



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y AGUAS CONTAMINADAS CON COBRE. CEPAS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* PRESENTAN DIFERENTE CAPACIDAD DEPURADORA DEL METAL

Bioremediation of soil and water contaminated with copper. *Escherichia coli*
mutant strains have different capacity to detoxify metal

Yanina Lorenzetti[§], Mariana Grillo-Puertas[§], Omar R. Scaravaglio[§], Luciana Cerioni[§],
Sabrina I. Volentini[§], Luisa Rodríguez Montelongo^{§*}

[§]Instituto de Qca. Biológica “Dr. B. Bloj”, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia e
Instituto Superior en Investigaciones Biológicas (INSIBIO-CONICET) Universidad Nacional
de Tucumán. Chacabuco 461, S. M. de Tucumán.

* Autor para correspondencia: +54 381 4248921. luirm@fbqf.unt.edu.ar

Palabras clave: biorremediación ex situ, biorremediación por bacterias

Título abreviado: Biorremediación de cobre por E.coli

ABSTRACT

Copper is an essential nutrient for organisms but when in excess, it becomes potentially toxic. The copper contamination of soils, rivers and deep water has increased dangerously. Bacteria, algae and fungi are receiving increased attention for removing and/or recovery heavy metals due to its effectiveness, low cost and easy availability. In our laboratory it was demonstrated that certain strains of *Escherichia coli* might detoxify liquid media with high concentrations of copper.

The objectives of this study were: **a)** adequately process the soil samples, artificially contaminated with copper to release the metal of the liquid and then be captured by bacteria, **b)** using different mutants of *E. coli* to remediate the waste water from one of the steps in an sequential oxidative treatment (SOT) for controlling green mold in citrus, which contains in its composition a copper salt.

a) Different soil samples artificially contaminated with copper were processed and the acid was obtained in better extraction was HCl. Three sequential extractions of 30 min each released about 90% of the metal. Strains of *E. coli* showed a higher capture of copper when the supernatants had a pH above 5. A single bacterial extraction recovered 90% of the metal.

b) In solutions of SOT containing CuSO₄, to recover 90% of the metal from it, were required perform three consecutive bacterial extractions. Some mutants in respiratory chain components were more effective than wild type in this process.

This study confirms that some strains of *E. coli*, in an *ex situ* process could be efficiently used to detoxify soil or water contaminated with copper.

RESUMEN

El cobre es un nutriente esencial para los organismos sin embargo cuando está en exceso, se vuelve potencialmente tóxico. La contaminación con cobre de suelos, ríos y aguas profundas se ha incrementado peligrosamente. Las bacterias, algas y hongos están recibiendo una atención creciente para la eliminación-recuperación de metales pesados debido a su efectividad, bajo costo y fácil disponibilidad. En nuestro laboratorio se demostró que ciertas cepas de *Escherichia coli* podían detoxificar medios líquidos con altas concentraciones de cobre.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) procesar adecuadamente muestras de suelos, contaminados artificialmente con cobre, para liberar el metal al medio líquido y a partir de allí ser capturado por las bacterias; b) utilizar diferentes mutantes de *E. coli* para remediar el agua de desecho de uno de los pasos del tratamiento secuencial oxidativo (TSO) para el control de moho verde en citrus, que contiene en su composición una sal de cobre.

a) Diferentes muestras de tierra contaminadas artificialmente con cobre fueron procesadas y el ácido con el que se obtuvo una mejor extracción fue el HCl. Tres extracciones secuenciales de 30 min cada una solubilizaban alrededor del 90% del metal. Las cepas de *E. coli* presentaron una mayor captura del cobre cuando los sobrenadantes tenían un pH superior a 5. Con una sola extracción bacteriana se recuperaba el 90% del metal.

b) En soluciones del TSO conteniendo CuSO_4 , para recuperar el 90% del metal de la solución, se necesitaron realizar tres extracciones bacterianas consecutivas. Algunas mutantes en componentes de la cadena respiratoria fueron más efectivas que la cepa salvaje en este proceso.

Este estudio confirma que algunas cepas de *E. coli*, en un proceso *ex situ*, podrían ser eficientemente utilizadas para detoxificar suelos o aguas contaminados con cobre.

INTRODUCCIÓN

Las actividades industriales, necesarias para la vida moderna, generan mucho efluentes y/o emanaciones peligrosas para el medioambiente. En la mayoría de los desechos industriales hay una gran abundancia de metales pesados (Soares *et al.*, 2003; Pinho & Bianchini, 2010). Estos elementos no son química ni biológicamente degradables, como si lo son la mayoría de los compuestos orgánicos (Reichman & Parker, 2002). Los suelos se componen de mezclas heterogéneas de compuestos inorgánicos y sustancias orgánica variadas y debido a esto, los mecanismos de unión

que pueden presentar los metales pesados con los componentes del mismo, son múltiples y varían principalmente con su composición y condiciones redox. Por lo que los efectos ecológicos de los metales pesados en los suelos están estrechamente relacionados con el contenido y la especiación de estos elementos en las fases sólida y líquida del suelo (Bruemmer *et al.*, 1986; Ulrich, 1986; Kögel-Knabner *et al.*, 2008). La acumulación de los metales pesados, sobre todo en áreas urbanas, generan una dispersión en el aire, aguas superficiales y suelos, con su consecuente filtración hacia las aguas subterráneas (acuíferos) que constituyen la reserva de agua potable del planeta (Zhu & Alva, 1993; Sauve *et al.*, 1996; Gupta, 1998; Bernard *et al.*, 2009). Estos compuestos pueden comprometer seriamente el uso del agua de consumo, dado que los tratamientos de potabilización más empleados son ineficientes para remover a los metales pesados (Malik, 2004) y se expone a la población al consumo diario de cantidades desconocidas de los mismos, poniendo en riesgo su salud (Ayres, 1992; He *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2003; Malik, 2004; Aelion *et al.*, 2009; Ochoa-Herrera *et al.*, 2011). Además en algunas regiones la contaminación de los suelos ha ocasionado que grandes extensiones de terreno se transformen en zonas no cultivables (Li & Daler, 2004; Ochoa-Herrera *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran: a) El desplazamiento de iones metálicos que son cofactores esenciales para algunas biomoléculas y el bloqueo de sus grupos funcionales, b) modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos, c) ruptura de la integridad de biomoléculas y d) modificación de otros agentes biológicamente activos (Ochiai, 1987).

Entre los metales pesados se encuentra el cobre, y aunque este metal está considerado un nutriente esencial para la mayoría de los organismos, cuando está en exceso, se vuelve potencialmente tóxico (Linder, 1991; Linder, 2001; Brewer, 2010). Su capacidad de sufrir transiciones redox Cu(II)/Cu(I) permite la actividad catalítica de diversas enzimas pero cuando se produce un desbalance entre la cantidad del metal y las defensas antioxidantes esta misma propiedad media el incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno capaces de oxidar, dañar y llevar a la degradación a proteínas, lípidos y DNA (Halliwell & Gutteridge, 1984). Por lo tanto, la viabilidad de la célula depende de la perfecta regulación del transporte, acumulación y manejo del cobre. Los mecanismos involucrados en la homeostasis de este metal existen en todas las células pero no han sido totalmente dilucidados.

Existen varias tecnologías químicas utilizadas para extraer el Cu (II), Cd (II), Pb (II), Zn (II), Hg (II) o Cr (III), tales como la precipitación química, oxidación o reducción, filtración, intercambio iónico, tratamiento electroquímico, ósmosis inversa, tecnología de membrana y la recuperación por evaporación. Sin embargo, la mayoría de ellos son ineficaces o muy caro (Ahluwalia & Goyal, 2007). Los tratamientos biológicos de ambientes contaminados por metales pesados, se han estudiado con el objetivo de identificar biosorbentes metálicos altamente eficientes y menos costosos para la eliminación de los mismos (Wong *et al.*, 1993; Volesky, 1994; Vieira & Volesky, 2000; Herrero *et al.*, 2005; Vijayaraghavan & Yun, 2008). La fitorremediación (fitoestabilización o fitoextracción) ha aportado resultados muy interesante a esta problemática (Ginocchio *et al.*, 2006; Bonfranceschi Barros *et al.*, 2009), pero también hay otro tipo de materiales biológicos, especialmente bacterias, algas, levaduras y hongos que están recibiendo una atención creciente para la eliminación-recuperación de

metales pesados, debido a su efectividad, bajo costo y fácil disponibilidad (Curutchet *et al.*, 2001; Giaveno & Donati, 2001).

Hace varios años se inició en nuestro laboratorio una serie de investigaciones acerca de la acción del *ter*-butilhidroperóxido (t-BOOH) en ciertas cepas de *E. coli*. Se encontró que estas bacterias eran muy sensibles al daño oxidativo generado por Cu(II)-t-BOOH y que la cadena respiratoria era uno de los primeros sitios en dañarse (Rodríguez-Montelongo *et al.*, 1995). También se demostró que la presencia de NDH-2 (una deshidrogenasa de cadena respiratoria) confiere a las células ventajas adaptativas para crecer en condiciones extremas de cobre (Rodríguez-Montelongo *et al.*, 2006, Volentini *et al.*, 2011). Ya que esta NDH-2 tiene propiedades de Cu(II)-reductasa, la explicación de esta ventaja podría estar asociada a una optimización tanto en la internalización como en la extrusión del cobre a través de la membrana celular. Utilizando una cepa salvaje (AN387) y una mutante en NDH-2 (ANN001) se estudió la capacidad de estas bacterias para capturar cobre a partir de agua contaminada artificialmente con el metal. Se encontró que a igual densidad celular (determinada por absorbancia) ambas cepas poseen similar capacidad para remover cobre de una solución, sin embargo la captación específica de cobre (q) de ANN001 es significativamente superior a la de AN387 (Grillo-Puertas, 2008). Los valores de q encontrados para ambas cepas son bastante significativos por lo que se considera que las mismas podrían ser empleadas *ex situ*, en la biorremediación de suelos contaminados con el metal.

Basándose en el daño oxidativo generado por Cu(II)-peróxidos sobre *E. coli*, en nuestro laboratorio se inició una serie de estudios para determinar, si a través de un proceso oxidativo similar, se podrían dañar otros microorganismos. Utilizando un tratamiento

secuencial oxidativo (TSO), que incluye en un paso el uso de $\text{Cu(II)-H}_2\text{O}_2$, se consiguió inhibir *in vitro*, el crecimiento de ciertos hongos que eran los causantes de enfermedades poscosecha, que generan importantes pérdidas en la exportación de limones (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum candidum*) (Cerioni *et al.*, 2009). Luego, el tratamiento *in vitro* fue adaptado a condiciones *in vivo*, logrando obtener condiciones que controlan satisfactoriamente el moho verde de los citrus (Cerioni *et al.*, 2012). Los componentes del TSO se degradan fácilmente, a excepción del CuSO_4 . Encontrar una metodología que elimine el metal del efluente generado después de tratar a los limones, permitiría liberar al medio un agua sin contaminantes.

METODOLOGÍA

El reactivos sulfonato de batocuproína (BCS) y los medios de cultivo para el crecimiento de las cepas fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Preparación de las muestras de tierra

- Tierra utilizada

Se trabajó con tierra de una zona no cultivada, obtenida a 20 cm de profundidad. La muestra fue triturada, homogeneizada y tamizada. Luego fue secada en estufa a 37°C hasta peso constante y guardada en recipiente hermético hasta su uso.

- Incorporación del cobre a la tierra

En una serie de cajas de petri se colocaron 10 g de tierra y se adicionaron 75, 150 y 300 μmoles de CuSO_4 (7.5, 15, y 30 $\mu\text{moles.g}^{-1}$). La adición fue realizada de manera tal que el líquido incorporado fuera suficiente para asegurarse de que el cobre se integre en forma uniforme en toda la tierra. Luego las muestras se secaron hasta peso constante y se guardaron en frascos bien cerrados hasta el momento de uso.

Extracciones de cobre desde las muestras de tierras

- Influencia de diferentes ácidos

Para la extracción del cobre de las tierras contaminadas artificialmente con el metal se utilizaron diferentes ácidos a una concentración de 100 mM. Los ácidos usados fueron: sulfúrico (H_2SO_4), nítrico (HNO_3), tricloro acético (TCA, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$) y clorhídrico (HCl).

En este estudio se utilizó la muestra de tierra que tenía menor contenido de cobre adicionado (7.5 $\mu\text{moles.g}^{-1}$). En tubos tipo eppendorf de 1.5 mL de capacidad se colocaron alícuotas de tierra (0.15 g) y se adicionaron 500 μL de cada ácido. Se trabajó a temperatura ambiente (TA), agitando las muestras durante 60 min. La agitación de la muestra se realizó en la placa de un mini-shaker (IKA MS3) a 900 r.p.m. y al trabajar a TA siempre se mantuvo la misma alrededor de 25°C. Finalizado el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 11 000 x g (Biofuge 15-Heraeus Sepatech) durante 10 min. Luego el sobrenadante fue recuperado para medir el cobre.

- Influencia de la agitación, la temperatura y el tiempo de extracción

Para comprobar la influencia de la agitación se procedió como se indicó con anterioridad, se utilizó la muestra de tierra que tenía menor contenido de cobre adicionado y se realizó la extracción con HCl 100 mM incubando a TA durante 60 min. Un grupo de muestras se mantuvo sin agitar y otro grupo similar se sometió a una agitación de 900 r.p.m. durante todo el tiempo.

Al investigar el efecto de la temperatura, se procedió de manera similar, realizando la extracción con agitación e incubando un grupo de muestras a TA y otro similar a 75°C. Igualmente, al estudiar la influencia del tiempo de incubación, las muestras se extrajeron a TA, sin agitación y se analizaron diferentes tiempos de incubación (0, 5, 15, 30, 60 y 180 min).

- Influencia de la concentración de ácido sobre muestras con diferentes concentraciones de cobre

En este caso se hizo un estudio más integral; muestras de tierra con diferentes contenido de cobre (7.5, 15 y 30 $\mu\text{moles g}^{-1}$ de tierra) fueron sometidas a extracciones del metal con diferentes concentraciones de HCl (50 mM, 100 mM y 200 mM). Las extracciones se realizaron a TA y sin agitación, pero un grupo de muestras fue incubado durante 5 min y otro durante 30 min. Finalizado el tiempo de extracción las muestras fueron centrifugadas y después de separar el sobrenadante, el sedimento fue sometido al mismo tratamiento dos veces más. En cada extracción los sobrenadantes fueron recuperados para medir el cobre extraído.

Se efectuaron extracciones de la tierra sin cobre adicionado (blancos) con todos los ácidos y en todas las condiciones.

Preparación de la solución acuosa de cobre (SAC) a partir del efluente del TSO aplicado a limones

La segunda incubación del TSO consta de H₂O₂ 600 mM en presencia de CuSO₄ 6 mM, acidificada a pH 4. Ya que el H₂O₂ interfiere en la extracción bacteriana el efluente se expone a radiación UV-B durante 60 min. En ese tiempo se logra degradar la mayor parte del peróxido. Luego el efluente se deja estacionado 24 h, antes de proceder con la incubación bacteriana.

Preparación de las células bacterianas para la captación del cobre

Cepas de Escherichia coli utilizadas

AN387 (*rpsl, gal*) (Wallace & Young, 1977)

ANN001 derivada de AN387 (*ndh::TcR*)

Medio de cultivo

Para el crecimiento de las cepas se utilizaron medios comerciales (Sigma-Aldrich).

Medio completo Luria Broth (LB): 10 g de hidrolizado enzimático de caseína, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, agua destilada c.s.p. 1 L. El pH es ajustado a 7.

Medio mínimo M9: 6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl , 1 g de NH_4Cl , 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, agua destilada c.s.p. 1 L.

Crecimiento de las bacterias

Los inóculos se prepararon en LB y a partir de ellos se realizaron cultivos de cada cepa durante 24 h, en medio líquido M9, a 37°C, en aerobiosis y en presencia de glicerol al 0.5% como fuente de carbono. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en agua destilada (pH 5) hasta una $A_{560\text{nm}} = 10$ (suspensión bacteriana).

Proceso de captación del cobre

Incubaciones de las células con los extractos ácidos y con el efluente derivado del TSO (SAC)

A los extractos ácidos y la SAC se los usó de dos formas: **a)** sin neutralizar, se utilizaron las muestras tal cual se recolectaron después de la extracción de las tierras o al finalizar el tratamiento de la SAC; **b)** neutralizados, antes de hacer las incubaciones con las bacterias se neutralizó la muestra alrededor de pH 6 agregando borato de sodio 0.5 M.

Para realizar la captura de cobre de los diferentes extractos ácidos y de las muestras provenientes de SAC, se siguió el esquema mostrado en la Figura 1. Las suspensiones bacterianas de las cepas AN387 y ANN001 fueron fraccionadas (300 μL) en varias series de tubos tipo eppendorf y se eliminó el sobrenadante conservándose los pellets

(1, 2, 3 y 4 – Panel A). Sobre los pellets de la primera serie se colocaron 300 μ L de los extractos ácidos o de la SAC, se resuspendieron las bacterias hasta homogeneidad (panel B) y se incubaron durante 30 min a TA. Al finalizar las incubaciones, las muestras fueron centrifugadas y se separaron los sobrenadantes. El sobrenadante de uno de los tubos fue reservado para medir el cobre residual (CRS) y los otros sobrenadantes fueron adicionados, respectivamente, sobre los pellets de la serie 2 (panel C), las células fueron resuspendidas (panel D) y se repitió el procedimiento hasta concluir toda la serie de incubaciones. Finalmente se midió el cobre residual en los sobrenadantes, como se indica en el apartado correspondiente.

Determinación del cobre

Se utilizó el quelante sulfonato de batocuproína (BCS) que al acomplejar el Cu(I) forma un compuesto coloreado ($A_{480\text{ nm}}$) el cual es directamente proporcional al Cu(I) presente en el medio (Brumby & Massey, 1967). Para medir el cobre total en el sobrenadante después de agregar el quelante se debe reducir todo el cobre que aún permanezca oxidado a Cu(I), ello se hace agregando ascorbato de sodio en cantidad suficiente. La reacción de color se realizó en un volumen final de 1 mL, para ello se toman alícuotas adecuadas de cada muestra, para que contengan una cantidad de cobre aproximada a los 100 η moles, a continuación se agrega BCS (0.25 mM) y luego ascorbato de sodio (2 mM). Se lee la absorbancia a 480 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (BioSpec-mini).

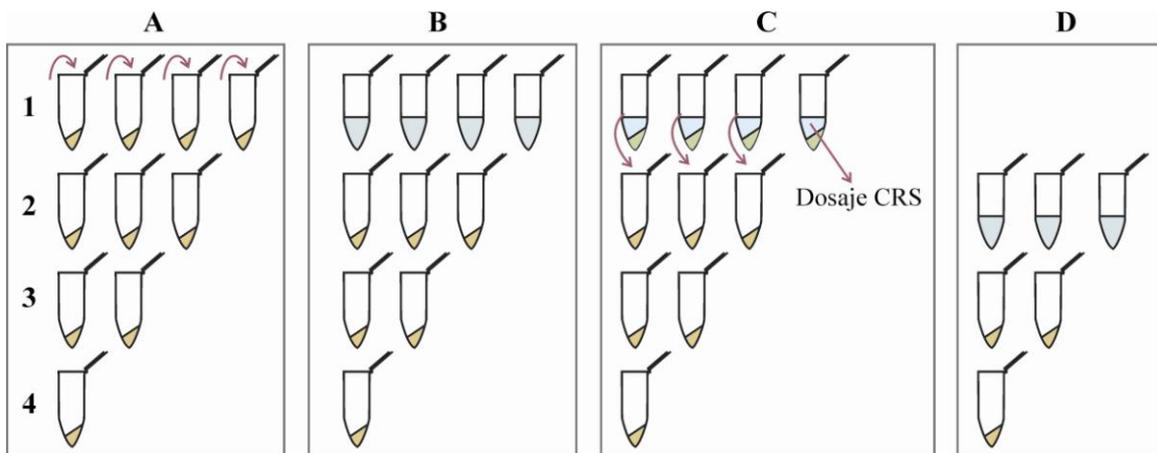


Figura 1. Esquema del tratamiento secuencial para la remoción de cobre por las células de *E. coli*. Este tratamiento fue aplicado a los extractos ácidos y a la solución acuosa de cobre (SAC) a partir de los efluentes del TSO.

Figure 1. Scheme of the sequential treatment for the removal of copper by *E. coli* cells. This treatment was applied to the acid extracts and the aqueous solution of copper (SAC) of the effluents from the TSO.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de ciertos parámetros sobre el proceso de extracción del cobre desde las tierras

- Influencia de diferentes ácidos en la extracción del cobre

En principio y utilizando una serie de ácidos se investigó cual podría ser el más adecuado para realizar la extracción del cobre de las muestras contaminadas artificialmente. Los cuatro ácidos utilizados liberaron una importante cantidad de cobre a partir de la muestra de tierra (Figura 2), sin embargo el mejor resultado se obtuvo con el H_2SO_4 el cual liberó alrededor de un 45% del cobre adicionado, al incubar la muestra durante 60 min. Sin embargo como este ácido es muy reactivo con la materia orgánica,

se eligió al HCl como ácido de trabajo el cual, en las mismas condiciones, liberó alrededor del 40% del cobre adicionado. Otros autores también han usado este ácido en desorción de metales a partir de muestras de suelos (Davis & Singh, 1995; Moutsatsou *et al.*, 2006).

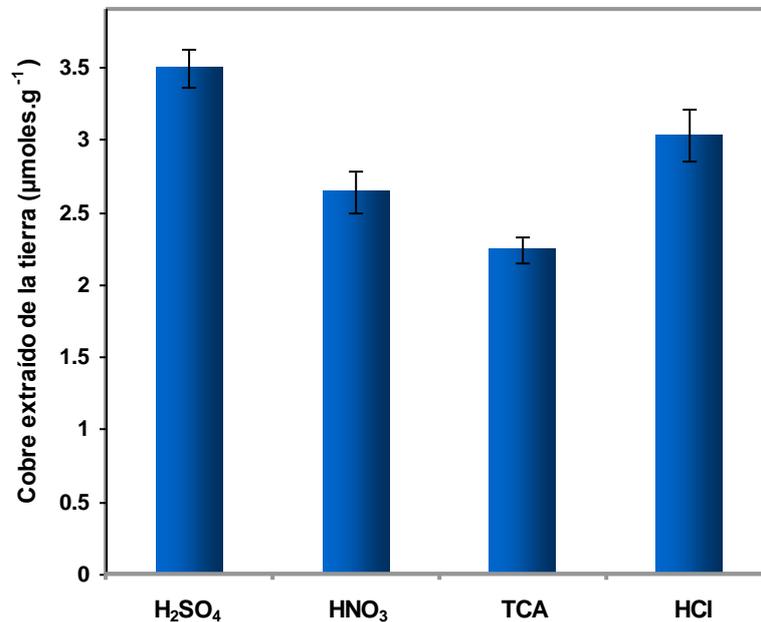


Figura 2. Influencia de diferentes ácidos en la extracción del cobre desde muestras de tierra. Se utilizaron diferentes ácidos a la misma concentración (100 mM). La extracción se realizó agitando durante 60 min a TA. Se utilizó la muestra de tierra que tenía incorporado 7.5 µmoles.g⁻¹. El resultado es el promedio de tres experimentos realizados por triplicado.

Figure 2. Influence of different acids on the extraction of copper from soil samples. Different acids were used at the same concentration (100 mM). The extraction was carried out shaking for 60 min at TA. The soil sample containing 7.5 µmoles.g⁻¹ of copper incorporated, was used. The result is the average of three experiments carried out in triplicate.

- Influencia de la agitación y la temperatura

Muestras de tierra tratadas con HCl 100 mM e incubadas 60 min a diferentes temperaturas (TA y 75°C) mostraron los mismos valores de cobre extraído, lo mismo

ocurrió cuando las muestras se mantuvieron sin agitación o fueron agitadas (900 r.p.m.) durante la extracción (resultados no mostrados).

- Influencia del Tiempo de contacto

En los estudios que se realizaron a continuación se trabajó siempre a TA y sin agitación. Para investigar como influye el tiempo de incubación en la extracción de la muestra se realizó una curva de tiempo incubando la extracción hasta 180 min. Como se observa en la Figura 3 aunque con 5 min se observa una importante cantidad de cobre extraído (alrededor del 25%), la mayor cantidad se consigue entre los 30 a 60 min (alrededor del 34%).

Otros autores encontraron resultados similares, Moutsatsou *et al.* (2006) trabajando con HCl 1 M y en una hora de extracción lograron recuperar el 40% del cobre presente en la muestra y Martínez Arreguín *et al.* (2005) usando ácido acético 100 mM liberaron 40% de plomo presente en una muestra de suelo, pero para lograrlo tuvieron que incubar la muestra con agitación, durante 8 h.

- Influencia de la concentración del ácido en combinación con el tiempo y las diferentes concentraciones de cobre en las muestras

Al analizar la influencia de diferentes concentraciones del ácido en las tres muestras de tierra, se observa que para recuperar el 80% del cobre incorporado se necesita trabajar con la mayor concentración del ácido y realizar al menos tres extracciones de 30 min a la misma muestra (Figura 4). Si se trabaja a tiempos muy cortos (5 min), utilizando los ácidos de mayor concentración se obtiene muy buenos rendimientos, mejores por supuesto cuando la concentración de cobre en la muestra es menor (Figura 4a).

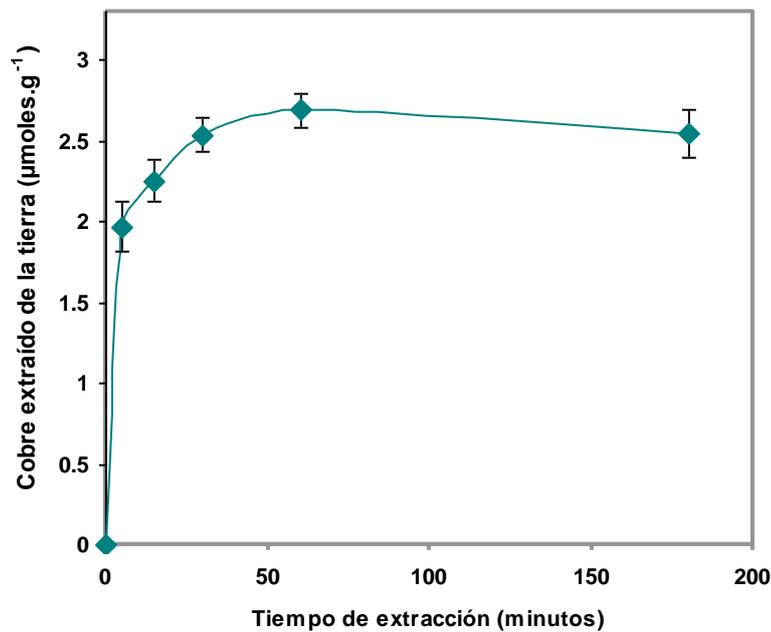


Figura 3. Influencia del tiempo en la extracción del cobre desde muestras de tierra. Las extracciones se realizaron utilizando HCl 100 mM, agitando e incubando a TA a los tiempos indicados. Se utilizó la muestra de tierra que tenía incorporado $7.5 \mu\text{moles.g}^{-1}$. El resultado es el promedio de tres experimentos realizados por triplicado.

Figure 3. Influence of time on the copper extraction from soil samples. The extractions were carried out using 100 mM HCl, with agitation and incubated at TA at the indicated times. The soil sample containing $7.5 \mu\text{moles.g}^{-1}$ of copper incorporated, was used. The result is the average of three experiments carried out in triplicate.

Resultados similares fueron obtenidos Martínez Arreguín *et al.* (2005) cuando variaron la concentración del ácido acético de 100 mM a 200 mM, la liberación del plomo aumentó del 40% al 55%. Moutsatsou *et al.* (2006) también lograron aumentar la recuperación de cobre al aumentar la concentración del ácido; variando el HCl de 1 M a 3 M, la liberación del cobre se incrementó del 40% al 50%. Estos últimos autores recuperaron mayor porcentaje de cobre trabajando a tiempos similares a los usados en este trabajo, sin embargo para lograrlo tuvieron que usar un ácido diez veces más concentrado.

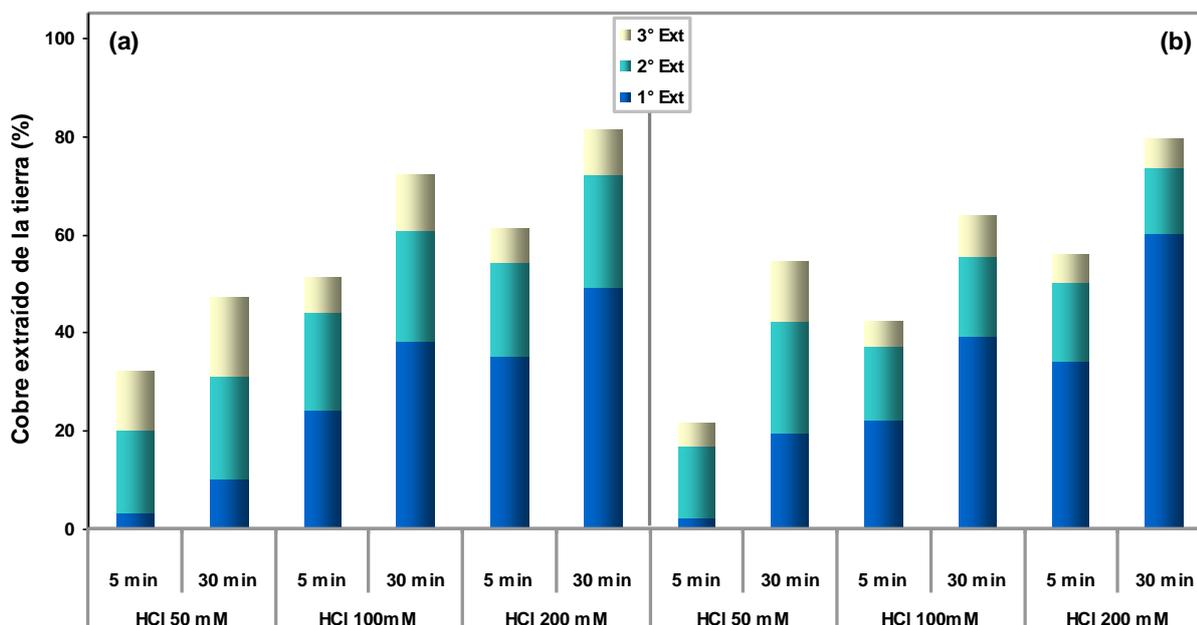


Figura 4. Efecto del tiempo y de la concentración del ácido en la extracción de cobre.

A las diferentes muestras de tierra se le realizaron tres extracciones con las diferentes concentraciones de HCl y variando el tiempo de duración de cada extracción, según se indica. La extracción se realizó a TA y sin agitación. Los resultados están expresados como el porcentaje de cobre extraído en relación a las diferentes cantidades de cobre adicionado a cada tierra. Las muestras de tierra son: **a)** 7.5 $\mu\text{moles de Cu.gr}^{-1}$; **b)** 30 $\mu\text{moles de Cu.gr}^{-1}$. El resultado es representativo de cuatro experimentos realizados por triplicado.

Figure 4. Effect of time and acid concentration in the copper extraction. In several soil samples were carried out three extractions with different concentrations of HCl and varying the duration of each extraction, as indicated. The extraction was carried out at TA and without agitation. The results are expressed as the percentage of copper removed in relation to the different amounts of copper added to each soil. The soil samples are: **a)** 7.5 $\mu\text{moles of Cu.gr}^{-1}$, **b)** 30 $\mu\text{moles of Cu.gr}^{-1}$. The result is representative of four experiments carried out by triplicate.

Aunque los porcentajes de recuperación de cobre fueron similares en las tres muestras, como es lógico, las cantidades de cobre recuperados por gramo de muestra fueron muy diferentes y esta diferencia es mucho más evidente en la primera extracción (Figura 5).

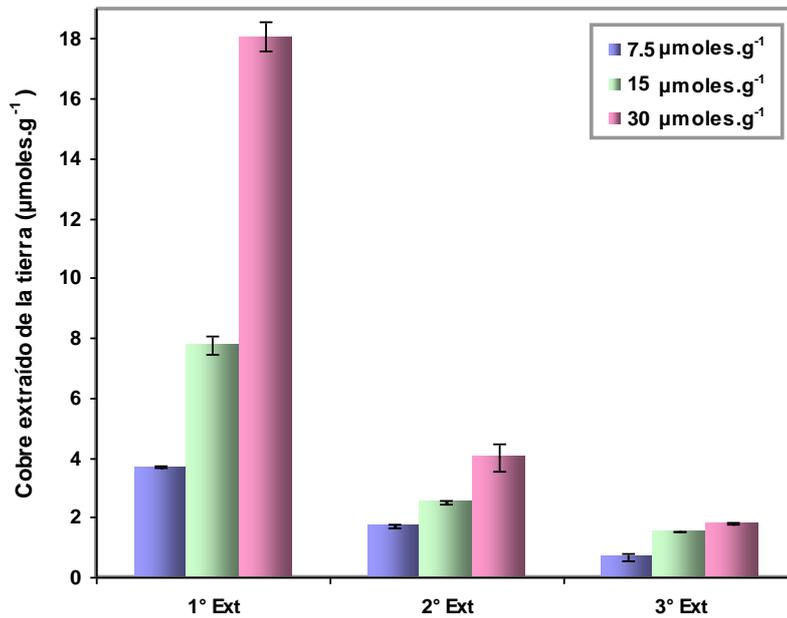


Figura 5. Extracción de cobre en diferentes muestras de tierra. Las extracciones se realizaron utilizando HCl 200 mM durante 30 min y se incubaron a TA y sin agitación. El resultado es el promedio de tres experimentos realizados por triplicado.

Figure 5. Copper extraction in different soil samples. The extractions were performed using 200 mM HCl for 30 min and incubated at TA without agitation. The result is the average of three experiments carried out by triplicate.

En muestras sin metal adicionado se encontró que la tierra utilizada de base para el estudio tenía muy poca cantidad de cobre, alrededor de $10 \mu\text{moles.g}^{-1}$ de tierra.

Estudio de la captura del cobre por las bacterias

- Tratamiento de los extractos ácidos con las bacterias

Cuando los extractos ácidos fueron tratados con las suspensiones bacterianas, la captura del metal fue mínima si las muestras no fueron previamente neutralizadas. Sin embargo al neutralizar la acidez, la captura del cobre aumentó significativamente. Cuando los extractos provenían de las muestras con menor contenido de cobre ($7.5 \mu\text{moles.g}^{-1}$) con una sola incubación bacteriana, ambas cepas fueron capaces de capturar prácticamente

la totalidad del cobre presente en los extractos (Figura 6a). Si los extractos provenían de las muestras con mayor contenido de cobre ($30 \mu\text{moles.g}^{-1}$) una sola incubación bacteriana no fue suficiente para capturar todo el metal de los extractos, pero dependiendo de la cepas se capturó entre un 67% (AN387) a un 73% (ANN001) (Figura 6b).

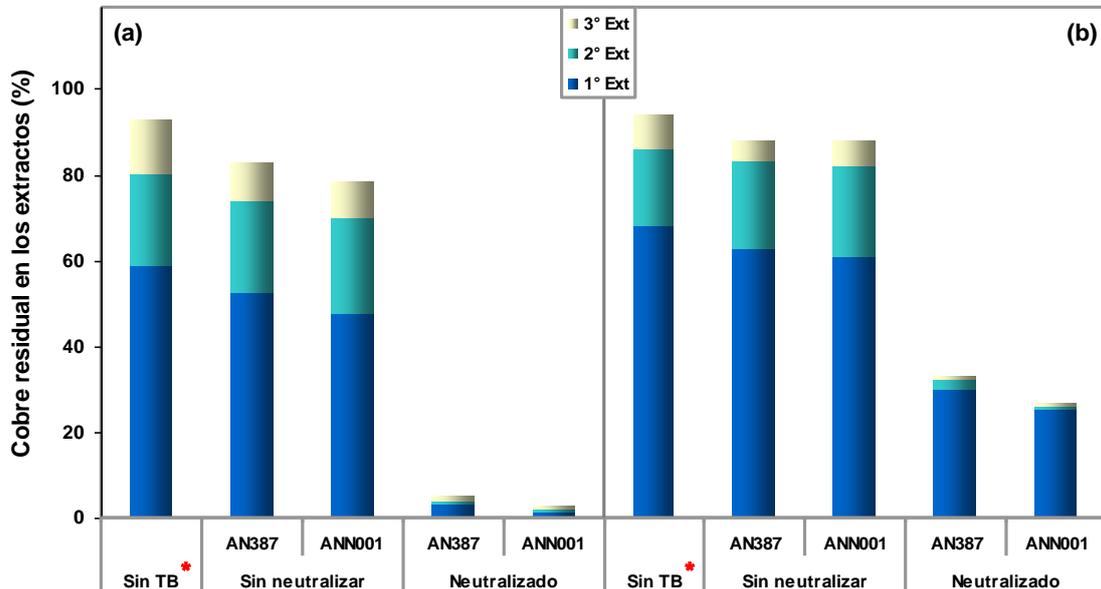


Figura 6. Tratamiento de los extractos ácidos para recuperar el cobre por las bacterias. La captura del cobre por células de las cepas AN387 y ANN001 se realizó tanto en las muestras tal cual se obtuvieron al final de la extracción de las tierras (*Sin neutralizar*) o después de neutralizar a pH 6 (*Neutralizado*) con borato de sodio. Los extractos ácidos provienen de las muestras de tierra con: **a)** $7.5 \mu\text{moles de Cu.gr}^{-1}$; **b)** $30 \mu\text{moles de Cu.gr}^{-1}$. Los resultados están expresados como el porcentaje de cobre incorporado a las muestras de tierra. El resultado es representativo de cuatro experimentos realizados por triplicado.

*Sin TB: Sin tratamiento bacteriano

Figure 6. Treatment of acid extracts to recover copper by bacteria. Copper capture by cell of AN387 and ANN001 strains was carried out on both samples as is obtained at the end of the extraction of the soils (*Sin neutralizar*) or after neutralization to pH 6 (*Neutralizado*) with sodium borate. The acid extracts are from soil samples with: **a)** $7.5 \mu\text{moles of Cu.gr}^{-1}$; **b)** $30 \mu\text{moles of Cu.gr}^{-1}$. The results are expressed as the percentage of copper incorporated in the soil samples. The result is representative of four experiments carried out by triplicate.

* Sin TB: Without bacterial treatment

Tratamiento de la SAC con las bacterias

Al realizar el tratamiento bacteriano sobre los efluentes del TSO, al igual que ocurrió con los extractos ácidos, si la SAC no fue previamente neutralizada la captura del metal por las bacterias fue mínima (Figura 7). Sin embargo al neutralizar la captura varió dependiendo de la cepa utilizada. En la primera incubación bacteriana se logró recuperar entre el 50% (AN387) y el 65% (ANN001) del cobre en la muestra. Como se puede observar en ambas determinaciones la cepa ANN001 (deficiente en NDH-2) es más eficiente para capturar el cobre de las muestras. Después de la cuarta incubación el cobre en el sobrenadante fue indetectable por el método usado (límite de detección $2 \mu\text{moles.L}^{-1}$). La cantidad de cobre presente en las muestras después de este tratamiento sería inferior a los valores máximos permitidos por la Organización Mundial para la Salud (OMS, 2003) que es del orden de $31.5 \mu\text{moles.L}^{-1}$ y por el Código Alimentario Argentino (CAA, 1971) que es del orden de $15.7 \mu\text{moles.L}^{-1}$.

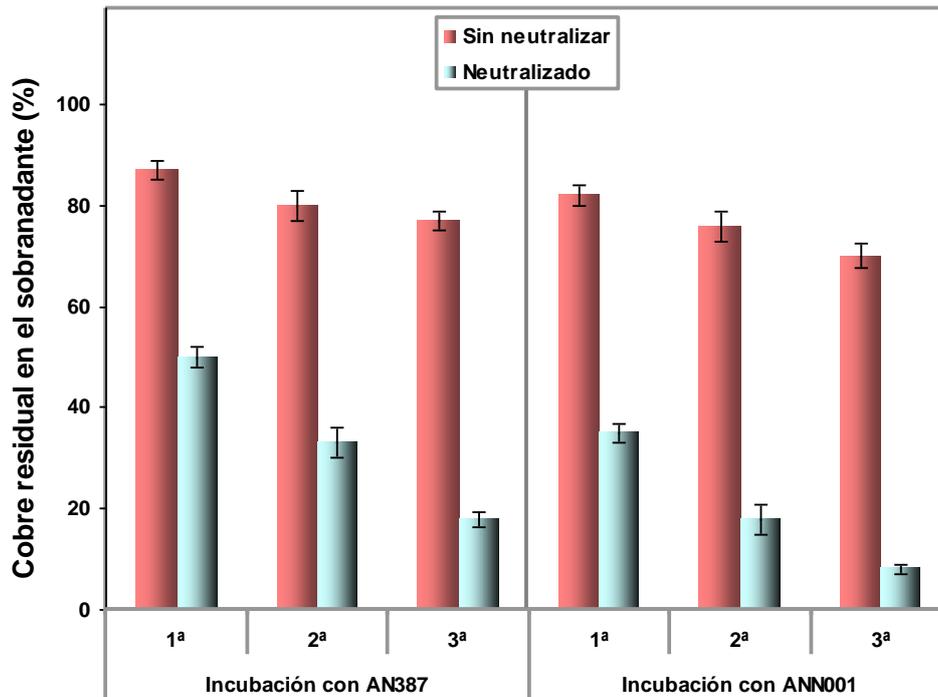


Figura 7. Tratamiento del efluente del TSO para recuperar el cobre por las bacterias. La captura del cobre por células de las cepas AN387 y ANN001 se realizó tanto en las muestras tal cual se obtuvieron al final del tratamiento de la SAC (*Sin neutralizar*) o después de neutralizar a pH 6 (*Neutralizado*) con borato de sodio. Los resultados están expresados como el porcentaje de cobre extraído en relación al cobre determinado en la muestra, previa a la incubación bacteriana. El resultado es representativo de cuatro experimentos realizados por triplicado.

Figure 7. The treatment of effluent from the TSO to recover copper by bacteria. Copper capture by cell of AN387 and ANN001 strains was carried out on both samples as is obtained at the end of the treatment of SAC (*Sin neutralizar*) or after neutralization to pH 6 (*Neutralizado*) with sodium borate. The results are expressed as the percentage of copper extracted in relation to copper in the sample, determined previous bacterial incubation. The result is the average of four experiments carried out by triplicate.

Comparación de los procesos de captura del cobre a partir de los extractos ácidos y del efluente del TSO

La concentración de cobre en SAC es de $6 \mu\text{moles.mL}^{-1}$. Haciendo una comparación con la Figura 6b, en ese extracto ácido se recupera (con las tres extracciones) aproximadamente el 90% del cobre adicionado, por lo cual la sumatoria de esas muestras tendrían que tener aproximadamente unos $8 \mu\text{moles.mL}^{-1}$. Sin embargo como ya se dijo se logró recuperar en la primera incubación bacteriana porcentajes de cobre significativamente mayores (67% con AN387 y 73% con ANN001) a los conseguidos en condiciones similares con SAC (50% con AN387 y 65% con ANN001). Se sabe que la disponibilidad de cobre depende de las condiciones del medio y de la especiación o tipo de sal que esté formando (Bruemmer *et al.*, 1986; Ulrich, 1986; Kögel-Knabner *et al.*, 2008). Evidentemente el cobre proveniente de la muestra de tierra (la mayor parte estaría como CuCl_2) y quizá esta forma de cobre estaría más disponible para ser capturado por las bacterias que el proveniente de la SAC (la mayor parte estaría como CuSO_4). Por otro lado el extracto ácido es una muestra más heterogénea que la SAC y los otros componentes del medio extraídos con el ácido también pueden estar influenciando positivamente para producir la captura. Sin embargo se sabe que la presencia de algunos cationes interfieren en la captura del cobre por las bacterias, este efecto se vio muy marcado por la presencia de hierro (Grillo Puertas, 2008). Al ser el cobre y el hierro dos metales con características similares los procesos metabólicos en los que participan se complementan o se interfieren (Halliwell & Gutteridge, 1984; Candeias *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 2007). Realizar un estudio más exhaustivo de la composición del extracto ácido y de SAC sería interesante para comprobar cuales son los componentes que están influenciado en la captura del metal por las bacterias en ambas muestras.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo son de fácil manejo, ya que tienen pocos requerimientos nutricionales y al ser de crecimiento rápido es posible obtener una gran cantidad de biomasa en poco tiempo. Otros investigadores ya han reportado que cepas de *E. coli* modificadas genéticamente fueron capaces de bioacumular metales en solución, como níquel o cadmio (Deng *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Ravikumar *et al.*, 2011). Aunque las cepas de *E. coli* utilizadas en esta tesina no son patógenas, algunas cepas si lo son y la presencia de esta bacteria en el agua es usada como índice de contaminación fecal (Falcão *et al.*, 1993). Por lo tanto, este microorganismo no sería utilizado como decontaminante de cobre *in situ*, la propuesta es aplicarlo como una tecnología que pueda implementarse directamente en la industria sobre los efluentes antes de ser desechados y en contenedores en donde el microorganismo pueda ser fácilmente recuperado. También el suelo altamente contaminado puede trasladarse a lugares aislados donde se los pueda tratar como los efluentes. Además como ya se ha dicho, el cobre no es un elemento biodegradable ni tampoco renovable, por lo que manejarlo en un ámbito cerrado permitiría, por un lado decontaminar el agua o el suelo y por otro lado se podría recuperar el metal usando el microorganismo como contenedor de cobre, similares aplicaciones se logra en la fitoextracción donde la parte aérea de la planta es utilizada para recuperar el cobre (Bonfranceschi Barros *et al.*, 2009)

CONCLUSIONES

En la liberación del cobre a partir de una muestra de tierra contaminada artificialmente, cambios en la temperatura de extracción y la agitación de la muestra no influyen en el proceso.

A mayor concentración de ácido (HCl 200 mM) y mayor tiempo de incubación (30 a 60 min) se obtiene un buen porcentaje de extracción del metal desde muestras contaminada, pero aún tiempos muy cortos (5 min) y con concentraciones más bajas de ácido (HCl 50 mM) se observa una extracción significativa de cobre.

Cuando los extractos ácidos o las muestras derivadas de los efluentes del TSO fueron tratados con las suspensiones bacterianas, con el objeto de permitir que las mismas capturen el cobre del medio, si las muestras no fueron previamente neutralizadas la captura del metal no fue posible. Al neutralizar la acidez, ambas cepas fueron capaces de capturar importantes cantidades de cobre, siendo significativamente mayor la captura de la cepa mutante en una deshidrogenasa de la cadena respiratoria (ANN001).

Ambas cepas de *E. coli* podrían tener una aplicación como decontaminantes de cobre *ex situ*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos acordados por el Consejo de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT), Proyecto 26/D444.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aelion CM, Davis HT, McDermott S & Lawson AB. 2009. Soil metal concentrations and toxicity: Associations with distances to industrial facilities and implications for human health. *Science of the Total Environment*, 407: 2216-2223
- Ahluwalia SS & Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98: 2243-2257
- Ayres RU. 1992. Toxic heavy metals: materials cycle optimization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 815-820
- Bernard L, Maron PA, Mougél C, Nowak V, Lévêque J, Marol C, Balesdent J, Gibiat F & Ranjard L. 2009. Contamination of soil by copper affects the dynamics, diversity, and activity of soil bacterial communities involved in wheat decomposition and carbon storage. *Applied Environmental Microbiology*, 75: 7565-7569
- Bonfranceschi Barros A, Flocco CG & Donati ER. 2009. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 366-371
- Brewer GJ. 2010. Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Chemical Research in Toxicology*, 23:319-326
- Bruemmer GW, Gerth J & Herms U. 1986. Heavy Metal Species, Mobility and Availability in Soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 149:382-398
- Brumby PE & Massey V. 1967. Determination of nonheme iron, total iron, and copper. *Methods in Enzymology*, 10: 463-474

- CAA (Código alimentario argentino). 1971. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Cap. XII, 982-1079. Decreto 2126/71. Reglamentario de la Ley 18241
- Candeias LP, Patel KB, Stratford MRL & Wardman P. 1993. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Letters*, 333: 151-153
- Cerioni L, Rapisarda VA, Hilal M, Prado FE & Rodríguez-Montelongo L. 2009. Synergistic antifungal activity of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and cupric sulfate against *Penicillium digitatum*. *Journal of Food Protection*, 72: 1660-1665
- Cerioni L, Rodríguez-Montelongo L, Ramallo J, Prado FE, Rapisarda VA & Volentini SI. 2012. Control of lemon green mold by a sequential oxidative treatment and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 63: 33-39
- Curutchet G, Donati E, Oliver C, Pogliani C & Viera MR. 2001. Development of *Thiobacillus* biofilms for metal recovery. *Methods in Enzymology*. 337: 171-186
- Davis AP & Singh I. 1995. Washing of Zn(II) from contaminated soil column. *Journal of Environmental Engineering (ASCE)*, 121: 174-185.
- Deng X, Li QB, Lu YH, Sun DH, Huang YL & Chen XR. 2003. Bioaccumulation of nickel from aqueous solutions by genetically engineered *Escherichia coli*. *Water Research*, 37: 2505-2511
- Falcão DP, Leite CQ, Simões MJ, Giannini MJ & Valentini SR. 1993. Microbiological quality of recreational waters in Araraquara, SP, Brazil. *Science of the Total Environment*, 128: 37-49
- Giaveno A & Donati E. 2001. Bioleaching of heazelwoodite by means *Thiobacillus* actions. *Process Biochemistry*, 36: 955-962
- Ginocchio R, Sánchez P, de La Fuente LM Camus I, Bustamante E, Silva Y, Urrestarazu P, Torres JC & Rodríguez PH. 2006. Agricultural soils spiked with

- copper mine wastes and copper concentrate: Implications for copper bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 712-718
- Grillo-Puertas M. 2008. *Cepas de Escherichia coli deficientes en NDH-2 como potencial biorremediadora de cobre*. Tesis de licenciatura. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina: 68 p
 - Gupta VK. 1998. Equilibrium uptake, sorption dynamics, process development, and column operations for the removal of copper and nickel from aqueous solution and wastewater using activated slag, a low-cost adsorbent. *Industrial and engineering chemistry research*, 37: 192-202
 - Halliwell B & Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219: 1-14
 - He M, Wang Z & Tang H. 1998. The chemical, toxicological and ecological studies in assessing the heavy metals pollution in Le An river, China. *Water Research*, 32: 510
 - Herrero R, Lodeiro P, Rey-Castro C, Vilariño T & Sastre de Vicente ME. 2005. Removal of inorganic mercury from aqueous solutions by biomass of the marine macroalga *Cystoseira baccata*. *Water Research*, 39: 3199-3210
 - Kim SKW, Lee BS, Wilson DB & Kim EK. 2004. Selective cadmium accumulation using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 109-114
 - Kögel-Knabner I, Guggenberger G, Kleber M, Kandeler E, Kalbitz K & Scheu S. 2008. Organo-mineral associations in temperate soils: Integrating biology, mineralogy, and organic matter chemistry. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171: 61–82
 - Li D & Daler D. 2004. Ocean pollution from land-based sources: East China Sea, China. *Ambio* 33: 107-113

- Linder MC. 2001. Copper and genomic stability in mammals. *Mutation Research*, 475: 141-152
- Linder MC. 1991. *Biochemistry of copper*. Plenum Press, New York, USA.
- Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30: 261-278
- Martínez Arreguín VM, Nuñez RA, Meas Vong Y, Avelar González FJ & Rodríguez Valadez FJ. 2005. Lavado de suelo contaminado con plomo y recuperación electroquímica del Pb. Congreso Interamericano de Residuos, Mérida, Méjico
- <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico2005/martinez.pdf>
- Moutsatsou A, Gregou M, Matsas D & Protonotarios. V. 2006. Washing as a remediation technology applicable in soil heavily polluted by mining-metallurgical activities. *Chemosphere*, 63: 1632-1640.
- Ochiai EI. 1987. *General principles of biochemistry of the elements*. Plenum Press, New York USA: 648 p
- Ochoa-Herrera V, León G, Banihani Q, Field JA & Sierra-Alvarez R. 2011. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Science of the Total Environment*, 413: 380-385
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2003. Guía de Calidad del Agua Potable.
- Pinho GLL & Bianchini A. 2010. Acute copper toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: implications for the development of an estuarine and marine biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29: 1834–1840
- Ravikumar S, Yoo IK, Lee SY & Hong SH. 2011. Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165: 1674-1681

- Reichman SM & Parker DR. 2002. Revisiting the Metal-Binding Chemistry of Nicotianamine and 2-Deoxymugineic Acid. Implications for Iron Nutrition in Strategy II Plants. *Plant Physiology*, 129: 1435-1438
- Rodríguez-Montelongo L, Farías RN & Massa EM. 1995. Sites of electron transfer to membrane-bound copper and hydroperoxide-induced damage in the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323: 19-26
- Rodríguez-Montelongo L, Volentini SI, Farías RN, Massa EM & Rapisarda VA. 2006. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 451: 1–7
- Sauve S, Cook N, Hendershot WH & McBride MB. 1996. Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environmental Pollution*, 94: 153-157
- Soares EV, Hebbelinck K & Soares HM. 2003. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 336-343
- Ulrich B. 1986. Natural and anthropogenic components of soil acidification. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 149: 702-717
- Vieira RH & Volesky B. 2000. Biosorption: a solution to pollution. *International Microbiology*. 3: 17–24
- Vijayaraghavan K & Yun YS. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26: 266-291
- Volentini SI, Ricardo N, Farías RN, Rodríguez-Montelongo L & Rapisarda VA. 2011. Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *Biometals*, 24: 827-835

- Volesky B. 1994. Advances in biosorption of metals: selection of biomass types. *FEMS Microbiology Reviews*, 14: 291-302
- Wallace BJ & Young IG. 1977. Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA- menA-* double quinone mutant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 461: 84-100
- Wong PK, Lam KC & So CM. 1993. Removal and recovery of Cu^{2+} from industrial effluent by immobilized cell of *Pseudomonas putida* II-11. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 127-131
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T & Pilon M. 2007. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 16369-16378
- Zhu B & Alva AK. 1993. Effect of pH on growth and uptake of copper by swingle citrumelo seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 16: 1837-1845