of Iron by Pathogenic Fungi". Clinical Microbiology Reviews **12**: 394-404.

- Hossain** MB, Eng-Wilmot DL, Loghry R A, Van der Helm D. 1980. "Circular dichroism, crystal structure, and absolute configuration of the siderophore ferric N,N',N"-triacetylfusarinine, FeC<sub>39</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub>". Journal of the American Chemical Society **102**(18): 5766–5773.
- Hu** XC, Boyer GL. 1996. "Siderophore mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213". Applied and Environmental Microbiology **62**(11): 4044-4048.
- Hu** XC, Boyer GL. 1995. "Isolation and characterization of the siderophore N-deoxyschizokinen from *Bacillus megaterium* ATCC 19213". Biometals **8**: 357-364.
- Hudgins** CM. 1969. "Sulfide corrosion problems in the petroleum industry". Materials Protection and Performance **1**: 41-47.
- Huschka** H, Jalal MAE, Van der Helm D, Winkelmann G. 1986. "Molecular recognition of siderophores in fungi: role of iron-surrounding N-acyl residues and the peptide backbone during membrane transport in *Neurospora crassa*". Journal of Bacteriology **167**(3): 1020-1024.
- Jalal** MAF, Love SK, Van der Helm D. 1986. "Siderophore Mediated Iron(III) Uptake in *Gliocladium virens*: 1. Properties of *cis*-Fusarinine, *trans*-Fusarmine, Dimerum Acid, and Their Ferric Complexes". Journal of Inorganic Biochemistry **28**(4): 417-430.
- Jalal** MAF, Galles JL, Van der Helm D. 1985. "Structure of des (diserylglycyl)ferrirhodin, DDF, a novel siderophore from *Aspergillus ochraceus*" Journal of Organic Chemistry **50**(26): 5642–5645

- Jalal** MA, Mocharla R, Barnes CL, Hossain MB, Powell DR, Eng-Wilmot DL, Grayson SL, Benson BA, Van der Helm D. 1984. "Extracellular siderophores from *Aspergillus ochraceus*". *Journal of Bacteriology* **158**(2): 683-688.
- Jang** JH, Kanoh K, Adachi K, Matsuda S, Shizuri Y. 2007. "Tenacibactins A-D, hydroxamate siderophores from a marine derived bacterium, *Tenacibaculum* sp. A4K-17". *Journal of Natural Products* **70**: 563-566.
- Keller-Schierlein** W, Hagmann L, Zahner H, Huhn W. 1988. "Maduraferrin, a novel siderophore from *Actinomadura madurae*". *Helvetica Chimica Acta* **71**: 1528-1540.
- Khodr** HH, Hider RC, Duhme-Klair AK. 2002. "The iron-binding properties of aminochelin, the mono (catecholamide) siderophore of *Azotobacter vinelandii*". *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **7**: 891-896.
- Koch** GH, Brongers MPH, Thompson NG, Virmani PY, Payer JH. 2002. "Corrosion costs and preventive strategies in the United States". *Supplement Material Performance* **6**: 1-12.
- Köster** W. 2001. "ABC transporter-mediated uptake of iron. Siderophores heme and vitamin B12". *Research in Microbiology* **152**: 291-301.
- Konopka** K, Neilands JB. 1984. "Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron". *Biochemistry* **23**(10): 2122-2127.
- Koopisch** AT, Browder CC, Moe AL, Shelley JT, Kinkel BA, Hersman LE, Iyer S, Ruggiero CE. 2005. "Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation". *Biometals* **18**: 577-585.

- Kunze B**, Trowitzschkienast W, Hofle G, Reichenbach H. 1992. "Antibiotics from bacteria 46, Nannochelin A, nannochelin B, nannochelin C new iron chelating compounds from *Nannocystis exedens* (myxobacteria) production, isolation, physicochemical and biological properties". *Journal of Antibiotics* **45**: 147-150.
- Kunze B**, Bedorf N, Kohl W, Hofle G, Reichenbach H. 1989. "Myxochelin A, a new iron chelating compound from *Angiococcus disciformis* (myxobacterales) production, isolation, physicochemical and biological properties". *Journal of Antibiotics* **42**: 14-17.
- Larsen RA**, Thomas MG, Wood GE, Postle K. 1994. "Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation (DeltaV17) by a missense mutation in ExbB". *Molecular Microbiology* **13**: 627-640.
- Lawlor KM**, Payne SM. 1984. "Aerobactin genes in *Shigella* spp. ". *Journal of Bacteriology* **160**: 266-272.
- Ledyard KM**, Butler A. 1997. "Structure of putrebactin, a new dihydroxamate siderophore produced by *Shewanella putrefaciens*" *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2**: 93-97.
- Lee AK**, Newman DK. 2003. "Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes". *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**(2/3):134-139.
- Lee CW**, Ecker DJ, Raymond KN. 1985. "The pH dependent reduction of ferric enterobactin probed by electrochemical methods and its implications for microbial iron transport". *Journal of the American Chemical Society* **107**: 6920-6923.

- Lesuisse E**, Simon-Casteras M, Labbe P. 1998. "Siderophore mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily". *Microbiology* **144**: 3455-3462.
- Liu WC**, Fisher SM, Wells JJS, Ricca CS, Principe PA, Trejo WH, Bonner DP, Gougoutos JZ, Toeplitz BK, Sykes RB. 1981. "Siderochelin, a new ferrous-ion chelating agent produced by nocardia". *The Journal of Antibiotics* **34**(7): 791-799.
- Linget C**, Collinson KS, Azadi P, William AD, Page J, Abdallah MA. 1992. "Structure of azoverdin, a pyoverdin-like siderophore of *Azomonas macrocvtogenes* ATCC 12334". *Tetrahedron Letters* **33**(14): 1889-1892.
- Linke WD**, Diekman H, Crueger A. 1972. "Metabolic products of microorganisms, Structure of terrigen factor". *Archives of Microbiology* **85**: 44-50.
- Lyon S**. 2004. "A natural solution to corrosion". *Nature* **427**: 406-407.
- Macrellis HM**, Trick CG, Rue EL, Smith G, Bruland KW. 2001. "Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater". *Marine Chemistry* **76**(3): 175-187.
- Martin C**, Scholten TH, Chris C, Huwer K, Huwer S. 2000. "Ecotoxicological risk assessment related to chemicals and pollutants in off-shore oil production" *Toxicology Letters* **112**(15): 283-288
- Martinez JS**, Zhang GP, Holt PD, Jung HT, Carrano CJ, Haygood MG, Butler A. 2000. "Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria" *Science* **287**(2): 1245-1247.

- Martinez** JS, Haygood MG, Butler A. 2001. "Identification of a natural desferrioxamine siderophore produced by a marine bacterium" *Limnology and Oceanography* **46**(2): 420-424.
- Martinez** JS, Carter-Franklin JN, Mann EL, Martin JD, Haygood MG, Butler A. 2003. "Structure and membrane affinity of a suite of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(7): 3754-3759.
- Matzanke** BF, Bill E, Trautwein AX, Winkelmann G. 2006. "Siderophores as iron storage compounds in the yeasts *Rhodotorula minuta* and *Ustilago sphaerogena* detected by in vivo Mössbauer spectroscopy". *Hyperfine Interactions* **58**(6): 1-4.
- McCafferty** E, McArdle JV. 1995. "Corrosion inhibition of iron in acid solutions by biological siderophores". *Journal of the Electrochemical Society* **142**(5): 1447-1453.
- Meiwe**s J. 1990. "Isolation and characterization of staphyloferrin-A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM-20459". *FEMS Microbiology Letters* **67**: 201-205.
- Meyer** JM, Halle F, Hohnadel D. 1989. "Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore". *Journal of General Microbiology* **135**: 1479-1487.
- Meyer** JM, Van TV, Stints A, Berge O, Winkelmann G. 1995. "Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*)". *Biometals* **8**: 309-317.



- Milagres** AMF, Machuca A. Napoleao. 1999. "Detection of siderophore from several fungi and bacteria by modifications of chrome azurol S (CAS) agar plate assay". *Journal of Microbiological Methods* **37**:1-6.
- Miller** GL. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry* **31**:426-429
- Moore** CH, Foster LA, Gerbig DGJ, Dyer DW, Gibson BW. 1995. "Identification of alcaligin as the siderophore produced by *Bordetella pertussis* and *B. brochiseptica*". *Journal of Bacteriology* **177**(4): 1116-1118.
- Mullis** KB, Pollack JR, Neilands JB. 1971. "Structure of schizokinen, an iron transport compound from *Bacillus megaterium*" *Biochemistry* **21**: 4894-4898.
- Munzinger** M. 1999. "S, S-rhizoferrin (enantio-rhizoferrin) a siderophore of *Ralstonia (Pseudomonas) pickettii* DSM 6297 the optical antipode of R, R-rhisoferrin isolated from fungi". *Biometals* **12**: 189-193.
- Naegeli** HU, Zahner H. 1980. "Metabolites of microorganisms 193, Ferrithiocin". *Helvetica Chimica Acta* **63**(6): 1400-1406.
- Nassif** X, Sansonetti PJ. 1986. "Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin". *Infection and Immunity* **54**(3): 603-608.
- Nendza** M. 1991. "QSAR of bioconcentration: validity assessment of log Pow/log BFC correlations, in bioaccumulation in aquatics systems. Ed. Naguel.
- Neilands** JB. 1995. "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds" *Journal of Biological Chemistry* **270**(45): 26723-26726.

- Neilands** JB. 1983. "Isolation and assay of 2, 3-dihydroxybenzoyl derivatives of polyamines, the siderophores agrobactin and parabactin from *Agrobacterium tumefaciens* and *Paracoccus denitrificans*". *Methods in Enzymology* **94**(3): 437-441.
- Neilands** JB. 1981. "Microbial iron compounds". *Annual Review of Biochemistry* **50**(1): 715-731.
- Nishio** T, Tanaka N, Hiratake J, Katsube Y, Ishida Y, Oda J. 1988. "Isolation and structure of the novel dihydroxamate siderophore alcaligin". *Journal of the American Chemical Society* **110**(26): 8733–8734.
- Neff** JM. 2002. "Bioaccumulation mechanism" in *Bioaccumulation in Marine Organisms*. Ed. Elsevier. pp. 37-54.
- Ohra** J, Morita K, Tsujino Y, Tazaki H, Fujimori T, Goering M, Evans S, Zorner P. 1995. "Production of the Phytotoxic Metabolite, Ferricrocin, by the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **59**:113-114.
- Okujo** N, Sakakabara Y, Yoshida T, Yamamoto S. 1994a. "Structure of acinetoferrin, a new citrate based dihydroxamate siderophore from *Acinetobacter haemolyticus*". *Biometals* **7**(1): 170-176.
- Okujo** N, Sakakabara Y, Yoshida T, Yamamoto S. 1994b. "Structure of vulnibactin, a new polyamine containing siderophore from *Vibrio vulnificus*". *Biometals* **7**(1): 109-116.

- Page** WJ, Vontigerstrom M. 1988. "Aminochelin, a catecholamine siderophore produced by *Azotobacter vinelandii*". *Journal of General Microbiology* **134**: 453-460.
- Pecoraro** VI, Harris WR, Wong GB, Carrano CJ, Raymond KN. 1983. "Fourier transform infrared-spectroscopy of ferric catecholamide analogs of enterobactin". *Journal of the American Chemical Society* **105**(14): 4623-4633.
- Pérez-Miranda** S, Cabirol N, George-Tellez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ, 2007. "O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection". *Journal of Microbiological Methods* **70**: 127–131.
- Perry** RD, Balbo PB, Jones HA, Fetherston JD, DeMoll E. 1999. "Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in transport and regulation". *Microbiology* **145**: 1181-1190.
- Persmark** M, Expert N, Neilands JB. 1989. "Isolation, characterization and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*". *Journal of Biological Chemistry* **264**: 3187-3193.
- Pollack** JR, Neilands JB. 1970. "Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **38**: 989-992.
- Qiu** G, Xiao Q, Hu Y, Qin W, Wang D. 2004. "Theoretical study of the surface energy and electronic structure of pyrite FeS<sub>2</sub> (100) using a total-energy pseudopotential method, CASTEP". *Journal of Colloid and Interface Science* **270**: 127-132.

- Ramachandran S**, Tsai B, Blanco M, Chen H, Tang Y, Goddard WA. 1996. "Self-assembled monolayer mechanism for corrosion inhibition of iron by imidazolines". *Langmuir* **12**(26): 6419-6428.
- Ramachandran S**, Tsai B, Blanco M, Chen H, Tang Y, Goddard WA. 1997. "Atomistic simulations of oleic imidazolines bound to ferric clusters". *Journal of Physical Chemistry* **101**: 83-89.
- Ratledge C**, Dover LG. 2000, "Iron metabolism in pathogenic bacteria". *Annual Review of Microbiology* **54**(1): 881-941.
- Ratledge C**, Snow GA. 1974. "Isolation and structure of nocobactin NA, a lipid soluble iron binding compound from *Nocardia asteroides*". *Journal of Biochemistry* **139**: 407-413.
- Raymond KN**, Miller G, Matzanke BF. 1984. En: Boschkl FL. Ed. *Topics in Current Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 50-102.
- Reid RT**, Butler A. 1991. "Investigation of the mechanism of iron acquisition by the marine bacterium *Alteromonas luteoviolaceus*: characterization of siderophore production" *Limnology and Oceanography* **36**(8): 1783-1792.
- Reid RT**, Live DH, Faulkner DJ, Butler A. 1993. "A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant". *Nature* **366**(6454): 455-458.
- Risse D**, Beiderbeck H, Taraz K, Budzikiewicz H, Gustine D. 1998. "Corrugatin, lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugate*". *Journal of Biosciences* **53**: 295-304.

- Roberts** DW. 2002. "Application of octanol/water partition coefficients in surfactant science: A quantitative structure-property relationship for micellization of anionic surfactants". *Langmuir* **18**(2): 345-352.
- Ryan** MP, Williams DE, Charter RJ, Hutton BM, McPhail DS. 2002. "Why stainless steel corrodes". *Nature* **405**(1): 770-774.
- Sastri** VS. 1998. "Corrosion Inhibitors. Principles and Applications", Ed, John Wiley & Sons.
- Schmitt** MP, Payne SM. 1991. "Genetic-analysis of the enterobactin gene-cluster in *Shigella flexneri*". *Journal of Bacteriology* **173**(2): 816-825.
- Schneider** R, Hantke K. 1993. "Iron hydroxamate uptake system in *Bacillus subtilis* identification of a lipoprotein as part of a binding protein dependent transport system". *Molecular Microbiology* **8**: 111-121.
- Schryvers** AB, Stojiljkovic I. 1999. "Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*". *Molecular Microbiology* **32**(6): 1117-1123.
- Schwarzenbach** G, Schwarzenbach K. 1963. "Hydroxamatkomplexe I. Die Stabilität der Eisen(III)-Komplexe einfacher Hydroxamsäuren und des Ferrioxamins B". *Helvetica Chimica Acta*. **46**(4): 1390-1400.
- Schwyn** B, Neilands JB. 1987. "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores". *Analytical Biochemistry* **160**: 46-56.
- Sedriks** AJ. 1996. "Corrosion of Stainless Steels", 2<sup>a</sup> ed., Ed. Wiley-Interscience.
- Sevinc** MS, Page WJ. 1992. "Generation of *Azotobacter vinelandii* strains defective in siderophore production and characterization of a strain unable to produce know siderophore". *Journal of General Microbiology* **138**: 587-596.

- Sharman** GJ, Williams DH, Erwing DF, Ratledge C. 1995. "Determination of structure of exochelin MN, the extracellular siderophore from *Mycobacterium-neoarum*". *Chemistry & Biology* **2**: 553-561.
- Shenker** M, Chen Y, Ghirlando R, Oliver I, Helmann M, Hadar Y. 1995. "Chemical Structure and Biological Activity of A Siderophore Produced by *Rhizopus arrhizus*". *Journal of Soil Science Society of America* **59**(3): 837–843
- Shenker** M. Oliver I. Helmann M. Hadar Y. Chen Y. 1992. "Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*". *Journal of Plant Nutrition* **15**: 2173-2182.
- Siebner-Freibach** H, Hadar Y, Yariv S, Lapides I, Chen Y. 2006. "Thermospectroscopic study of the adsorption mechanism of the hydroxamic siderophores Ferrioxamine B by Calcium Montmorillonite". *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* **54**(4):1399-1408.
- Smith** MJ, Neilands JB. 1984. "Rhizobactin, a siderophore from *Rhizobium meliloti*". *Journal of Plant Nutrition* **7**: 449-458.
- Snow** GA. 1970. "Mycobactins: iron chelating growth factors from mycobacteria". *Microbiological Reviews* **43**: 99-125.
- Stephenson** MT. 1992. "Components of produced water: a compilation of industry studies". *Journal of Petroleum Technology* **44**(1): 548-603.
- Stintzi** A, Raymond KN. 2001. "Siderophore Chemistry" in *Molecular and Cellular Iron Transport*, D. E. Templeton, Ed.; Marcel Dekker, Inc.; New York, pp. 273-319.

- Stintzi** A, Barnes C, Xu L, Raymond KN. 2000. "Microbial iron transport via a siderophore shuttle: A membrane ion transport paradigm". Proceedings of the National Academy of Sciences **97**:10691-10696.
- Stuart** SJ, Prpic JK, Robins-Browne RM. 1986. "Production of aerobactin by some species of the genus *Yersinia*". Journal of Bacteriology **166**(3): 1131-1133.
- Subramanyam** NC, Mayanna SM. 1985. Azoles as corrosion inhibitors for mild steel in alkaline mine water". Corrosion Science **25**(2): 155-160.
- Szyprowski** AJ. 2000."Relationship between chemical structure of imidazoline inhibitors and their effectiveness against hydrogen sulphide corrosion of steels". Journal of British Corrosion **35**(2): 155-160.
- Takahashi** A, Nakamura H, Kameyama T, Kurasawa S, Nawanawa H, Okami Y, Takeuchi T, Umezawa H, Iitaka Y. 1987. "Bisucaberin, a new siderophore, sensitizing tumor-cells to macrophage-mediated cytotoxicity. 2. Physicochemical properties and structure determination". Journal of Antibiotics **40**(12): 1671-1676.
- Telford** JR, Raymond KN. 1997. "Amonabactin: a family of novel siderophores from a pathogenic bacterium". Journal of Biological Inorganic Chemistry **2**: 750-761.
- Velayudhan** J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ. 2002. "Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter". Molecular Microbiology **37**(2): 274-286.
- Viswanadhan** VN, Ghose AK, Revankar GR, Robins RK. 1989. "Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed

quantitative structure-activity relationships. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics transporter". *Journal of Chemical Information and Modeling* **29**(3): 163-172.

**Wang** NS. 2003. "Sucrose assay by the dinitrosalicylic colorimetric method". Department of Chemical Engineering. University of Maryland.

**Wang** D, Li S, Ying Y, Wang M, Xiao H, Chen Z. 1999. "Theoretical and experimental studies of structure and inhibition efficiency of imidazoline derivatives". *Corrosion Science* **41**: 1911-1919.

**Weideborg** M, Vik EA, Øfjord DG, Kjønne O. 1997. "Comparison of three marine screening test and four oslo and Paris comission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals". *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(2): 384-389.

**Whale** GF. 1991. "Methods for assessing pipeline corrosion prevention chemicals on the basis of antimicrobial performance on health, safety and environmental in oil and gas exploration and production". The Netherlands.

**Williams** PH, Warner PJ. 1980. "CoIV plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*". *Infection and Immunity* **29**: 411-416.

**Winkelmann** G. 2002. "Microbial siderophore-mediated transport". *Biochemical Society Transactions* **30**(4): 691-696.



- Winkelmann G.** 1992. "Structure and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands". *Mycology Research* **96**(7): 529-534.
- Winkelmann G.** 1991a. Siderophores. En: Winkelmann G. ed. *CRC Handbook of Microbial Iron Chelates*. Boca Raton. FL: CRC Press: 61-105.
- Winkelmann G.** 1991b. "Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi". *Biotechnology Advances* **8**: 207-231.
- Wong GB, Kappel MJ, Raymond KK, Matzanke B, Winkelmann G.** 1983. "Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 24. Characterization of coprogen and ferricrocin, two ferric hydroxamate siderophores" *Journal of the American Chemical Society* **105**(4):810-815.
- Yamamoto S, Okujo N, Sakakabara Y.** 1994a. "Isolation and structure elucidation of acinetobactina a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*". *Archives of Microbiology* **162**: 249-254.
- Yamamoto S, Okujo N, Yoshida T, Matsuura S, Shinoda S.** 1994b. "Structure and iron transport activity of vibrioferrin, a new siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*". *Journal of Biochemistry* **115**: 868-974.
- Yamamoto S.** 1993. "Structures of two polyamine containing catecholate siderophores from *Vibrio fluvialis*". *Journal of Biochemistry* **113**: 538-544.
- Yang B, Morris J.** 2002. "Corrosion inhibitor for aqueous systems". U.S. Patent W002/079105A1.

**Yu SW, Fiss E, Jacobs WR.** 1998. "Analysis of the exochelin locus in *Mycobacterium smegmatis*: biosynthesis genes have homology with genes of the peptide synthetase family". *Journal of Bacteriology* **180**: 4676-4685.

**Zamudio-Rivera L.** 2001. Síntesis y caracterización de compuestos polifuncionales derivados de aminas, aminoalcoholes y aminoácidos y compuestos de estaño y boro derivados de ácidos N-alkyliminodiacéticos. Especialidad: Química Orgánica. Tutor: Dra. Teresa Mancilla Percino. .

**Zamudio-Rivera L, Estrada A, Benavides A, Estrada-Buendía, Benítez JL.** 2002. "Corrosion control of carbon steel in sulfuric acid environment by 1-(2-hydroxyethyl)-2-alkylimidazolines and its corresponding amide precursors". *Revista de la Sociedad Química de México* **46(4)**: 335-340.

**Záhner H, Anke H, Anke T.** 1983. "Evolution and secondary pathways. In: Bennet JW. Ciegler A (eds) *Secondary metabolism and differentiation in fungi*. Dekker, New York. pp. 153-171.

CEFAS. 2006. Monitoring the quality of the marine environment, 2003-2004. *Sci. Ser. Aquat. Environ. Monit. Rep. Cefas Lowestoft*. 58: 168pp

GPASI-IT-5200. Procedimiento para la aplicación y control de medidas anticorrosivas en el circuito de vapores de las plantas de destilación primaria y de vacío.

IMP-61800-10/2008. Método para la determinación de toxicidad aguda de compuestos puros y mezclas.

NACE TM-0172-2001. Standard Test Method, Determining Corrosive Properties of Cargoes in Petroleum Product Pipelines - Item No. 21204, 2001.

NRF-005-PEMEX-2000. Protección interior de ductos con inhibidores. Comité de Normalización de Petróleos Mexicanos y Organismos Subsidiarios

# APÉNDICES

## APÉNDICE A-1

Los siguientes reactivos se obtuvieron de: J.T. Baker

Etanol	H <sub>2</sub> O HPLC
Metanol	Metanol HPLC
Cloroformo	Acetonitrilo HPLC
HCl	

De SIGMA-ALDRICH QUÍMICA se obtuvieron:

Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HDTMA)  
Ácido Trifluoroacético (TFA)  
Cromo azurol S (CAS)  
Piperazina  
5-ácido sulfosalicilico dihidratado  
8-Quinolinol  
Ferricromo libre de hierro de *Ustilago sphaerogena*  
FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O  
PIPES

De DIFCO se obtuvo:

Bacto-agar

**Medios de cultivo y Salmueras****Medio Grimm-Allen (Grimm y Allen, 1954).**

Medio para ascomicetos.

Para 1 L

Glucosa	20 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.005 mg
MnSO <sub>4</sub>	0.035 mg
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2 mg
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2 mg
(CH <sub>3</sub> COO)NH <sub>4</sub>	3 g
Ácido cítrico	1 g
Tiamina	2 mg

Se añade agua Milli-Q hasta 1 L y 2.5% (p/v) de agar. Ajustar pH a 6.8. Se esteriliza a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

**Medio M9 (Shenker *et al.*, 1992).**

Glucosa	10 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0.5 g

NH <sub>4</sub> Cl	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0.25 g
CaCl <sub>2</sub>	15 mg
ZnCl <sub>2</sub>	15 mg
Tiamina	5 mg

Se añade agua Milli-Q hasta 1 L y 2.0% (p/v) de agar. Se ajusta a pH 7.2. Se esteriliza a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

### **Medio Agar Nutritivo**

Medio para bacterias.

Para 1 L

Cloruro sódico	5 g
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
Glucosa	10 g

Se ajusta pH a 7.3. Se añade agua Milli-Q hasta 1 L y 1.5% (p/v) de agar. Se esteriliza a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

### **Medio Agar Nutritivo Mejorado**

Medio para bacterias.

Para 1 L

Cloruro sódico	5 g
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
Glucosa	50 g
Succinato de sodio	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.8 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	10 mg

Se ajusta pH a 7.3. Se añade agua Mill-iQ hasta 1 L y 1.5% (p/v) de agar. Se esteriliza a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### **Salmuera Agua de Enfriamiento (Yang y Morris, 2002)**

CaCl <sub>2</sub>	360 ppm
MgSO <sub>4</sub>	200 ppm
NHCO <sub>3</sub>	100 ppm

Disolver las sales en agua.



**Salmuera H<sub>2</sub>S pH 4.0**

Para 1 L

NaCl	60 g
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	10.68 g
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	6.62 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.5 g

Disolver las sales en agua, verter la salmuera en el reactor, enfriar a 2 °C y saturar con nitrógeno durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, ajustar el pH a 4.5 con H<sub>2</sub>S.

**Tratamiento de material y medios de cultivo**

Todos los medios de cultivo fueron desferrados de la siguiente manera:

Se prepara un volumen igual al medio de cultivo que se va a desferrar de una solución al 3% de 8-hidroxiquinoleína en cloroformo. Se mezclan el medio y la solución de 8-hidroxiquinoleína y se mantienen en agitación durante 48 horas.

Después de este tiempo, se separan las dos fases y la fase acuosa se lava con volúmenes iguales de cloroformo hasta obtener el medio de cultivo cristalino. Se mantiene a 0 °C durante 12 horas, y posteriormente el medio se esteriliza a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos (Cox, 1994).

Todo el material de cristal que se utilizó fue tratado con una solución 6 N de HCl para eliminar el hierro, siendo enjuagado posteriormente con agua Milli-Q.

### **Determinación de sideróforos solución cromo azurol S (Schwyn *et al.*, 1987)**

Reactivos:

Solución stock Fe 1 mM:  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM disuelto en HCl 10 mM.

Solución stock CAS 2 mM: 0.121 g de Cromo Azurol S en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q.

Solución HDTMA: disolver 0.0219 g de HDTMA en 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q.

Buffer piperazina: Se disuelven 4.307 g de piperazina en 30 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q. El pH se ajusta a un valor de 5.6 con HCl concentrado.

Solución S: Es ácido 5-sulfosalicílico 0.2 M. Se almacena en la oscuridad.

Solución CAS. Se mezclan 1.5 mL de solución stock Fe 1 mM y 7.5 mL de solución stock CAS, y se añaden a la solución HDTMA. Finalmente se le agrega el buffer de piperazina y se afora a 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  calidad Milli-Q.

Tabla 35. Curva patrón de hidroxamatos.

<i>Tubo</i>	<i>Sol. patrón sideróforo (mL)</i>	<i>Volumen H<sub>2</sub>O Milli-Q (mL)</i>	<i>Solución CAS (mL)</i>	<i>Solución S (μL)</i>	<i>[sideróforo] (mg/mL)</i>
0	0	1	1	10	0
1	0.2	0.8	1	10	20
2	0.4	0.6	1	10	40
3	0.6	0.4	1	10	60
4	0.8	0.2	1	10	80
5	1	0	1	10	100

Cada uno de estos tubos se preparó por duplicado.

Solución stock. Ferricromo 0.1 g/L

Procedimiento. Se toma la cantidad de solución stock adecuada para obtener la concentración requerida según la tabla anterior. Se mezclan los tubos y se deja reposar 1 hora. Finalmente se lee la absorbancia a 630 nm.

Cálculos. Con las absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de sideróforo se realiza una recta patrón que relaciona directamente la concentración de sideróforo con la absorbancia. La interpolación de las absorbancias de las muestras problema en la recta obtenida permite determinar la concentración de sideróforo en los caldos de cultivo.

Procedimiento para la cuantificación de las muestras. Se mezclan 0.5 mL de solución CAS y 0.5 mL de medio de cultivo filtrado o de la muestra de sideróforos, y se añaden

10 µL de la solución S. Se deja reposar 1 hora y se mide la absorbancia de la mezcla a 630 nm.

Regresión Lineal para Curva de hidroxamato

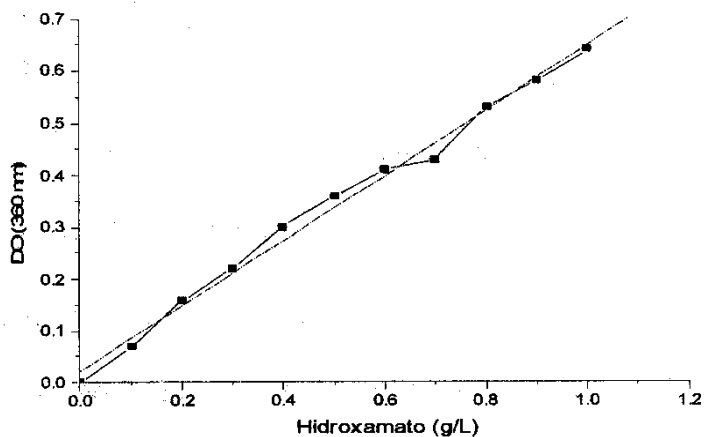
$$Y = A + B * X$$

<i>Parameter</i>	<i>Value</i>	<i>Error</i>
A	0.02364	0.01119
B	0.62545	0.01891

---

<b>R</b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
<b>0.99591</b>	0.01984	11	<0.0001

---



**Determinación de azúcares totales (DNS modificado) (Miller, 1959; Wang, 2003)**

Tabla 36. Curva patrón para la determinación de azúcares reductores.

<i>Tubo</i>	<i>Volumen de solución estándar de glucosa (1g/L) (ml)</i>	<i>Volumen de agua destilada (mL)</i>	<i>Concentración de glucosa en el tubo (mg/mL)</i>
0	0	1	0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1	0	1

Cada uno de estos tubos se preparó por duplicado.

Procedimiento.

1. Colocar 1 mL de muestra en un tubo de ensayo.
2. Agregar 20  $\mu$ L de HCl concentrado a la muestra (1), agitar en vortex.
3. Permitir la hidrólisis a 90 °C durante 5 minutos.
4. Agregar 50  $\mu$ L de KOH 5 N para neutralizar el ácido, agitar en vortex.
5. Adicionar 1 mL de reactivo DNS, agitar en vortex.
6. Llevar a ebullición en baño María durante 5 minutos.
7. Enfriar inmediatamente con hielo o agua helada.
8. Agregar 8 mL de agua destilada. Agitar en vortex y leer a 575 nm.

Cálculos. Con las absorbancias obtenidas con diferentes concentraciones de glucosa se realizó una recta patrón que relaciona directamente la concentración de glucosa

con la absorbancia. La interpolación de las absorbancias de las muestras problema en la recta obtenida permite determinar la concentración de glucosa en los caldos de cultivo.

Regresión lineal para curva de azúcares reductores

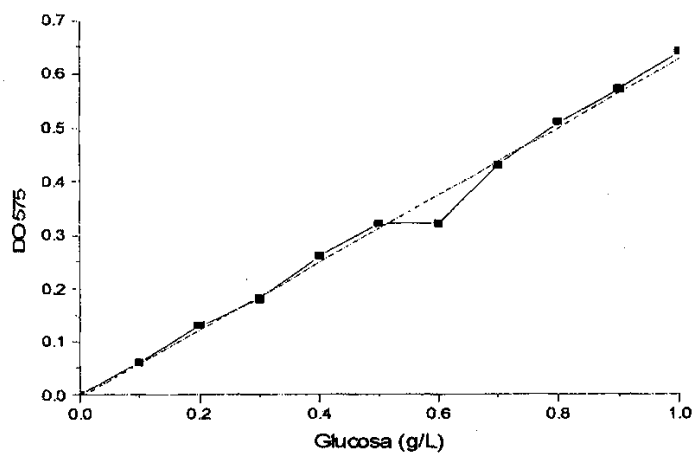
$$Y = A + B * X$$

<i>Parameter</i>	<i>Value</i>	<i>Error</i>
A	-0.00455	0.01134
B	0.06309	0.00192

---

<b>R</b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
<b>0.99587</b>	0.02011	11	<0.0001

---



## APÉNDICE A-2

### Analysis of Variance Report

Response: Sideróforo

A: Concentración de Glucosa

#### Analysis of Variance Table

Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: Concentración	3	536045.1	178681.7	41.14	0.000000*	1.000000
S	20	86863.82	4343.191			
Total (Adjusted)	23	622908.9				
Total	24					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	24	113.2439	
A: Concentración			
10	6	5.255	26.90474
30	6	39.08333	26.90474
50	6	371.0373	26.90474
60	6	37.6	26.90474

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Sideróforo

Term A: Concentración de Glucosa

Alpha=0.005 Error Term=S (A) DF=20 MSE=4343.191 Critical Value=5.454784

Group	Count	Mean	Different From Groups
10	6	5.255	50
60	6	37.6	50
30	6	39.08333	50
<b>50</b>	<b>6</b>	<b>271.0373</b>	<b>10, 60, 30</b>

Con una concentración de 50g/L se obtiene una mayor producción de sideróforos.

Response: Sideróforo

A: vvm

#### Analysis of Variance Table

Source	Sum of	Mean	Prob	Power
Term	DF	Squares	F-Ratio	Level (Alpha=0.05)
A: VVM	2	21191.22	10595.61	0.37
S	21	601717.7	28653.22	0.695291
Total (Adjusted)	23	622908.9		0.101589
Total	24			

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	24	113.2439	
A: VVM			
0.16	8	87.43625	59.84691
0.24	8	154.8692	59.84691
0.32	8	97.42625	59.84691

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Sideróforo

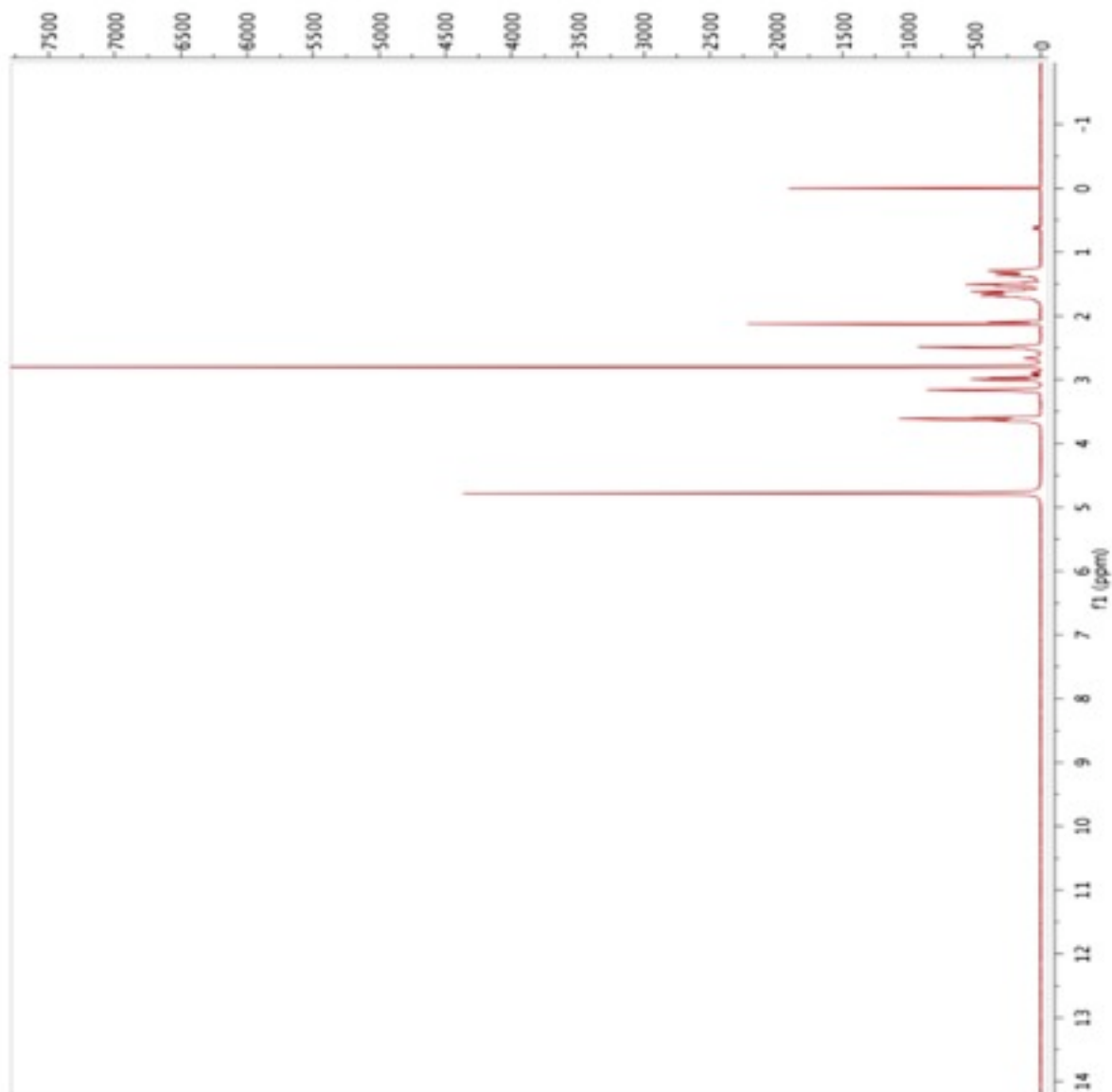
Term A: VVM

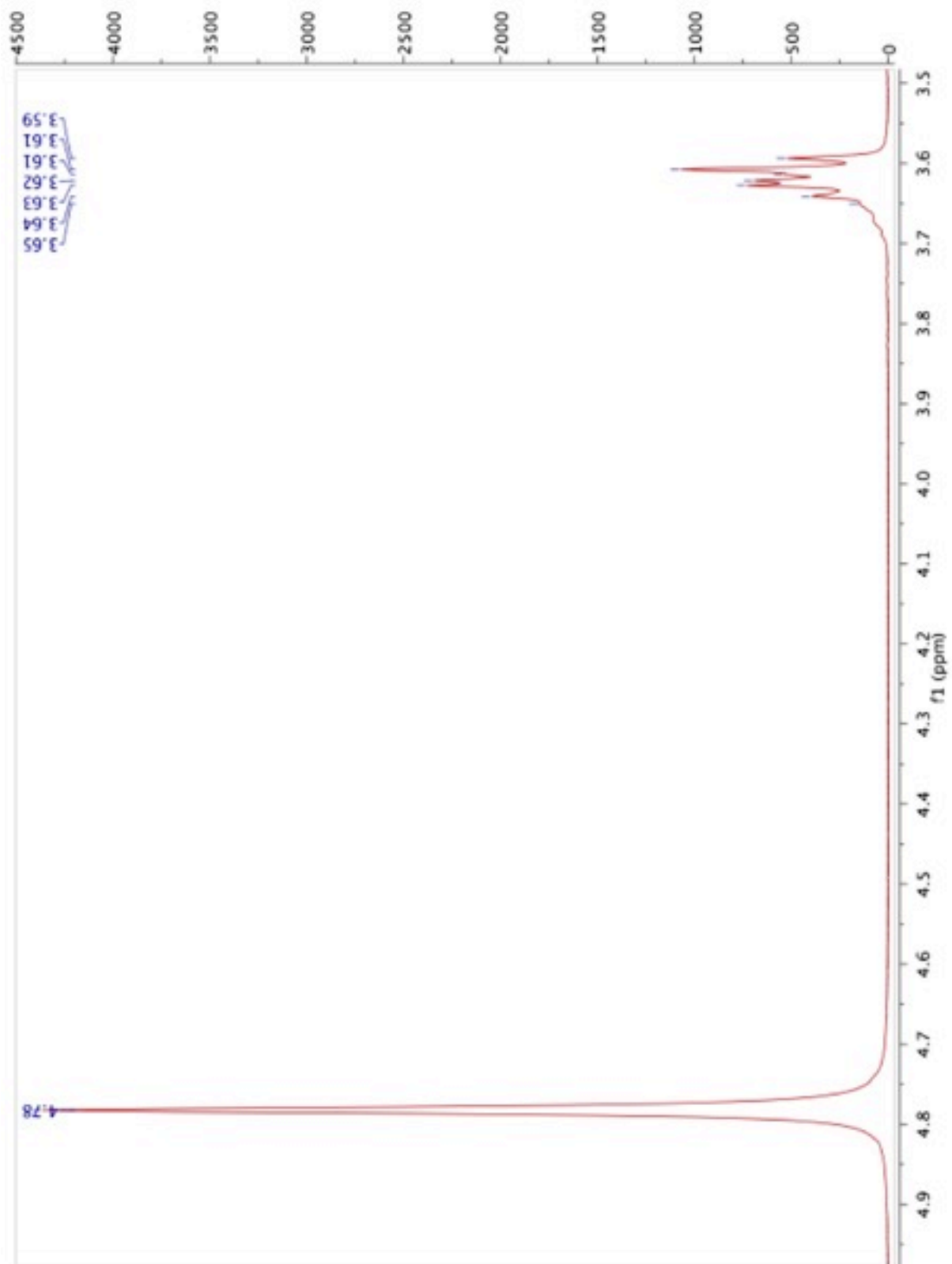
Alpha=0.005 Error Term=S (A) DF=21 MSE=28653.22 Critical Value=5.039803

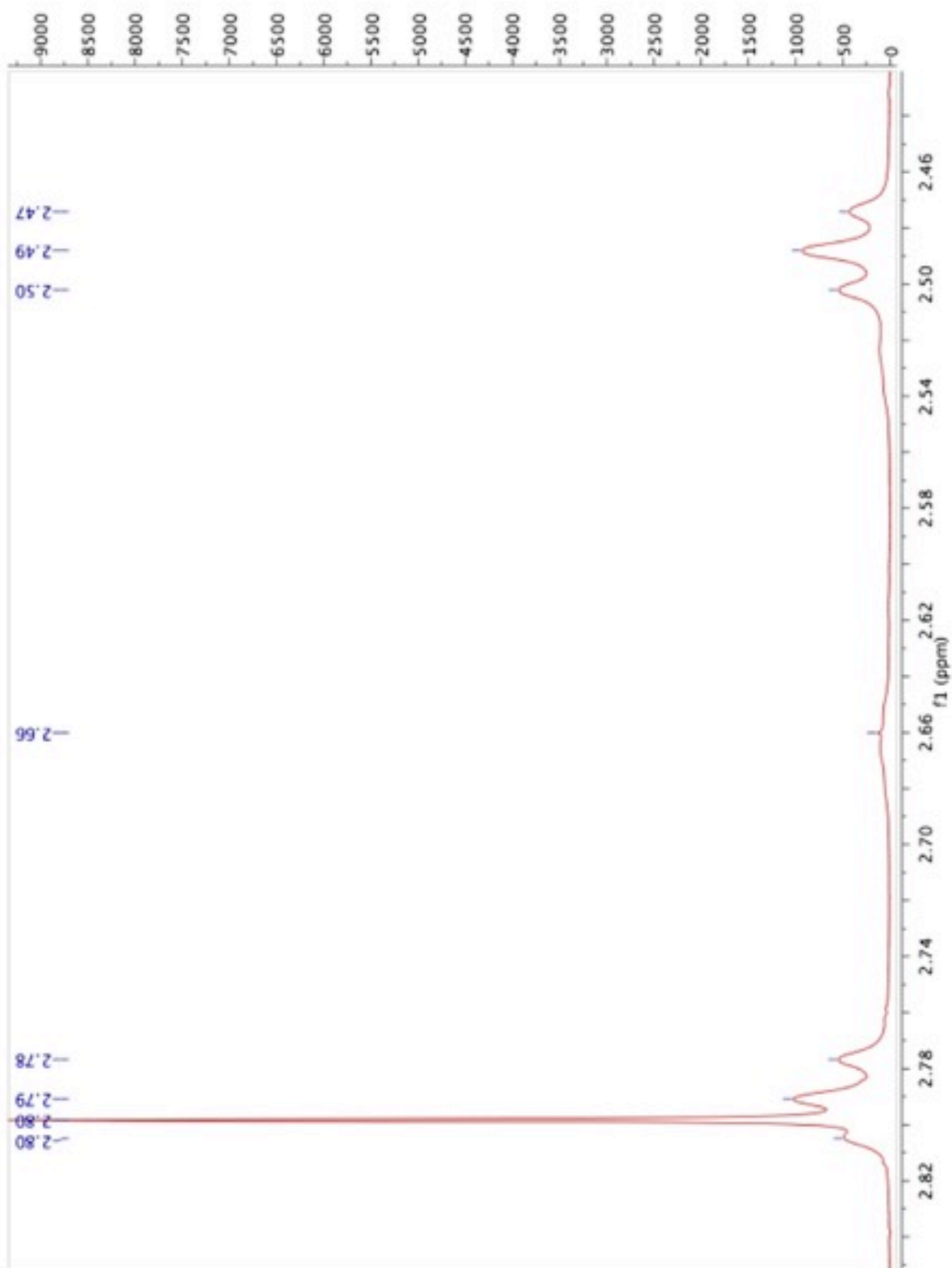
Group	Count	Mean	Different From Groups
0.16	8	87.43625	0.24
0.32	8	97.42625	0.24
<b>0.24</b>	<b>8</b>	<b>154.8692</b>	<b>0.16, 0.32</b>

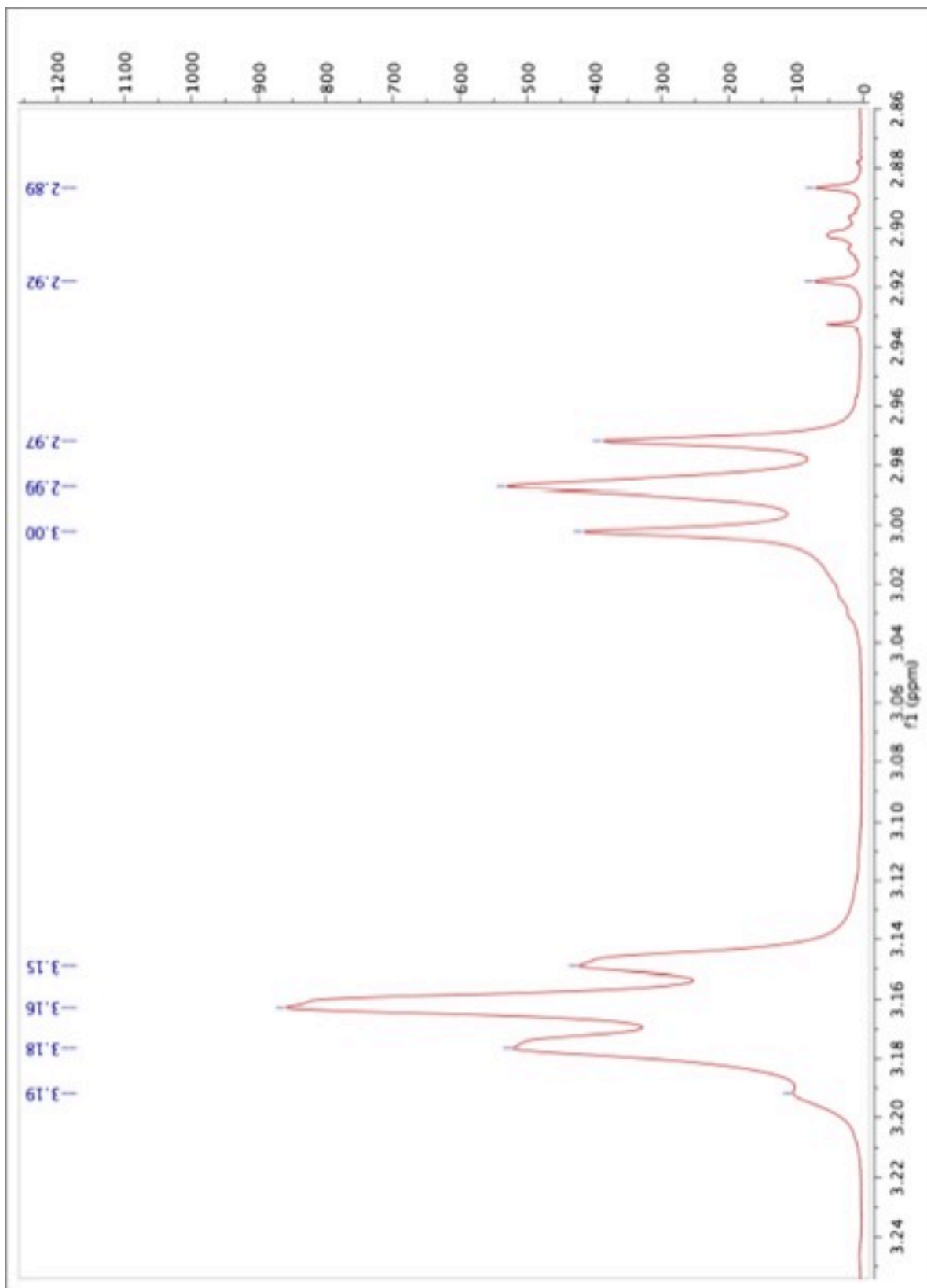
Con una aireación de 0.24 vvm y una concentración de glucosa de 50 g/L se obtiene la mejor producción de sideróforos.

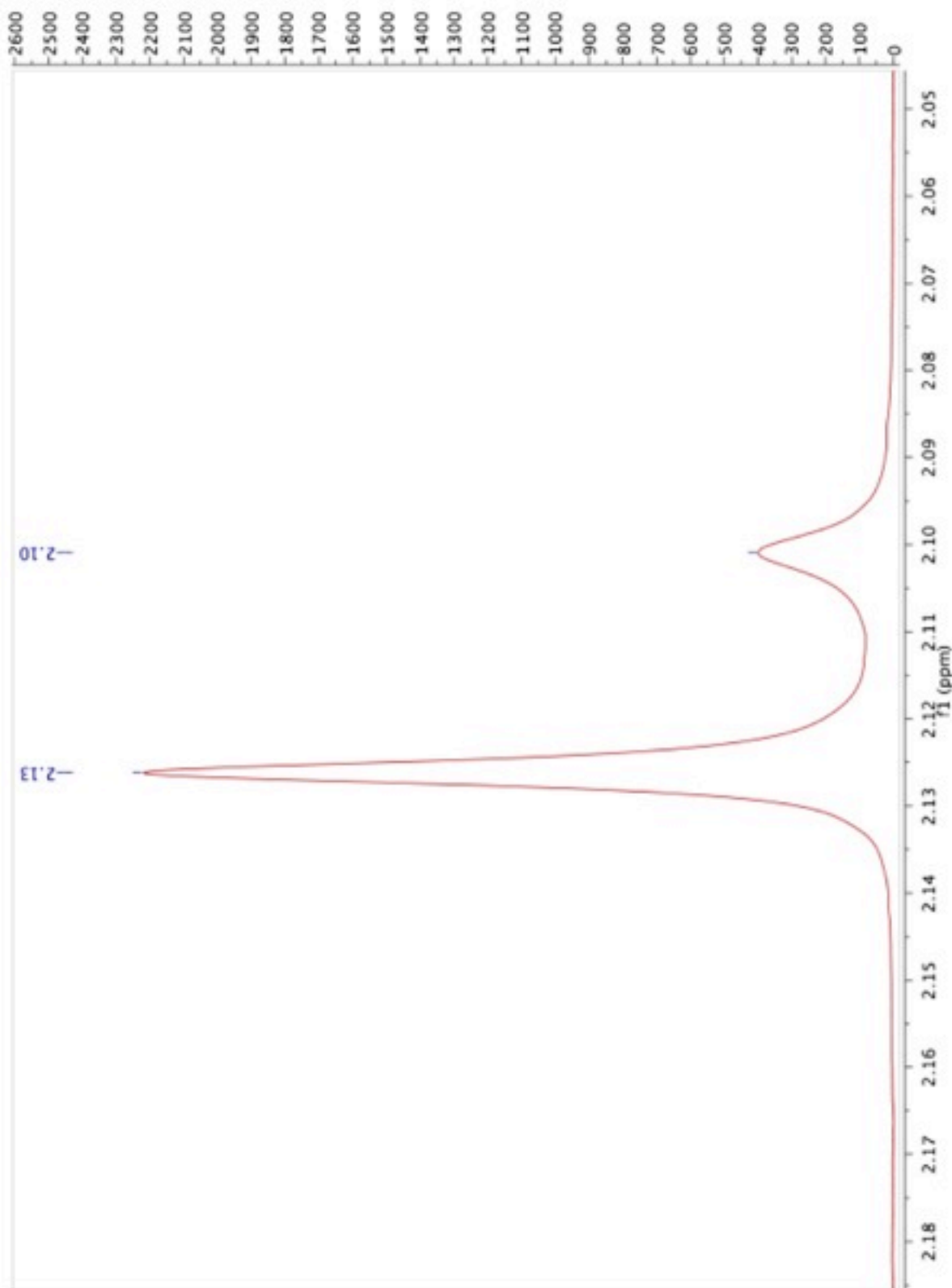


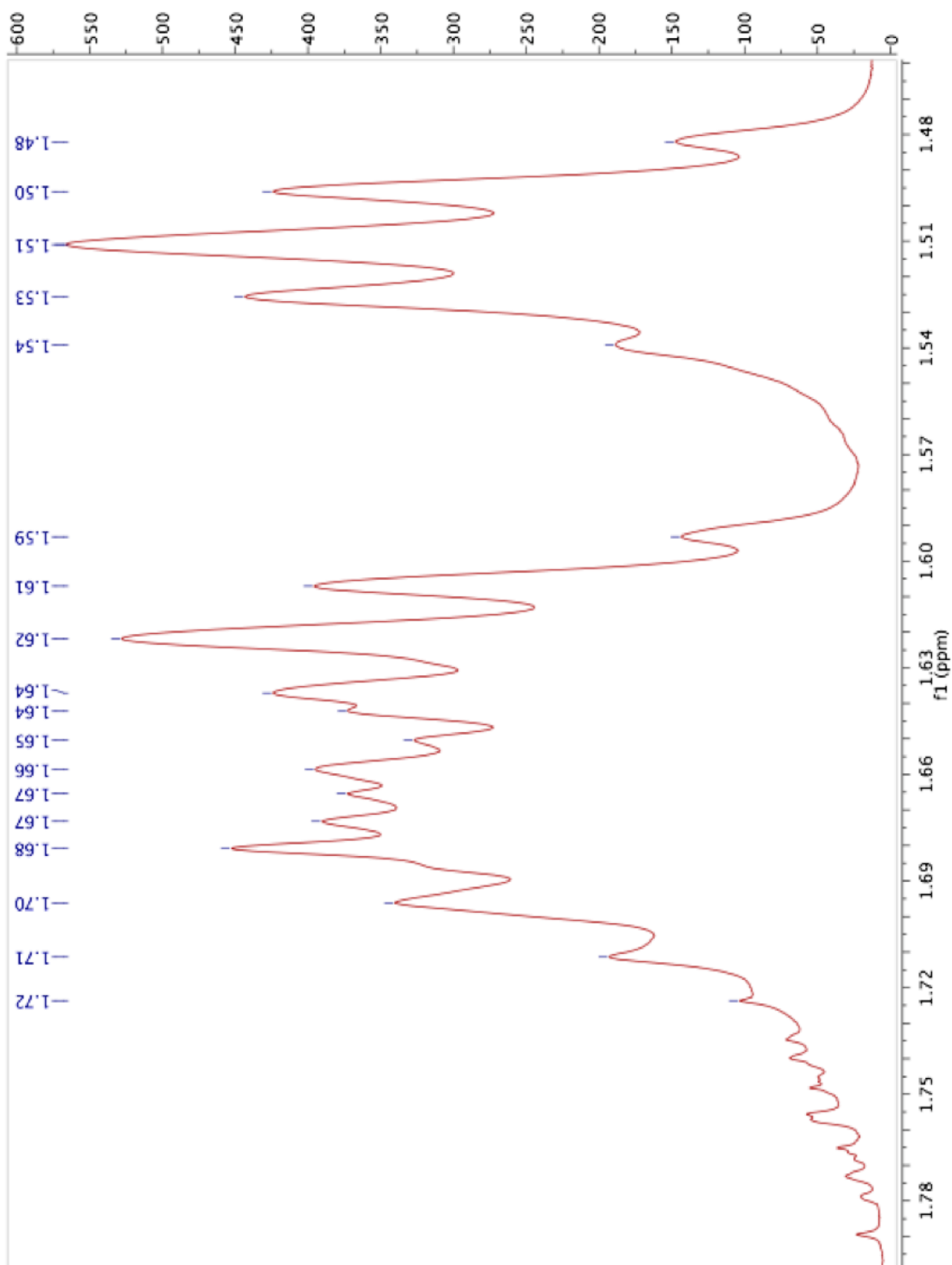
**APÉNDICE A-3** $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN Compuesto 1

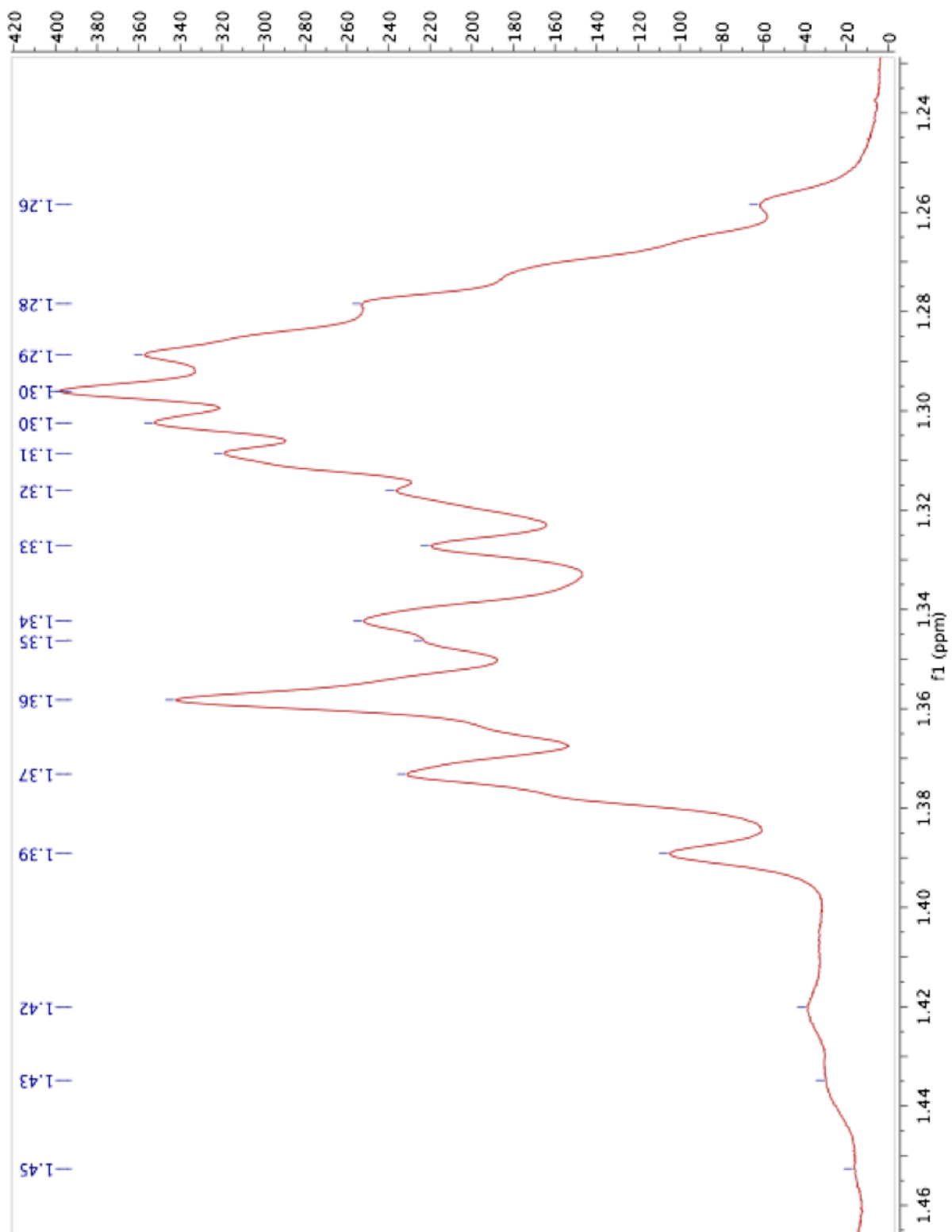


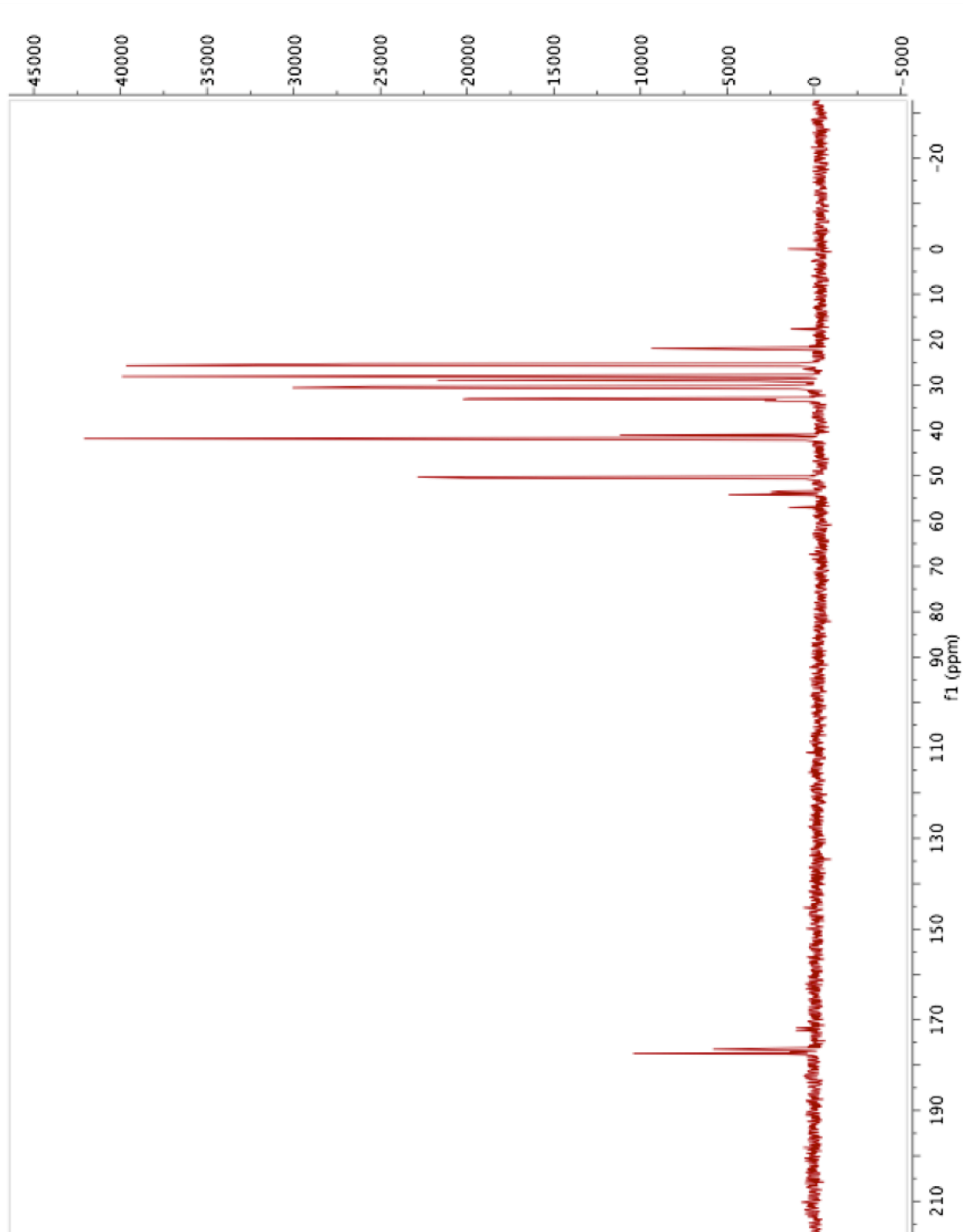




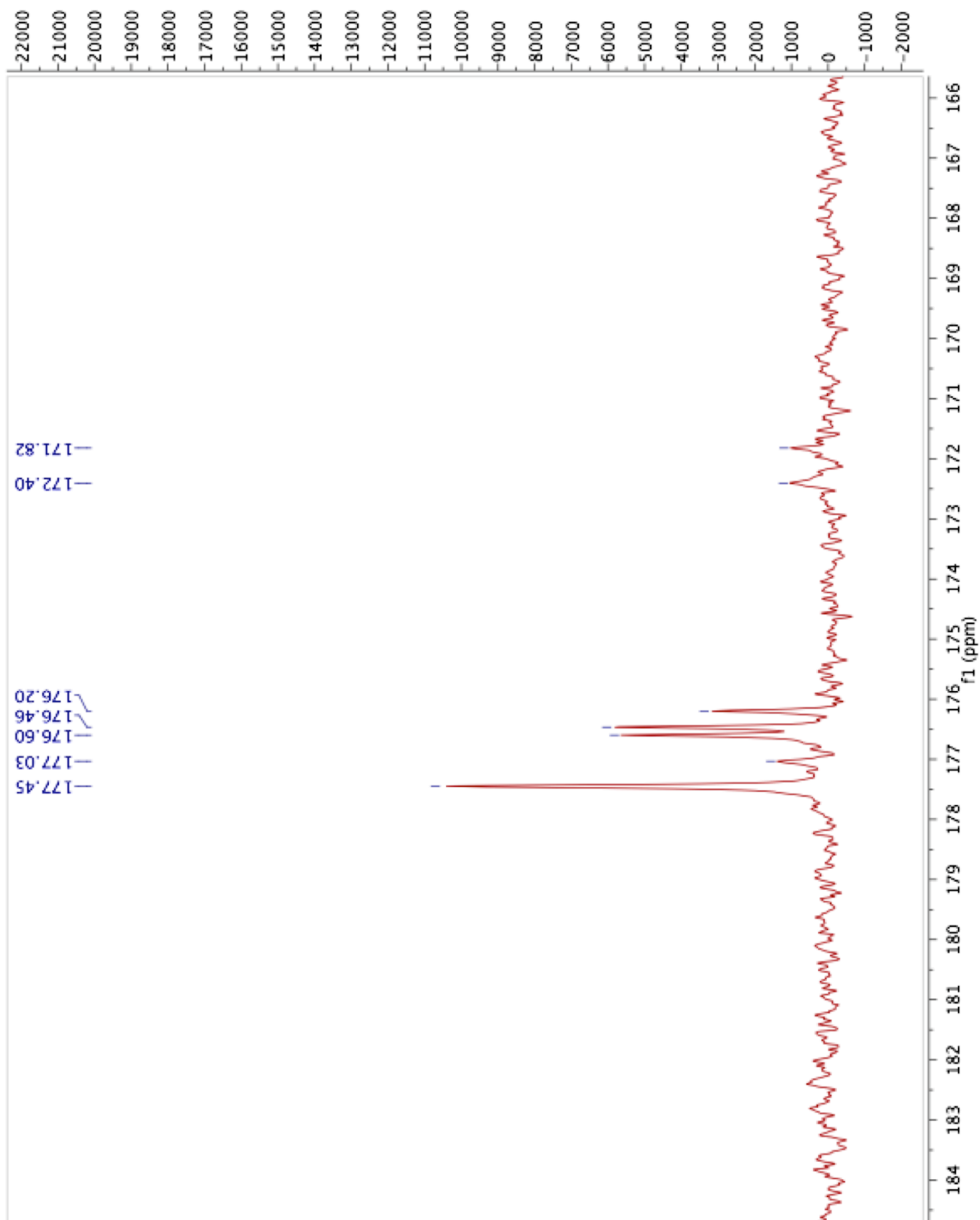


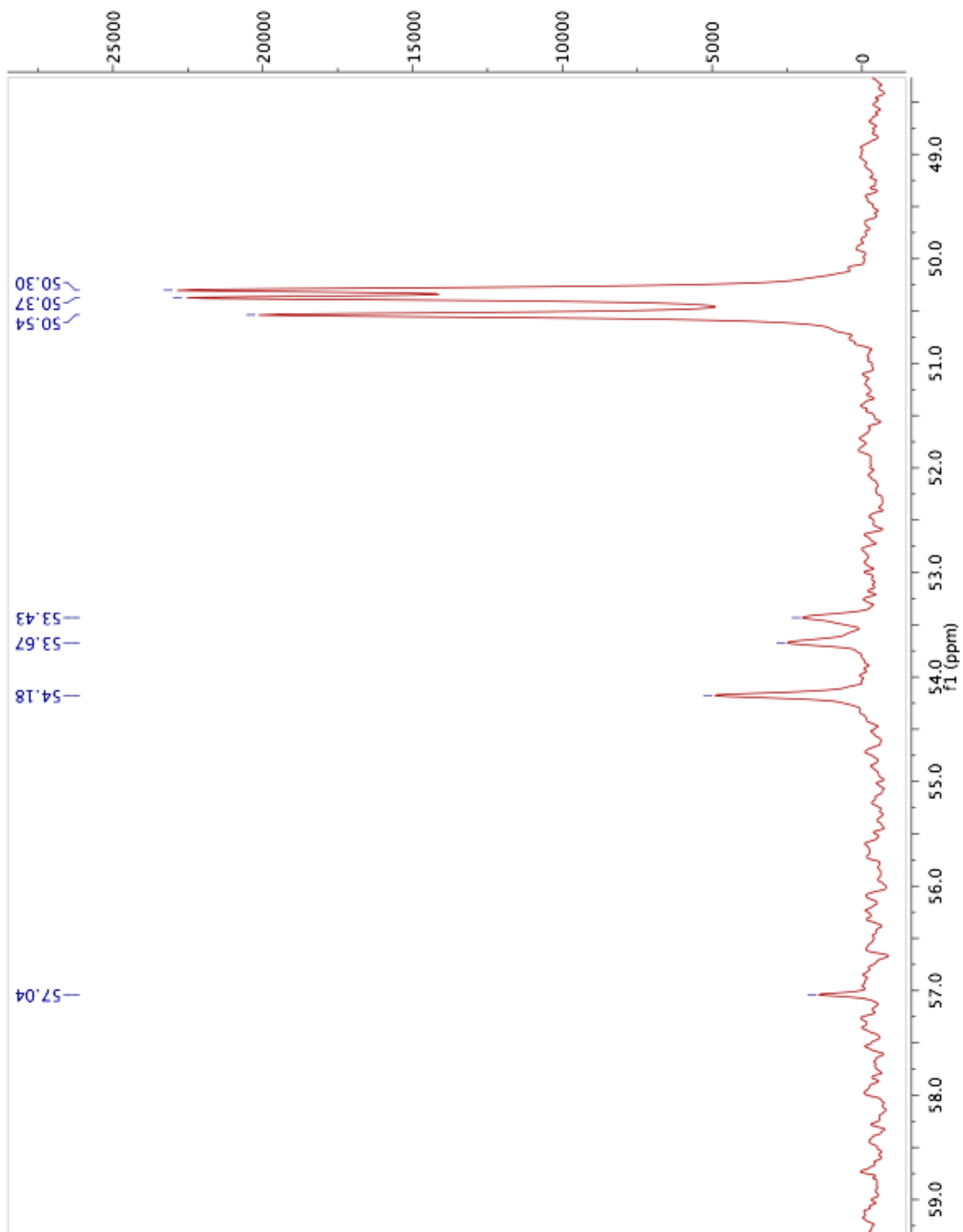


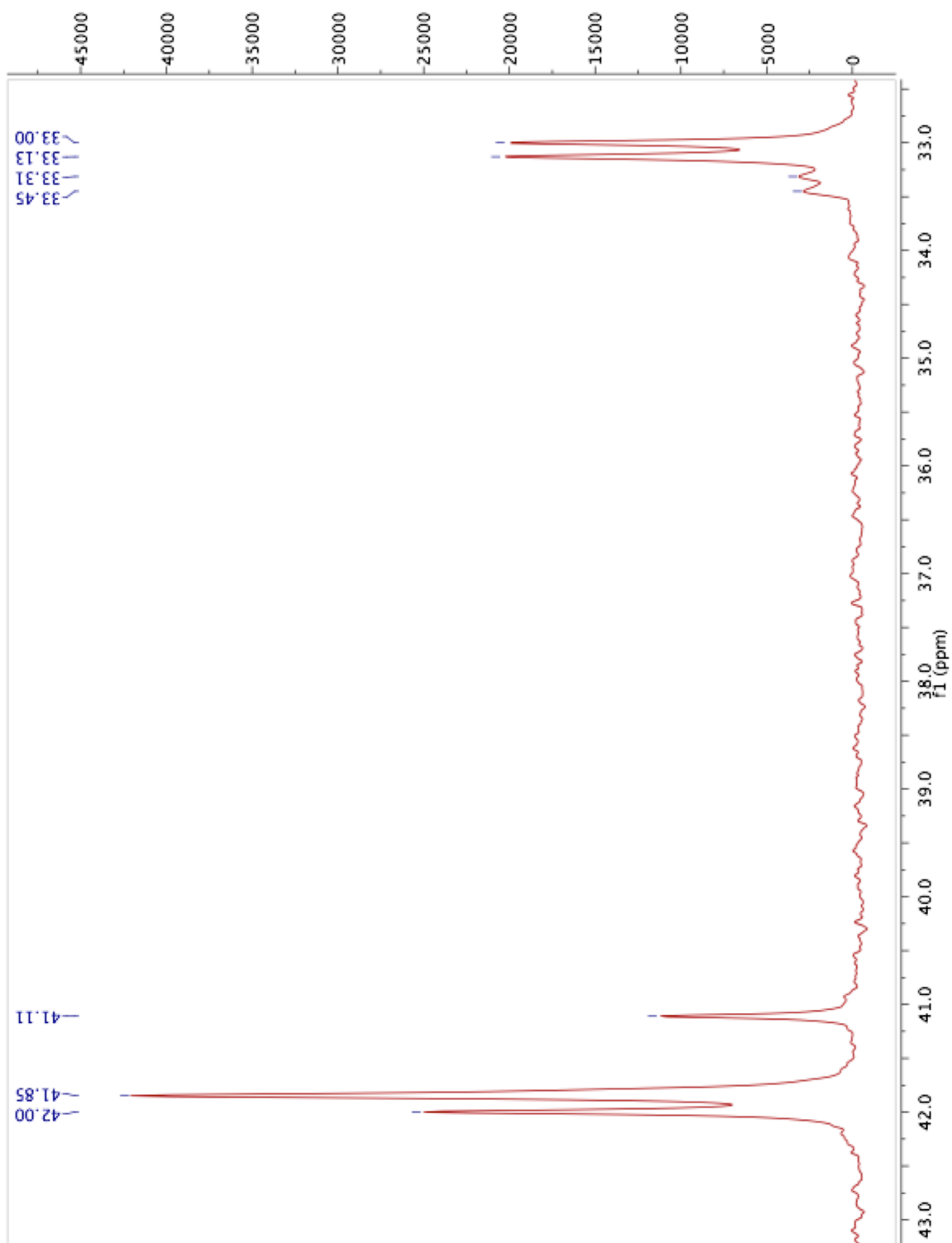


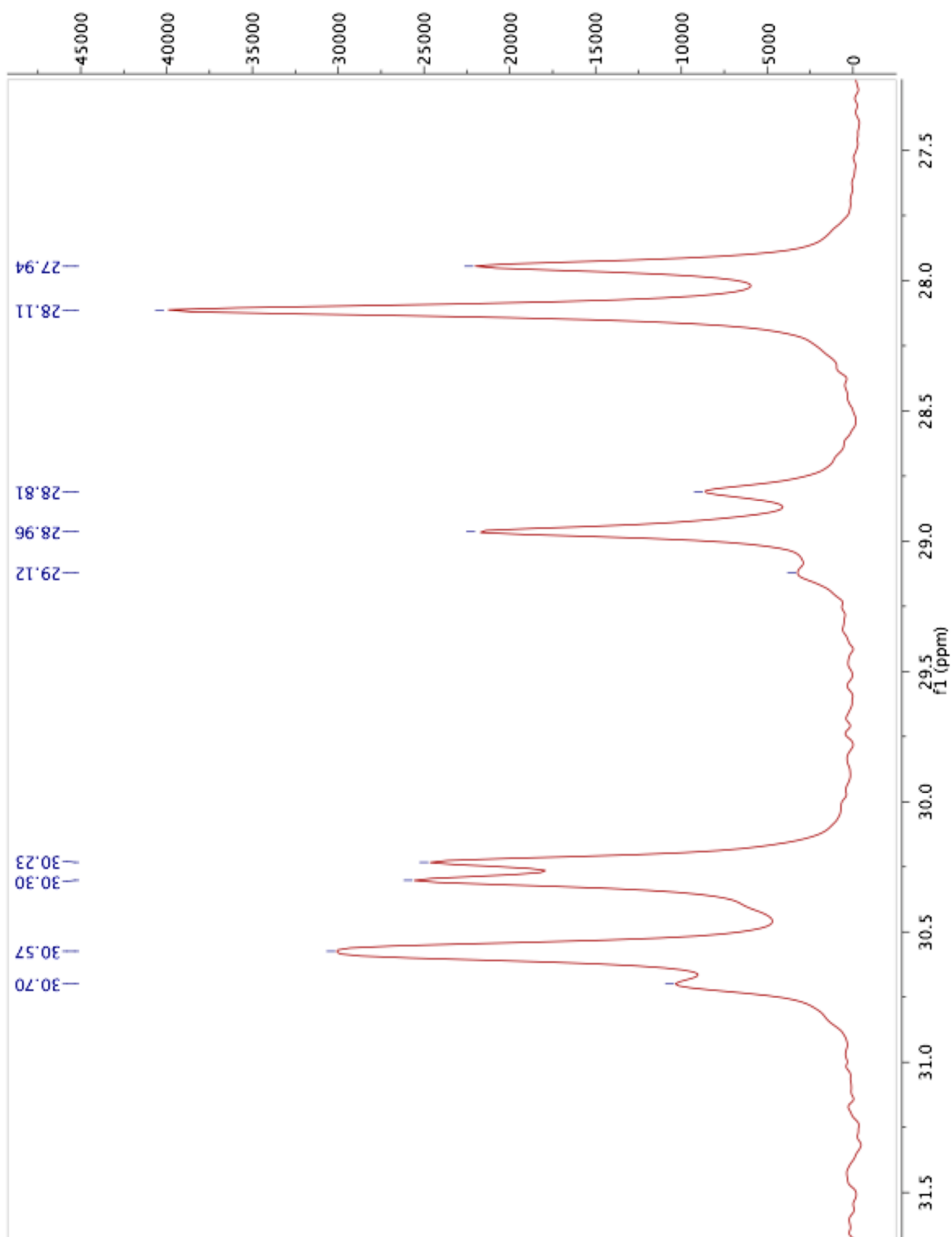
$^{13}\text{C}$  RMN Compuesto 1



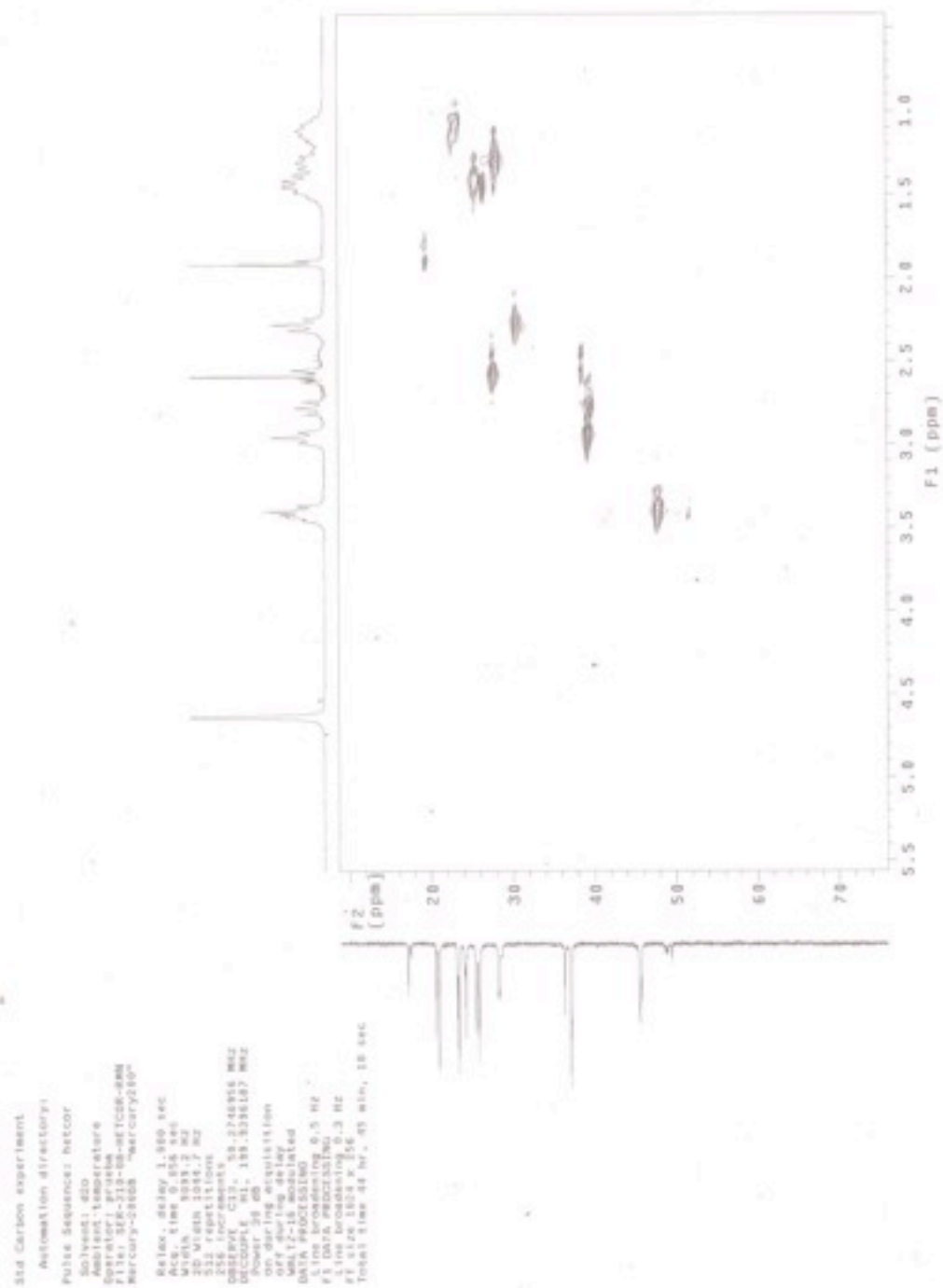








## HETCOR



## APÉNDICE A-4

### Equipo MICROTOX®

Este análisis expone a los organismos luminiscentes (*Vibrio fischeri*) del reactivo de prueba del Microtox® para toxicidad aguda a las muestras de interés, midiendo el incremento o decremento de la emisión de luz de los organismos.

El reactivo contiene bacterias luminiscentes vivas que han sido cultivadas bajo condiciones óptimas, cosechadas y liofilizadas. La bacteria liofilizada es rehidratada con solución de reconstitución para proveer una suspensión de organismos listos para utilizarse. El sistema de prueba mide la emisión de la luz de las bacterias luminiscentes una vez que han sido incubadas con la muestra y la compara con la emisión de la luz de un control (blanco) que no contiene la muestra. La diferencia de la emisión de la luz (entre la muestra y el control) es atribuida al efecto de la muestra sobre los organismos.

#### Protocolo del 90% de compuesto puro.

1. Se preparó una solución stock a 2000 ppm.
2. Se colocaron las celdillas limpias, sin utilizar en los pozos.

pozo de reactivo

bloques de pozos de incubación A1 a A5

B1 a B5 (para duplicado de las muestras).

3. Se coloca en cada celdilla 1 mL de solución de reconstitución.

B1 a B5

4. Agregar 0.5 mL de diluyente a cada celdilla.

A1 a A4

5. Se colocan 2.5 mL de la muestra en la celdilla A5.

6. Adicionar 2.5 mL de OAS a la celdilla A5.

7. Mezclar en vortex la mezcla A5 y descartar 750  $\mu$ L.

8. Comenzar a realizar las diluciones seriales 1:2 de la muestra transfiriendo 1.0 mL de celdilla a celdilla. Mezclar en vortex cada mezcla.

De A5 a A4; A4 a A3; A3 a A2

9. Esperar 5 minutos para el equilibrio de la temperatura.

10. Una vez que se hayan puesto los 10 mL de reactivo en las celdillas, esperar 15 minutos y colocar la celdilla B1 en el pozo de lectura. Presionar el botón de ajuste. La luz verde indicará que el equipo está listo para utilizarse.

11. Comenzar las lecturas, o hacerlas como diga el asistente del equipo.

Preparación del reactivo (microorganismo).

- i. Descartar y remover el sello de la ampula. Mantener el reactivo en refrigeración hasta su utilización.
- ii. Tomar la celdilla que contiene la solución de reconstitución del pozo de reactivo y vaciar la solución en la ampula, agitar y regresar la solución a la celdilla. Mezclar con precaución.
- iii. Transferir 10  $\mu$ L del reactivo reconstituido a cada celdilla.

**Datos de prueba de toxicidad del sideróforo S7**

Tabla 37. Análisis de datos con programa Microtox®.

Muestra	[S7] (ppm)	I <sub>0</sub>	5 minutos			15 minutos		
			I <sub>t</sub>	Gamma	% Efecto	I <sub>t</sub>	Gamma	% Efecto
Control	10	94.83	118.4			134.92		
1	56	94.78	84.65	0.55	28	99.76	0.51	26
2	112	95.95	80.32	0.62	32	97.11	0.59	28
3	225	96.36	70.89	0.75	41	85.88	0.71	37
4	450	97.41	73.42	0.73	39	90.4	0.69	34
5	900	97.89	58.26	1.12	52	73.75	0.98	47
6	1800	98.51	41.03	1.25	66	52.74	1.19	62

I<sub>0</sub> (lectura inicial de la luz);

I<sub>t</sub> (lectura de la luz al tiempo t);

[S7] (concentración de la dilución);

Gamma (valor calculado para cada dilución).



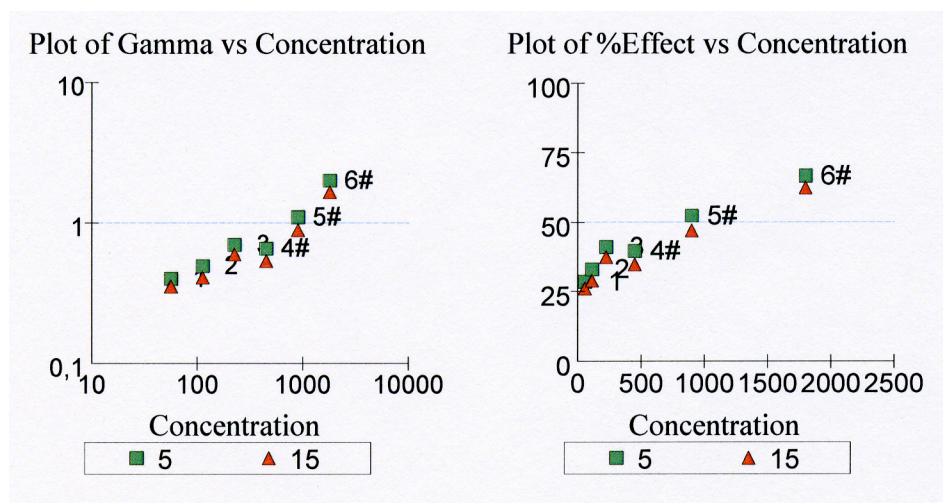


Figura 36. Gráficos Gamma y % efecto Vs concentración.

## APÉNDICE A-5

Tabla 38. Gradiente de elución 1.

Tiempo (min)	% B [19.95% ddH <sub>2</sub> O, 0.05% TFA, 80% MeOH]
10	10
15	30
20	50
33	90

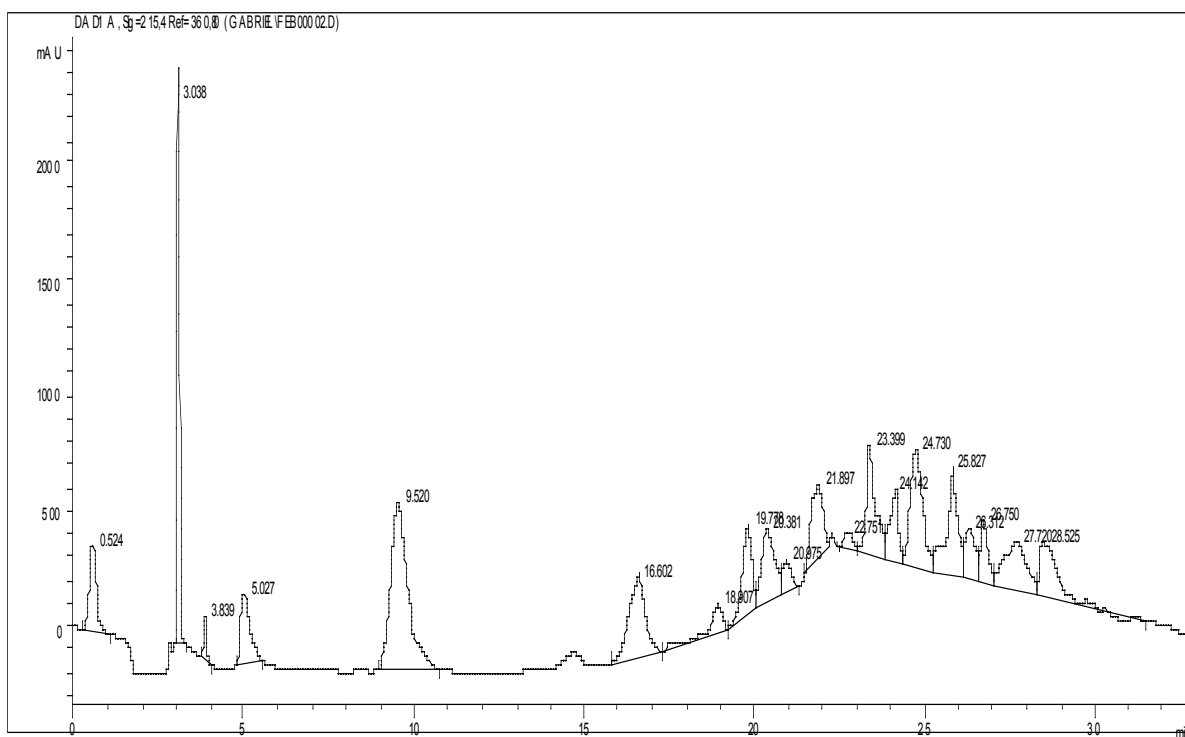


Figura 37. Cromatograma Fracción C, gradiente de elución 1.

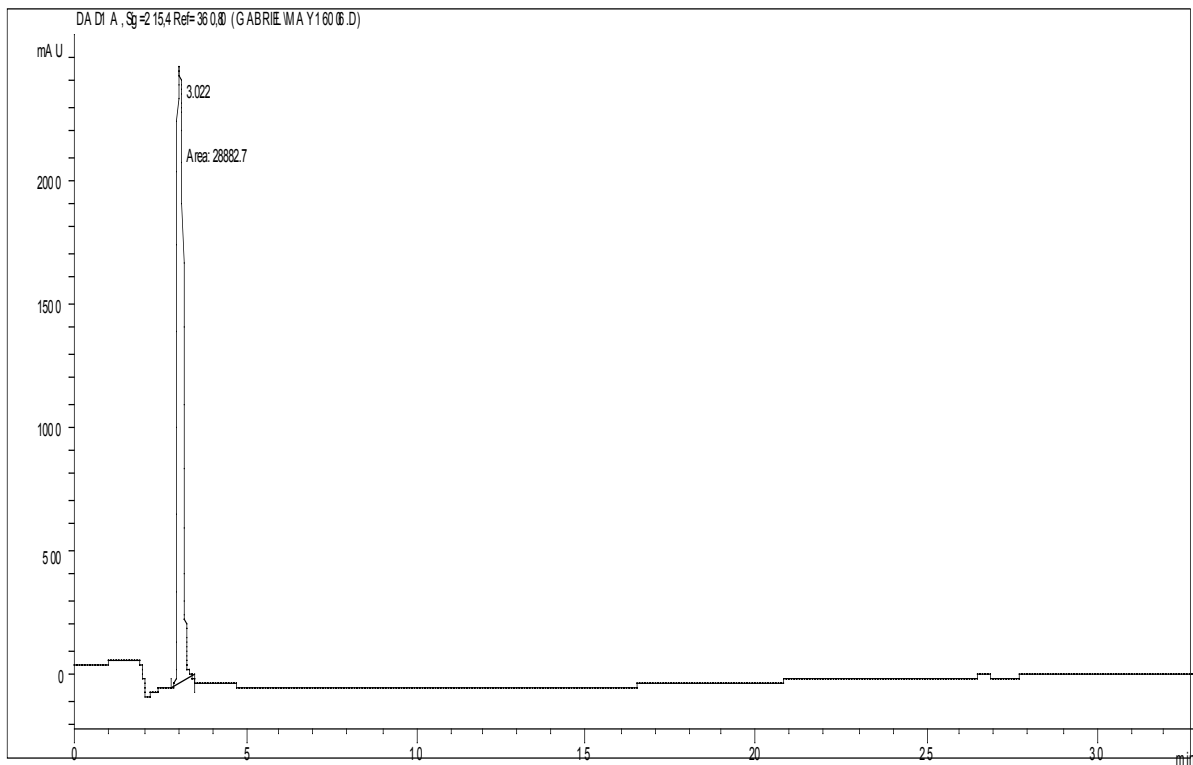


Figura 38. Cromatograma Estándar Ferricromo.

Tabla 39. Gradiente de elución 2.

Tiempo (min)	% B [39.95% dH <sub>2</sub> O, 0.05% TFA y 60% MeOH]
7	10
15	20
20	25
25	35
27	45
39	75
31	95
33	100

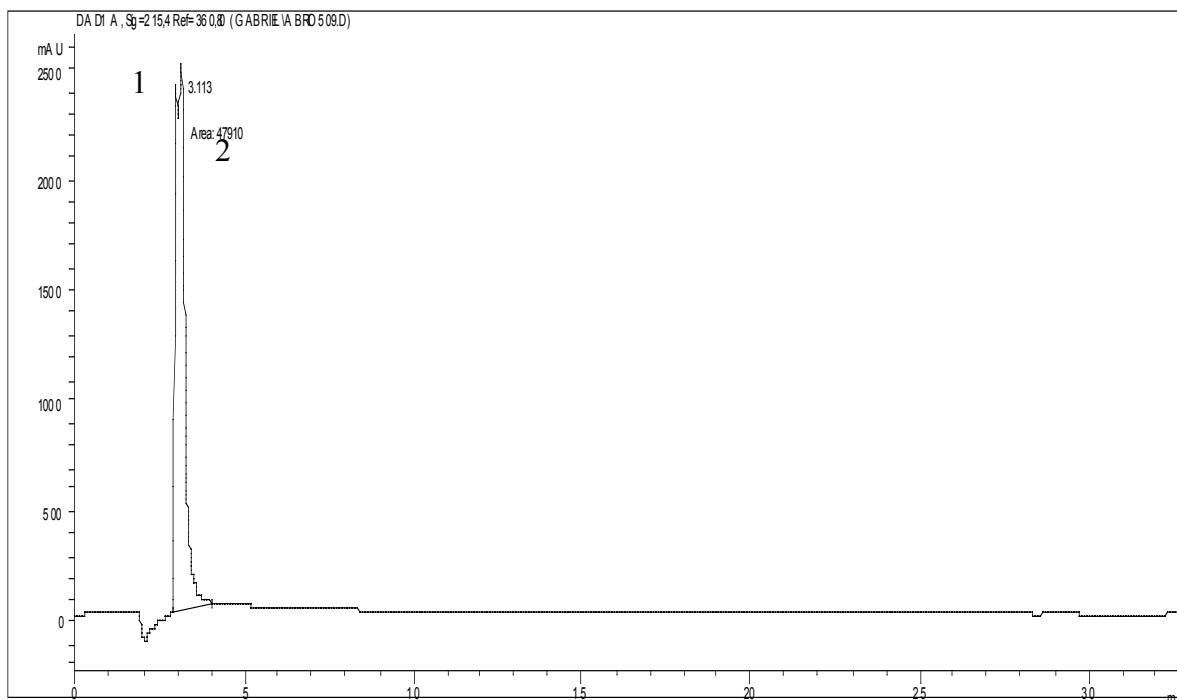


Figura 39. Cromatograma Fracción C, gradiente de elución 2.

Tabla 40. Gradiente de elución 3.

Tiempo (min)	% B [0.05% TFA, 99.95% ACN]
5	3
15	20
23	50
28	100
33	70
35	3

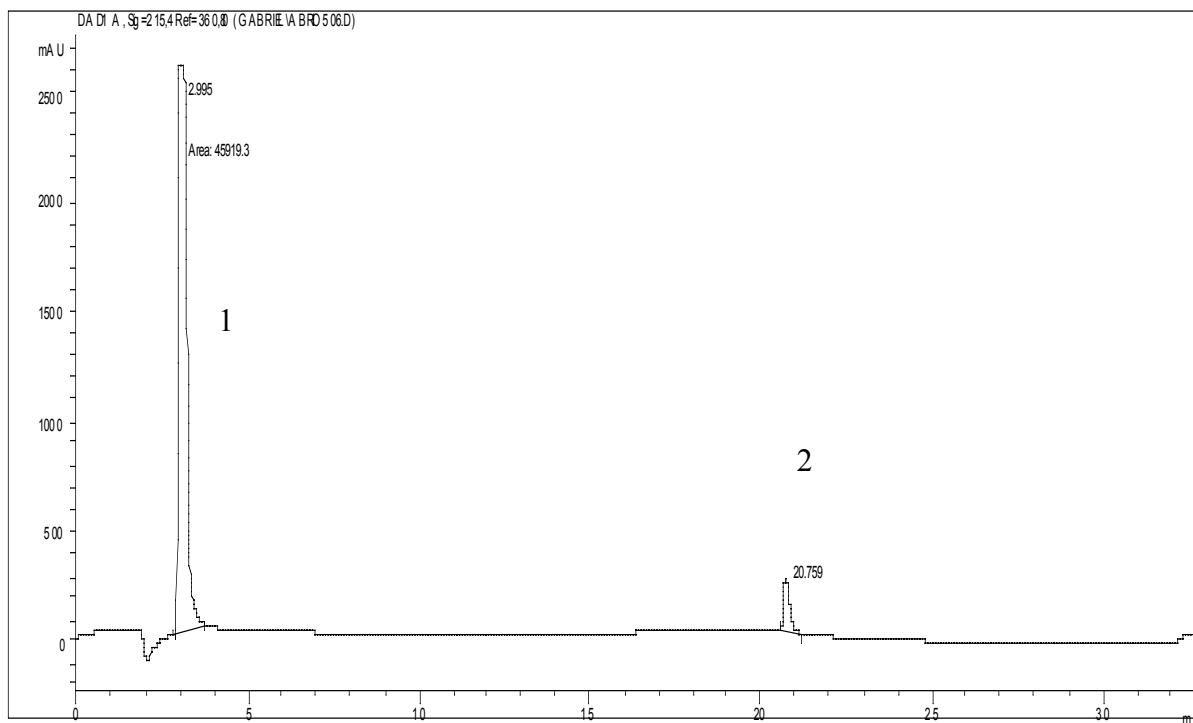


Figura 40. Cromatograma Fracción C, gradiente de elución 3

## APÉNDICE A-6

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Microbiological Methods 70 (2007) 127–131

**Journal  
of Microbiological  
Methods**
[www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection

S. Pérez-Miranda <sup>a</sup>, N. Cabirol <sup>b</sup>, R. George-Téllez <sup>c</sup>, L.S. Zamudio-Rivera <sup>c</sup>, F.J. Fernández <sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. A.P. 55-535, Mexico, D.F., 09340, Mexico<sup>b</sup> Institute of Engineering, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito escolar S/N, Ciudad Universitaria, 04510 Coyoacán, Mexico D.F., Mexico<sup>c</sup> Molecular Engineering Program, Instituto Mexicano del Petróleo, Avenida Eje Central Lázaro Cárdenas No. 152, Col. San Bartolo Atepehuacan, Mexico, D.F., 07730, Mexico

Received 24 January 2007; received in revised form 28 March 2007; accepted 28 March 2007

Available online 14 April 2007

**Abstract**

In this work, the popular CAS assay for siderophore detection, based on the utilization of chrome azurol S, was redesigned and optimized to produce a new, fast, non-toxic, and easy method to determine a wide variety of microorganisms capable of siderophore production on a solid medium. Furthermore, this specific bioassay allows for the identification of more than one single siderophore-producing microorganism at the same time, using an *overlay* technique in which a modified CAS medium is cast upon culture agar plates (thus its name “O-CAS”, for overlaid CAS). Detection was optimized through adjustments to the medium’s composition and a quantifying strategy. Specificity of the bioassay was tested on microorganisms known for siderophore production. As a result, a total of 48 microorganisms were isolated from three different types of samples (fresh water, salt water, and alkaline soil), of which 36 were determined as siderophore producers. The compounds identified through this method belonged to both hydroxamate and catechol-types, previously reported to cause color change of the CAS medium from blue to orange and purple, respectively. Some isolated microorganisms, however, caused a color change that differed from previous descriptions.  
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Chrome azurol S; Overlay; Siderophore; Universal method**1. Introduction**

Microorganisms produce and secrete siderophores to sequester iron. These compounds can be defined typically as small molecules (often <1000 Da, although some siderophores are bigger) that are rapidly assembled through short, well-defined metabolic pathways. These molecules comprise lateral chains and functional groups that confer ligands a strong affinity (usually with  $K_d > 10^{30} \text{ M}^{-1}$ ) to coordinate with the ferric ion (Neilands, 1981, 1995). Some siderophores (e.g., aerobactin) have lower and others (e.g., enterobactin) have higher affinities (Ratledge and Dover, 2000). Siderophores are typically produced by bacteria, fungi, and monocotyledonous plants in response to iron stress (Ratledge and Dover, 2000). Typically, microbial siderophores are classified as catecholates, hydroxamates, and  $\alpha$ -carboxylates, depending on the chemical nature of their coordination sites with iron (Winkelmann, 1991, 2002).

However, some siderophores like yersiniabactin are classified also as phenolates (Haag et al., 1993; Drechsel et al., 1995a), and others, in addition, as “mixed” (e.g., pyoverdins, produced by *Pseudomonas* species and containing both hydroxamate and catecholate functional groups) (Meyer and Hornsperger, 1978; Meyer and Stintzi, 1998).

Hydroxamates are produced by fungi and bacteria, whereas catecholates are produced exclusively by bacteria and comprise catechol and hydroxy groups as ligands.  $\alpha$ -carboxylates are produced by the group of fungal zygomycetes (mucorales) and a few bacteria, such as *Rhizobium meliloti* and *Staphylococcus hyicus*, and coordinate iron through hydroxy and carboxyl groups (Drechsel et al., 1995b; Baakza et al., 2004).

In order to detect this kind of compounds, a variety of assays have been developed based on chemical properties [i.e., ferric perchlorate assays (Atkin et al., 1970), Csáky (Payne, 1994), Arnow (Arnow, 1937)], as well as on biological or functional properties [i.e., CAS universal assay (Schwyn and Neilands, 1987, modified by Ames-Gottfred et al., 1989, Milagres et al., 1999, and Machuca and Milagres, 2003)] and bioassays (Sung

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 58046453; fax: +52 55 58044712.  
E-mail address: [fjfp@xanum.uam.mx](mailto:fjfp@xanum.uam.mx) (F.J. Fernández).

et al., 2001). Unlike chemical assays to detect siderophores, most of their functional counterparts are based on the CAS universal assay, in which growth medium includes not only the required nutrients but inhibitory compounds as well, thus making it unsuitable to cultivate some microorganisms such as fungi and Gram-positive bacteria. Variations to the CAS assay have been developed together with the CAS agar plate technique; however, these methods are laborious and inefficient as they can only detect one single microorganism type at the same time.

The objective of the present study was to develop an assay capable of surpassing previous methodological limitations, allowing for the detection of a variety of siderophore-producing microorganisms at once, while avoiding problems of toxicity and growth inhibition. The validity of the assay was tested using collection siderophore-producing microorganisms and the method was applied to detect wild producers from field samples of fresh water, salt water, and alkaline soil.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and growth conditions

The fresh water sample was obtained at La Cruz Xalancocona site, in Mexico City, whereas salt water came from Tecolutla, Veracruz State, Mexico. The soil sample was taken at the former Lake Texcoco, outside Mexico City. All samples were stored in plastic containers at 4 °C prior to their use.

A variety of solid growth media was used to isolate microorganisms from each sample: Grimm–Allen medium (Grimm and Allen, 1954) for the ascomycetes group of fungi, modified M9 medium for fungi belonging to the zygomycetes, and nutrient agar for bacteria. The pH was adjusted for all growth media according to original values from field samples. For salt water isolates, previously filtered (0.45- $\mu$ m pore size, 47-mm diameter, cellulose acetate, Whatman) seawater was used, in substitution of distilled water. Plates were maintained at 28 °C for 24 h. Microorganisms were preserved in a 20% (for bacteria) or 40% (for fungi) glycerol solution at –20 °C and characterized by preliminary inspection through microscopic observation and Gram-stain technique.

For siderophore production, isolates [fresh water (FW), salt water (SW), and alkaline soil (AS)] were cultivated in the media previously described, under iron deprivation, at 28 °C for 72 h. Sampling sites and types of samples (FW, SW, and AS) were chosen because ferric ions are found in low levels in these environments, thus making it simple to isolate microorganisms capable of producing compounds to sequester this metal. To achieve iron deprivation all media and glass materials were treated according to Cox (1994).

Collection microorganisms used as positive controls were *Aspergillus niger* ATCC 66876, *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959, and *Bacillus cereus* ATCC 13061 strain, all are known for their siderophore production (Milagres et al., 1999; Baakza et al., 2004). These microorganisms belong to groups (fungi and Gram positive bacteria) presenting a problem of growth inhibition in the traditional CAS method (Schwyn and Neilands, 1987). Plates lacking microorganisms were used as negative controls at this point.

### 2.2. O-CAS assay

CAS medium was prepared according to Schwyn and Neilands (1987), although only as a means to reveal changes, without the presence of nutrients. The medium for a liter of overlay was as follows: Chrome azurol S (CAS) 60.5 mg, hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HDTMA) 72.9 mg, Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) 30.24 g, and 1 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O in 10 mM HCl 10 mL. Agarose (0.9%, w/v) was used as gelling agent.

Siderophore detection was achieved after 10 mL (standard, 80 mm diameter Petri dishes) or 30 mL (long-size, 150 mm diameter Petri dishes) overlays of this medium were applied over those agar plates containing cultivated microorganisms to be tested for siderophore production. After a maximum period of 15 min, a change in color will be observed in the overlaid medium, exclusively surrounding producer microorganisms, from blue to purple (as described in the traditional CAS assay for siderophores of the catechol type) or from blue to orange (as reported for microorganisms that produce hydroxamates). Assay specificity was evaluated by repeating the above mentioned protocol with non-deferrated media (thus, lacking induction of siderophore production). All these experiments were made at least three times with three replicates for each one.

### 2.3. Chemical determination of produced siderophores

Chemical assays were performed to test the results obtained with the O-CAS method, as follows: for hydroxamate detection, the FeCl<sub>3</sub> assay (Neilands, 1981) was used; to detect catechols, the Arnow assay (Arnow, 1937); and the Shenker assay to detect carboxylates (Shenker et al., 1992). Quantification was made using a Lambda 35 Spectrometer (Perkin Elmer Instruments). All the assays were made at least three times with two replicates for each one.

### 2.4. Recovery of siderophore-producing microorganisms

Four kinds of microorganisms (non filamentous Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, actinomycetes, and yeasts) were isolated and showed a positive response to the test, producing a variety of siderophores; these were recovered from the original culture medium by puncturing through the CAS overlay (O-CAS), using a sterile toothpick. Microorganisms were incubated for 24 h in the appropriate liquid medium and under optimal conditions, according to their origin. Growth was determined by turbidity and inoculation in Petri plates. Siderophore production confirmation was achieved after repeating the O-CAS assay with those recovered microorganisms.

## 3. Results

### 3.1. O-CAS detection method

To confirm that the overlay technique was functional, three siderophore-producing microorganisms were used: *A. niger* (catechol producer), which produced a color change from blue

to purple in the growth medium within 1 h (Fig. 1A), *B. cereus* (hydroxamate producer), with a change of color in the culture medium from greenish-blue to orange (Fig. 1B), and *R. oligosporus* (carboxylate producer) that changed the medium to a light yellow color (Fig. 1C) in 1 h. No changes in medium coloration were observed when the overlay was added to plates without microorganisms. No changes could be detected when non-deferrated media were used for microbial growth.

### 3.2. Isolation of microorganisms and siderophore production

Isolation of siderophore-producing microorganisms was made from field samples. The selection of microorganisms was based on the O-CAS assay, and the type of siderophore produced was assessed through chemical methods. The results obtained for some of the samples are shown in Fig. 2, and the overall results are presented in Tables 1, 2, and 3. Several microorganisms produced changes in medium coloration that

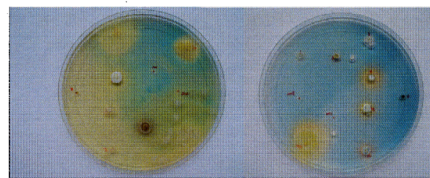


Fig. 2. O-CAS assay performed on two different samples. Different changes in the color of the medium can be appreciated.

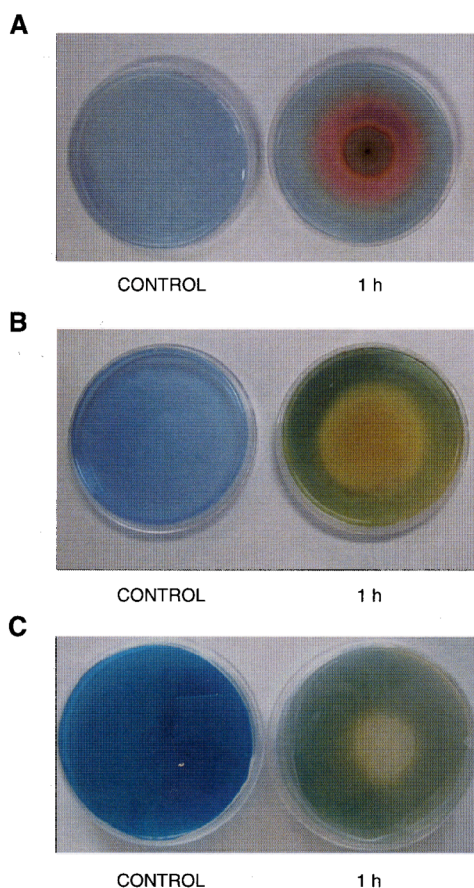


Fig. 1. O-CAS assay performed with collection strains. "Control" shows lack of reaction, and positive reaction is evaluated after 1 h. All the experiments were made at least three times with three replicates for each one. A: *Aspergillus niger*, catechol producer; B: *Bacillus cereus*, hydroxamate producer; C: *Rhizopus oligosporus*, carboxylate producer.

are in agreement with previously reported studies. Hence, strain AS1 changed the color to purple (which corresponds to catechol-type siderophores, as mentioned above), whereas strains FW1, FW5, AS4, AS5, AS7, SW3, SW4, and SW10 rendered orange hues, which is consistent with chemical testing for hydroxamate-type siderophores. Other strains, such as FW8, SW9, SW13, and SW14, however, offered a reddish-orange coloration and, based on chemical testing, these organisms produced more than one type of siderophore (both hydroxamate and catechol). It is also possible that these organisms produced siderophores containing both catecholate and hydroxamate groups.

According to these tests, strains FW3, FW6, FW7, FW10, FW12, FW13, AS2, AS3, and SW6 also produced a variety of siderophore types (in this case hydroxamate and carboxylate), changing the color of the medium to a pale orange. Finally, some strains produced a yellow coloration, which has never been described before for CAS assays. In these cases, chemical tests showed that the corresponding siderophores belong to the carboxylate type. An interesting question derives from results for strains FW4, AS6, AS8, SW5, and SW7: these strains changed the medium to a yellow color (SW5 to orange), but surprisingly failed in all the chemical tests performed for siderophore detection. These cases will be discussed below.

Table 4 summarizes the results for isolated producer colonies from different samples (including both bacteria and fungi) and

Table 1  
Comparison of the O-CAS method and chemical assays for fresh water samples

Colony	O-CAS <sup>a</sup>	FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup>		Arnow <sup>b</sup>	Shenker <sup>b</sup>
		420–450 nm	495 nm		
FW1	Orange	+	–	–	–
FW2	Yellow	–	–	–	–
FW3	Light orange	+	–	–	+
FW4	Yellow	–	–	–	–
FW5	Orange	+	–	–	–
FW6	Light orange	+	–	–	+
FW7	Light orange	+	–	–	+
FW8	Dark orange	+	+	+	+
FW9	Yellow	–	–	–	+
FW10	Light orange	+	–	–	+
FW11	Yellow	–	–	–	+
FW12	Light orange	+	–	–	+
FW13	Light orange	+	–	–	+
FW14	Dark yellow	+	–	–	+

All the assays were made at least three times with two replicates for each one.

<sup>a</sup> For the O-CAS assay, medium color change was considered.

<sup>b</sup> For chemical assays, "+" stands for siderophore production and "–" siderophore non-production.



Table 2  
Comparison of the O-CAS method and chemical assays for alkaline soil samples

Colony	O-CAS <sup>a</sup>	FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup>		Arnou <sup>b</sup>	Shenker <sup>b</sup>
		420–450 nm	495 nm		
AS1	Purple	–	+	+	+
AS2	Light orange	+	–	–	+
AS3	Light orange	+	–	–	+
AS4	Orange	+	–	–	–
AS5	Orange	+	–	–	–
AS6	Yellow	–	–	–	–
AS7	Orange	+	–	–	–
AS8	Yellow	–	–	–	–

All the assays were made at least three times with two replicates for each one.

<sup>a</sup> For the O-CAS assay, medium color change was considered.

<sup>b</sup> For chemical assays, “+” stands for siderophore production and “–” siderophore non-production.

the type of siderophore they produced. Further characterization of the molecules produced by these strains is currently underway at our laboratories, as well as the molecular identification of producer microorganisms.

After the assay, all microorganisms randomly recovered from the plates were viable and able to reproduce the initial coloration change.

#### 4. Discussion

The traditional methodology available for the detection of siderophore-producing microorganisms proposed by Schwyn and Neilands (1987) presents a problem of growth inhibition for Gram positive bacteria and fungi, due to the presence of hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HDTMA) in the cultivation medium, which, at high concentrations, is toxic to these microorganisms. Ames-Gottfred et al. (1989) modified the traditional method to permit identification of various producer strains at the same time. This technique, however, still presents inhibition or poor growth of microorganisms, in addition to

Table 3  
Comparison of the O-CAS method and chemical assays for salt water samples

Colony	O-CAS <sup>a</sup>	FeCl <sub>3</sub> <sup>b</sup>		Arnou <sup>b</sup>	Shenker <sup>b</sup>
		420–450 nm	495 nm		
SW1	Yellow	–	–	–	+
SW2	Yellow	–	–	–	+
SW3	Orange	+	–	–	–
SW4	Orange	+	–	–	–
SW5	Orange	–	–	–	–
SW6	Light orange	+	–	–	+
SW7	Yellow	–	–	–	–
SW8	Yellow	–	–	–	+
SW9	Dark orange	+	+	+	–
SW10	Orange	+	–	–	–
SW11	Orange	+	–	–	+
SW12	Orange	+	–	–	+
SW13	Dark orange	+	+	+	+
SW14	Dark orange	+	+	+	+

All the assays were made at least three times with two replicates for each one.

<sup>a</sup> For the O-CAS assay, medium color change was considered.

<sup>b</sup> For chemical assays, “+” stands for siderophore production and “–” siderophore non-production.

Table 4  
Isolated microorganisms and type of siderophores obtained<sup>a</sup>

Microorganisms	Sample	Siderophores						
		A	B	C	D	E	F	G
Gram + bacteria	Fresh water	3	2	1	–	–	1	1
Gram – bacteria	Salt water, soil	4	2	–	5	1	–	–
Actinomycetes	Fresh water, alkaline soil	–	–	–	1	–	–	1
Fungi	Salt water	–	–	–	–	–	–	1
Yeast	Fresh water, salt water	1	1	–	5	–	–	–

<sup>a</sup> A: hydroxamate type siderophores, B: carboxylate type siderophores, C: catechol type siderophores, D: hydroxamate and carboxylate mix, E: hydroxamate and catechol mix, F: catechol and carboxylate mix, G: hydroxamate, catechol and carboxylate mix.

difficulties in the preparation of the medium. A later modification of the assay (Milagres et al., 1999), based on the use of Petri dishes in which the surface was split using half for the cultivation medium and half for the CAS detection medium, successfully avoided growth inhibition problems, while allowing development of all kinds of microorganisms. This method, however, is extremely laborious and results are slow to achieve; furthermore, it only permits identification of one single type of microorganism per plate.

In the method hereby described, the CAS agar medium was used devoid of nutrients, only as an indicator of the presence of siderophores, and with 0.9% (w/v) agarose as gelling agent. The gel was spread as an overlay on the microorganisms (thus the name O-CAS for “overlaid CAS”). Growth of the microorganisms is performed with the most appropriate culture medium for each microbe (not necessarily over CAS medium, as the traditional method does). Moreover, the overlay is spread after the microorganisms have grown. Growth inhibition problems were surpassed in this way.

The lower concentration of gelling agent in the medium facilitates the diffusion of siderophores and shortens the time required for observation of results. The use of agarose (being a more refined product), as an agar substitute, also helps to control the process in a more efficient way. We have also successfully tried this method with 0.9% agar in the overlay (data not included); this would allow diminishing costs in the application of the method.

The specific chemical assays that were performed on selected samples showed a correspondence between coloration change in the medium and the functional group of each siderophore, thus verifying the validity of the method. Results from strains FW4, AS6, AS8, SW5, and SW7 could indicate a higher sensitivity to lower concentrations of siderophores, as used in this method, compared with the classical chemical tests or, alternatively, that we are in the presence of a new kind(s) of siderophore(s) not reported yet. Further characterization of the compounds produced by these strains will solve this question and discard the possibility of false positives occurrence using this method.

The O-CAS assay is a simple and universal method for the identification of more than one siderophore-producing strain at once, with results available in less than half an hour, and

suitable for any kind of microorganism and growth medium. It is specific for siderophore-producing microorganisms, as demonstrated by the absence of change in medium color for many strains during the selection process (some of them included in Fig. 2), microorganisms for which no siderophores were detected through the chemical methods used in this study. The method showed neither inhibition of growth, caused by reagents or the pH. Microorganisms can be easily recovered from their original medium after coloration has been produced, avoiding the need for replicas. Hence, this method could become a powerful first step for the isolation and selection of siderophore-producing microorganisms.

#### Acknowledgments

We thank Dr. Luc Dendooven (CINVESTAV, Mexico, DF) for supplying the alkaline soil samples from the former Texcoco lake. We also thank Ingrid Mascher for the English improvement.

#### References

- Ames-Gottfred, N.P., Christie, B.R., Jordan, D.C., 1989. Use of the chrome azurol S agar plate technique to differentiate strains and field isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 707–710.
- Arnou, L.E., 1937. Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine–tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* 118, 531–537.
- Atkin, C.L., Neilands, J.B., Phaff, J., 1970. Rhodotorulic acid, from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces* and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *J. Bacteriol.* 103, 722–733.
- Cox, D.C., 1994. Deferration of laboratory media and assays for ferric and ferrous ions. *Method Enzymol.* 235, 315–329.
- Baakza, A., Vala, A.K., Dave, B.P., Dube, H.C., 2004. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311, 1–9.
- Drechsel, H., Stephan, H., Lotz, H., Haag, H., Zähler, H., Hantke, K., Jung, G., 1995a. Structure elucidation of yersiniabactin, a siderophore from highly virulent *Yersinia* strains. *Liebigs Ann.* 1995, 1727–1733.
- Drechsel, H., Tschierske, M., Thieken, A., Jung, G., Zähler, H., Winkelmann, G., 1995b. Siderophore rhizoferrin and its analogs produced by direct fermentations. *J. Ind. Microbiol.* 14, 105–112.
- Grimm, P.W., Allen, P.J., 1954. Promotions by zinc of the formation of cytochromes in *Ustilago sphaerogena*. *Plant Physiol.* 29, 369–377.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G., Zähler, H., 1993. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2159–2165.
- Machuca, A., Milagres, A.M., 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Let. Appl. Microbiol.* 36, 177–181.
- Meyer, J.-M., Hornsperger, J.M., 1978. Role of pyoverdine<sub>PF6</sub>, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *J. Gen. Microbiol.* 107, 329–331.
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., 1998. Iron metabolism and siderophores in *Pseudomonas* and related species. In: Montie, T.C. (Ed.), *Biotechnology Handbooks*, vol. 10: *Pseudomonas*. Plenum Publishing Co., New York, N.Y., pp. 201–243.
- Milagres, A.M., Machuca, A., Napoleao, D., 1999. Detection of siderophores production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Methods* 37, 1–6.
- Neilands, J.B., 1981. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 715–731.
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.
- Payne, S.M., 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores. *Method Enzymol.* 235, 329–344.
- Ratledge, C., Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 46–56.
- Shenker, M., Oliver, I., Helmann, M., Hadar, Y., Chen, Y., 1992. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *J. Plant Nutr.* 15, 2173–2182.
- Sung, H.S., Yong, S., Nam, W.Y., 2001. CAS agar diffusion for the measurement of siderophores in biological fluids. *J. Microbiol. Methods* 44, 89–95.
- Winkelmann, G., 1991. Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. *Biotechnol. Adv.* 8, 207–231.
- Winkelmann, G., 2002. Microbial siderophores-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 691–695.