



Avances en Ciencias e Ingeniería

E-ISSN: 0718-8706

crojas@exeedu.com

Executive Business School

Chile

Pellizzari, Esther E.; Marinich, Leonardo G.; Flores, Sebastián A.; Giménez, Cecilia M.
DEGRADACIÓN DE ARSÉNICO POR *Pseudomonas aeruginosa* PARA BIOREMEDIACIÓN DE
AGUA. ESTUDIO PRELIMINAR

Avances en Ciencias e Ingeniería, vol. 6, núm. 1, enero-marzo, 2015, pp. 1-6

Executive Business School

La Serena, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323635882001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

DEGRADACIÓN DE ARSÉNICO POR *Pseudomonas aeruginosa* PARA BIOREMEDIACIÓN DE AGUA. ESTUDIO PRELIMINAR

ARSENIC DEGRADATION BY *Pseudomonas aeruginosa* FOR WATER BIOREMEDIATION. PRELIMINARY STUDY

Esther E. Pellizzari¹, Leonardo G. Marinich¹, Sebastián A. Flores¹, Cecilia M. Giménez¹

(1) Universidad Nacional del Chaco Austral, Departamento de Ciencias Básicas y Aplicadas,
Comandante Fernández 755, (3700) Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco – Argentina
(e-mail: pely@uncaus.edu.ar)

Recibido: 13/10/2014 - Evaluado: 23/11/2014 - Aceptado: 24/12/2014

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue investigar la resistencia al arsénico en cultivos puros de *Pseudomonas aeruginosa*, aislada de aguas subterráneas de Presidencia Roque Sáenz Peña, provincia de Chaco y evaluar la posibilidad de su uso para la remoción de este contaminante presente en las aguas subterráneas. Las cepas fueron inmovilizadas en piedra natural y se cultivaron en caldo de sales y 1 mgAs/L. Se observó la resistencia al arsénico y la formación de biofilm, logrando la interacción entre las células, roca y arsénico. La remoción de arsénico se evaluó durante 3 meses y el porcentaje de eliminación de arsénico al final del experimento fue 60%.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the arsenic resistance in pure cultivations of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Presidencia Roque Sáenz Peña groundwater (Chaco province), and evaluate the possibility of its use to remove arsenic from groundwater. Strains were immobilized in natural stone and cultivated in salts broth and 1 mgAs/L. The arsenic resistance and biofilm formation were observed, obtaining interaction between cells, rock and arsenic. Arsenic removal was evaluated during 3 months and its final percentage of the experiment was 60%.

Palabras claves: arsénico, bacteria, remoción, reactor

Keyword: arsenic, bacteria, removal, reactor

INTRODUCCIÓN

La contaminación con arsénico de las aguas subterráneas es un problema mundial que afecta también a la República Argentina, en ese sentido, en la Provincia del Chaco, al norte de Argentina, el arsénico es un contaminante natural de los acuíferos (Blanes *et al.*, 2011).

En general, la remoción de arsénico en el agua contaminada se realiza por diferentes procedimientos tales como coagulación-precipitación química (Borho & Wilderer, 1996; Hansen *et al.*, 2006), oxidación-reducción (Zaw & Emmett, 2002), sorción e intercambio iónico (Bacocchi *et al.*, 2005), técnicas de membrana (Kim *et al.*, 2006), entre otros. Sin embargo, estos métodos tienen ciertas desventajas tales como el alto costo operativo y la generación de residuos secundarios. El reciente reconocimiento de la necesidad de desarrollar tecnologías respetuosas con el medio ambiente de bajo costo para el tratamiento del agua ha estimulado el interés en los estudios de biorremediación de metales (Banerjee *et al.*, 2011).

En estudios previos realizados por Pellizzari *et al.* (2011), se demostró la capacidad de ciertos microorganismos para reducir y eliminar el arsénico del agua. Banerjee *et al.* (2011), observó un buen crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de As(V). Otras experiencias, realizadas con diferentes metales, permitieron comprobar que esta bacteria posee muy buena dinámica para la formación de biofilm sobre rocas empleadas como lecho de inmovilización (Klausen *et al.*, 2003; van Hullebusch *et al.*, 2003).

El objetivo del presente estudio fue investigar la resistencia al arsénico en cultivos puros de *P. aeruginosa*, aislada de los acuíferos de la zona de estudio y evaluar la posibilidad de su uso para la remoción de este contaminante presente en las aguas subterráneas.

MATERIALES Y METODOS

La cepa bacteriana utilizada fue *Pseudomonas aeruginosa*, aislada de agua subterránea de Presidencia Roque Sáenz Peña, ubicada en el departamento Comandante Fernández, Provincia del Chaco, Argentina, con un contenido de 0.25 mg As/L (Pellizzari & Giménez, 2014).

Se usó arseniato de sodio ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck), para la preparación de la solución stock de 100 mg/L y diluida a diferentes concentraciones usando agua purificada (resistividad $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Las soluciones se esterilizaron en autoclave a 120°C por 15 minutos. Esta solución stock se utilizó para añadir al caldo de cultivo del reactor preparar soluciones para evaluar los niveles de resistencia de *P. aeruginosa* al arsénico y determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Las concentraciones para los estudios de CMI fueron de 1, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 mgAs/L. La CMI se definió como la concentración más baja de arseniato que suprimió el crecimiento visible de la bacteria (Couvalin *et al.*, 1985). En ambos casos, el crecimiento bacteriano fue controlado por la medición de la densidad óptica (DO) a 500nm utilizando un espectrofotómetro (Agilent technologies. Cary 60.UV-Vis).

Para los estudios de resistencia y remoción, se prepararon los medios mínimos de sales minerales (MM) para ser utilizados como caldo de cultivo, conteniendo (en g/L) 0.5 KH_2PO_4 , 1.0 NH_4Cl , 2.0 Na_2SO_4 , 2.0 KNO_3 , 0.001 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0004 FeSO_4 (Chitiva Urbina & Dussán, 2003). La solución (MM1) fue preparada con agua purificada sin el agregado de arsénico y la solución (MM2) con solución stock de As(V) a las concentraciones de estudio.

Las células de *P. aeruginosa* se inocularon en 50 ml de caldo (MM1), que fue incubado a $37^\circ\text{C} \pm 2$ durante 24 h, este caldo de cultivo posteriormente se diluyó a 1000 ml con caldo (MM1) y se incubó nuevamente durante 24 h, para favorecer el desarrollo de las bacterias. Con este cultivo se llenó el reactor que consistió en un recipiente de vidrio, con carga superior y descarga inferior, relleno con rocas de origen natural, como lecho de inmovilización. Se dejó en reposo durante 24 h, con el objeto de obtener un film de células adherido a la

superficie de la roca. Por último y luego de desagotar al reactor se lo llenó con el caldo (MM2) que contenía 1 mg/L de As(V).

El seguimiento de la remoción de arsénico total se evaluó midiendo la disminución de la concentración de arsénico en el reactor de cultivo, en forma periódica, durante 3 meses. Durante éste período de reacción se tomaron muestras para el análisis de arsénico y densidad óptica del crecimiento de las células.

Las determinaciones analíticas de arsénico (As) en las muestras se realizaron por HGAAS (espectroscopia de absorción atómica por generación de hidruros) con el uso de una lámpara de cátodo hueco en 193,7 nm de longitud de onda. El límite de cuantificación del instrumento fue 5 µg/L de As y se logró una precisión intermedia inferior a $\pm 10\%$. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Química Analítica de la Universidad Nacional del Chaco Austral, Argentina.

La resistencia de la bacteria al arsénico se determinó sembrando la cepa en 10 ml de los caldos preparados con medio MM y solución stock de arsénico a 1, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/L de As respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

La cepa mostró crecimiento favorable, con aumento de la concentración de la biomasa en el reactor que contenía 1mg/L de As(V). Debido a la naturaleza estática del experimento y teniendo en cuenta el metabolismo aeróbico de *P. aeruginosa*, el biofilm se acumuló intensamente en la superficie de las rocas. La remoción de arsénico por las células de *P. aeruginosa* fue confirmada por los datos de los análisis efectuados por espectroscopia de absorción atómica por generación de hidruros (HGAAS). El porcentaje de eliminación de arsénico en el reactor, al final del experimento fue 60%, disminuyendo la concentración de As de 1.0 a 0.4 mg/L (Figura 1). Esto indica el importante potencial de *P. aeruginosa* para la remediación de arsénico en agua.

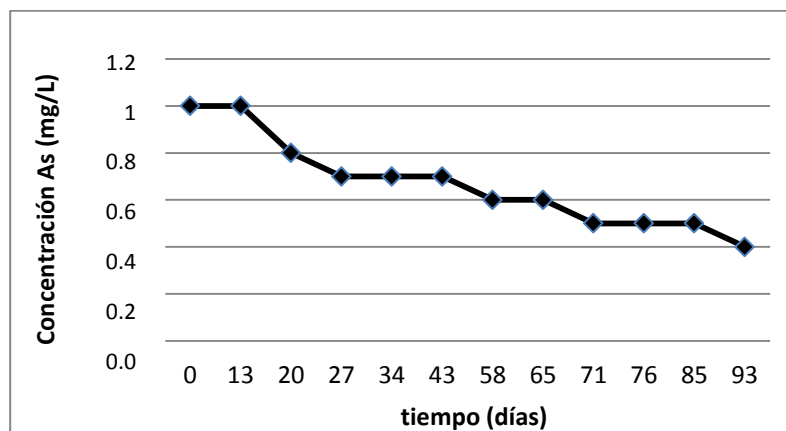


Fig. 1: Remoción de arsénico por *P. aeruginosa* en el reactor en cultivo estático

El crecimiento de las cepas en el reactor se determinó por medición de la densidad óptica (DO) a 500nm a intervalos regulares de tiempo, durante 90 días. Los resultados de este crecimiento se muestran en la Figura 2. El crecimiento de la biomasa coincide con la absorción del As por las células bacterianas, en consecuencia, se produce una disminución de la concentración de arsénico en el reactor.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de arsénico en la cepa de *P. aeruginosa* se determinó midiendo la DO a 500nm, durante una semana de incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$. Se observó la interrupción del crecimiento bacteriano cuando la concentración inicial de As(V) fue mayor a 60mg/L.

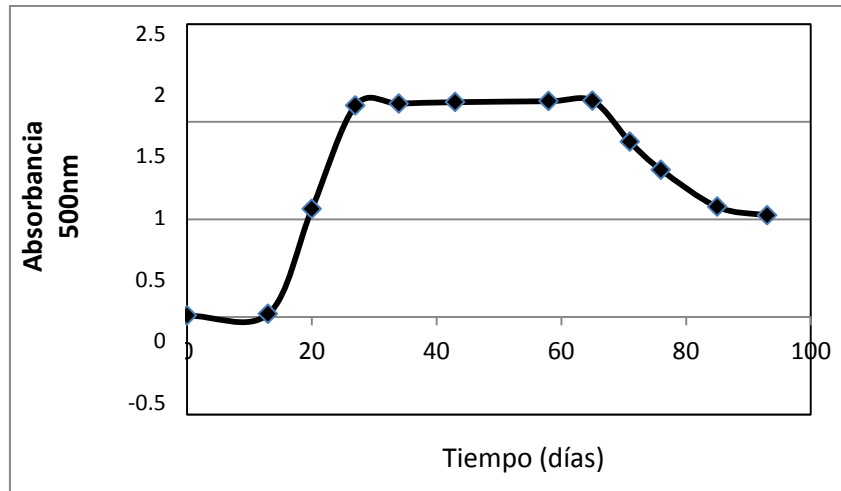


Fig. 2: Densidad óptica del crecimiento de *P. aeruginosa* en el reactor en cultivo estático

Los resultados demostraron que la remoción de arsénico total observada con *P. aeruginosa* es significativamente alta y puede acumular importantes cantidades de arsénico, a pesar de ser ésta una bacteria nativa y genéticamente sin manipulación, lo que sugiere la existencia de un cierto mecanismo de resistencia al arsénico. Resultados semejantes fueron conseguidos con otras bacterias nativas de origen acuático marino y no marino por Takeuchi *et al.* (2007). El arsénico puede ser removido utilizando rocas como lecho de inmovilización, logrando crear una columna de filtración que interactúa con la cepa.

Pseudomonas aeruginosa puede remover arsénico total y tolerarlo en altas concentraciones. En los ensayos previos de crecimiento se trabajó con pH ajustado a 5, 6, 7 y 8, y con temperaturas de 4, 10, 20, 30, 37 y 41°C, estos valores fueron seleccionados teniendo en cuenta las tablas de diferenciación del manual Bergey's (Holt *et al.*,1994) el género *Pseudomonas*. La cepa estudiada tuvo crecimiento positivo en el rango de 5 a 8 de pH y de 10 a 41°C de temperatura. Esto nos permitió deducir que no se requieren controles estrictos de pH y temperatura.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio experimental demostraron que el arsénico puede ser removido utilizando rocas como lecho de inmovilización, observándose que la interacción entre la bacteria y las rocas fue muy buena, consiguiéndose una óptima adhesión entre ambos sistemas. Además, los reactores utilizados son fáciles de armar, de bajo costo y fácil mantenimiento.

En conclusión se informa que *P. aeruginosa* es una bacteria nativa, aislada de los acuíferos de la zona, sin manipulación genética, que puede acumular arsénico y conducir a nuevas tecnologías para el tratamiento de arsénico en aguas subterráneas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos del proyecto PI-41 perteneciente a la Universidad Nacional del Chaco Austral, Argentina.

REFERENCIAS

1. Baciocchi, R., Chiavola, A. & Gavasci, R. (2005). Ion exchange equilibria of arsenic in the presence of high sulphate and nitrate concentrations, *Water Sci. Technol.: Water Supply*, 5 (5), 67-74.

2. Banerjee, S., Datta, S., Chattopadhyay, D. & Sarkar, P. (2011). Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. *Journal of Environmental Science and Health part A.*, 46, 1736-1747.
3. Blanes, P.S., Buchhamer, E.E. & Giménez, M.C. (2011). Natural contamination with arsenic and other trace elements in groundwater of the Central–West region of Chaco, Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 46 (11), 1197-1206.
4. Borho, M. & Wilderer, P. (1996). Optimized removal of arsenate(III) by adaptation of oxidation and precipitation processes to the filtration step. *Water Sci. Technol.*, 34 (9), 25-31.
5. Chitiva Urbina, L. & Dussán, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp. en biorremediación de fenol. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5 (2), 5-10.
6. Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A. & Sirot, J. (1985). L'antibiogramme. *MPC-Videom* (Paris).
7. Hansen, H.K., Nuñez, P. & Grandon, R. (2006). Electrocoagulation as a remediation tool for wastewaters containing arsenic. *Miner. Eng.*, 19 (5), 521–524.
8. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Group 4, pp. 93-94, table 4.39, pp. 151-157. 9^a ed. USA: William & Wilkins.
9. Kim, D.H., Kim, K.W. & Cho, J. (2006). Removal and transport mechanisms of arsenics in UF and NF membrane processes. *J. Water Health*, 4 (2), 215–223.
10. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., *et al.* (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48 (6), 1511-1524.
11. Pellizzari, E.E., Buchhamer, E.E. & Giménez, M.C. (2011). Selección de bacterias autóctonas para ensayos de crecimiento en medios con alto contenido de As (V), aisladas de aguas subterráneas de la provincia del Chaco. Llave de la Innovación CIBIA8. Actas del VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería en alimentos (pp61), Lima Perú.
12. Pellizzari, E.E. & Giménez, M.C. (2014); Arsenic decrease using *Pseudomonas aeruginosa* on mineral matrix for bioremediation. On Century of the Discovery of Arsenicosis in Latin America (1914-2014) As2014. Proceedings of the 5th International Congress on Arsenic in the Environment (pp 762-763), Buenos Aires, Argentina.
13. Takeuchi, M., Kawahata, H., Gupta, L.P., Kita, N., Morishita, Y., Ono, Y., *et al.* (2007). Arsenic resistance and removal by marine and non-marine bacteria. *Journal of Biotechnology*, 127, 434-442
14. van Hullebusch, E.D., Zandvoort, M.H. & Lens, P.N.L. (2003). Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, 2, 9-33.
15. Zaw, M. & Emett, M.T. (2002). Arsenic removal from water using advanced oxidation processes. *Toxicol. Lett.*, 133 (1), 113-118.

