



## TOLERANCIA Y ACUMULACIÓN DE AS EN CULTIVOS DE *RIVULARIA HALOPHILA* AISLADA DE LA LAGUNA NEGRA (CATAMARCA, ARGENTINA)

## TOLERANCE AND ACCUMULATION OF AS IN *RIVULARIA HALOPHILA*'S CULTURE ISOLATED FROM THE LAGUNA NEGRA (CATAMARCA, ARGENTINA)

Soto Rueda, Eliana<sup>1</sup>; Mlewski, Estela Cecilia<sup>1</sup>; Borgnino, Laura<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias de la Tierra (CICTERRA), CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

[eli.soto.2@hotmail.com](mailto:eli.soto.2@hotmail.com)

### Resumen

*Rivularia halophila* es una cianobacteria aislada de sedimentos de la Laguna Negra (Catamarca, Argentina). Las condiciones ambientales que presenta esta laguna hipersalina permiten el crecimiento de microorganismos tolerantes a condiciones extremas y a la presencia de metaloides, como el As. El objetivo de este estudio es evaluar la tolerancia de *R. halophila* a diferentes concentraciones de As (III y V). La tolerancia se determinó por el análisis de dosis-respuesta. Los resultados indican que *R. halophila* tiene una alta resistencia al As, en especial al As (V), con un  $CE_{50}$  de 4921,9 mg/L. Los resultados obtenidos al momento son prometedores en lo que se refiere a su potencial uso en procesos de bio-remoción de As, además de sentar bases en relación a la posible participación de esta cianobacteria en la precipitación de carbonatos en la Laguna Negra y su posterior incorporación de As.

**Palabras clave:** *Rivularia halophila*, Laguna Negra, arsénico.

### Introducción:

La biomineralización es un proceso donde los microorganismos poseen un rol protagónico. Dicho proceso puede clasificarse según esté biológicamente inducido o biológicamente controlado. En éste último caso la actividad microbiana, mediante sus metabolismos, crea directamente las condiciones ambientales para la precipitación de minerales [1]. Los estromatolitos o microbialitos son claros ejemplos de la potencialidad de ciertas comunidades microbiológicas para la precipitación de carbonatos y su posterior litificación. Actualmente existen pocos lugares en el mundo donde se encuentran microbialitos activos; generalmente se encuentran asociados a ambientes extremos, donde la vida está bastante restringida. Un ejemplo es La laguna Negra (LN) (Catamarca, Argentina), un lago hipersalino de altura ubicada en la Puna Argentina [2]. Las condiciones ambientales extremas como alta salinidad, altos niveles de UV, temperaturas extremas, alta concentración de metales y metaloides, incluido el arsénico (As), favorecen el crecimiento de bacterias arqueas y eucariotas unicelulares. La capacidad de dichas bacterias de precipitar carbonatos incentiva su uso en estudios ambientales, como por ejemplo la bio-remoción de metales tóxicos (ej.: As). Específicamente respecto a la incorporación de As en carbonatos inorgánicos (ej.: calcita, travertinos), existe suficiente información que prueba que dicho proceso es posible [3-5]. No ocurre lo mismo con carbonatos de origen biológico

La *Rivularia halophila* es una cianobacteria filamentosa aislada de sedimentos de la LN [6]. La misma forma parte de un consorcio microbiano que puede participar de los procesos de precipitación de carbonatos [7]. Para evaluar su uso en procesos de bio-remediación de As, es necesario primero evaluar la toxicidad del mismo (ej.: análisis dosis-respuesta) frente a *R. halophila*. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar la tolerancia de *R. halophila* a diferentes concentraciones de As (III y V). Los resultados que se obtengan servirán para planear los posteriores estudios de bio-remoción, pero además ayudarán a comprender el comportamiento de esta cianobacteria dentro de la comunidad microbiana en la LN, en relación al As presente en la misma.



## Materiales y métodos

### 1) Análisis químico del agua y de la mata microbiana de la LN.

El agua analizada fue tomada de la misma zona donde se extrajo la mata microbiana en estudio. Para el análisis de la composición química de la mata microbiana las muestras fueron previamente homogeneizadas mediante molienda manual y secadas a 50 °C durante 48 h. La composición química se determinó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y Espectrofotómetro de emisión atómica ICP-OES.

### 2) Condiciones de cultivo y crecimiento de *Rivularia halophila*

Se realizó un seguimiento del crecimiento de *R. halophila* durante varias semanas en el medio BG11-0,36% NaCl. Para evaluar la viabilidad de los cultivos se monitorearon la coloración de las colonias, la formación sustancias exopoliméricas (EPS) y el incremento de la biomasa.

### 3) Análisis de dosis-respuesta

Se utilizó  $129,7 \pm 14,6$  mg de biomasa (peso húmedo) para cada concentración de As evaluada (As (III) como  $\text{NaAsO}_2$  y As (V) como  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Las cianobacterias fueron obtenidas de un cultivo activo (fase estacionaria). El rango de concentración de As utilizado fue: 10 – 10000 mg/L As (V) y 10-1000 mg/L As (III). El experimento duró 25 días, bajo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El crecimiento celular se estimó mediante determinaciones del peso seco, en relación a la respuesta biológica relativa al control (crecimiento sin As) [8].

### 4) As acumulado en la biomasa

La biomasa de *R. halophila* se separó de los medios de cultivo que contenían el As (III o V) y se lavaron con agua MilliQ. Posteriormente se secaron a 60 °C por 12 horas. Se realizó la digestión del material con 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , HCl concentrado y  $\text{HNO}_3$  concentrado, luego se determinó la cantidad de As acumulado en la biomasa por ICP-MS [9].

## Resultados

La composición química del agua y de la mata microbiana se encuentra resumida en las tablas 1 y 2. El agua de la LN presentó un pH de 7,6 y una conductividad de 64,2 mS/cm.

Tabla 1. Composición química del agua de la LN.

As (µg/L)	B (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)	Mg (mg/L)	Mn (mg/L)	Na (mg/L)	S (mg/L)	Si (mg/L)	Sr (mg/L)
63.5	27.6	572	277	329	0.28	4464	110	30.8	12.0

Tabla 2. Composición química de la mata microbiana

Composición Química (%)												Concentración (µg/g)	
FeO <sub>3</sub>	CaO	K <sub>2</sub> O	MgO	MnO	Na <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	AlO <sub>3</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	LOI	Total	As	Sr
0,09	49,28	0,08	0,68	0,7	0,66	<0,01	4,13	0,17	0,03	43,8	99,63	20,7	2300,4

El crecimiento de *R. halophila* en medio BG11-salino ocurre comenzando con una fase de latencia de 5 días seguida de la fase exponencial de 50-55 días. El tiempo de fase estacionario se alcanza después de 55 días de haber puesto la cepa en el medio, y la fase de muerte pasado el día 80 (por el agotamiento de nutrientes) (Figura 1).

Respecto a la sensibilidad frente al As, *R. halophila* mostró una mayor resistencia al As (V) que al As (III) (figura 2). La presencia de As (III) produjo un efecto tóxico más fuerte causando una muerte celular significativa a partir de los 50 mg/L y una inhibición total del crecimiento a 1000 mg/L As (III). A igual concentración de As (V), se obtuvo un 62 % de células viables (tabla 3).

Las diferentes respuestas a As (III) y As (V) mostradas por *R. halophila* se analizaron mediante ensayos cuantitativos de dosis-respuesta en términos de  $\text{CE}_{50}$ . Los resultados indican que *R.*

*halophila* tiene una alta resistencia al As, en especial al As (V), con un CE<sub>50</sub> de 4921,9 mg/L. Para As (III) la resistencia es menor, obteniéndose una CE<sub>50</sub> de 121,9 mg/L.

La figura 3 muestra la relación entre la viabilidad y el As acumulado en la biomasa. Se evidencia un cambio de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de As (III). A partir de 100 mg/L de As (III) cerca del 50% de las cianobacterias permanecen vivas, acumulándose ~1,10 mg de As/ Kg en la biomasa (figura 3a). En la figura 3b se observa como no se ve afectada la viabilidad celular para las seis primeras concentraciones evaluadas, obteniéndose una mayor cantidad de As acumulado en biomasa (0,45 a 16,31 mg/Kg). Se destaca el punto en el que se encuentra el 50% de la viabilidad celular, el cual ocurre con 51,38 mg de As acumulado en biomasa, para una concentración inicial de ~5000 mg/L de As (V).

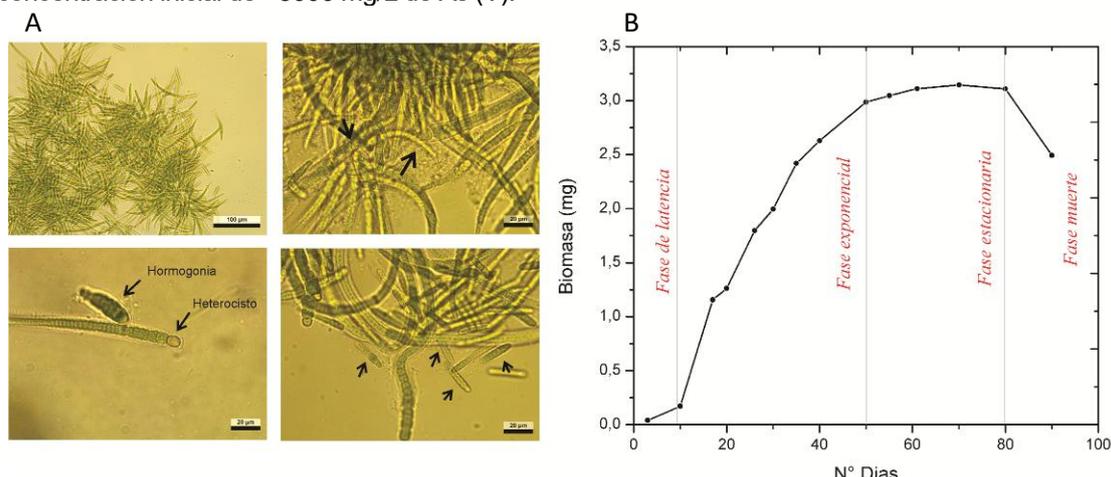


Figura 1. A. Microfotografías de *Rivularia halophila* en medio BG11- salino. B. Curva de crecimiento en medio BG11-salino (peso húmedo (mg) Vs Tiempo (días))

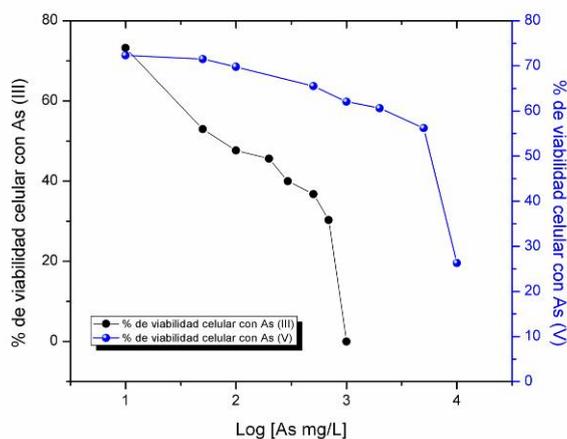


Figura 2. Porcentaje de viabilidad celular (*R. halophila*) en medio con diferentes concentraciones de As (III) y de As (V).

Tabla 3. Porcentaje de Viabilidad celular de *R. halophila* expuesta a diferentes concentraciones de As (III) y As (V) y Concentración de Arsénico acumulado en la biomasa.

As (III) inicial en el medio de cultivo (mg/L)	% de Viabilidad celular	As acumulado en la biomasa (mg/Kg)	As (V) inicial en el medio de cultivo (mg/L)	% de Viabilidad celular	As acumulado en la biomasa (mg/Kg)
10	73,24	0,04	10	72,34	0,45
50	52,96	1,14	50	71,52	0,65
100	47,67	1,10	100	69,79	0,98
200	45,60	1,11	500	65,54	4,82
300	40,00	6,74	1000	62,05	10,53
500	36,77	7,62	2000	60,62	16,31
700	30,31	9,00	5000	56,19	51,38
1000	0,00	7,04	10000	26,3	70,64

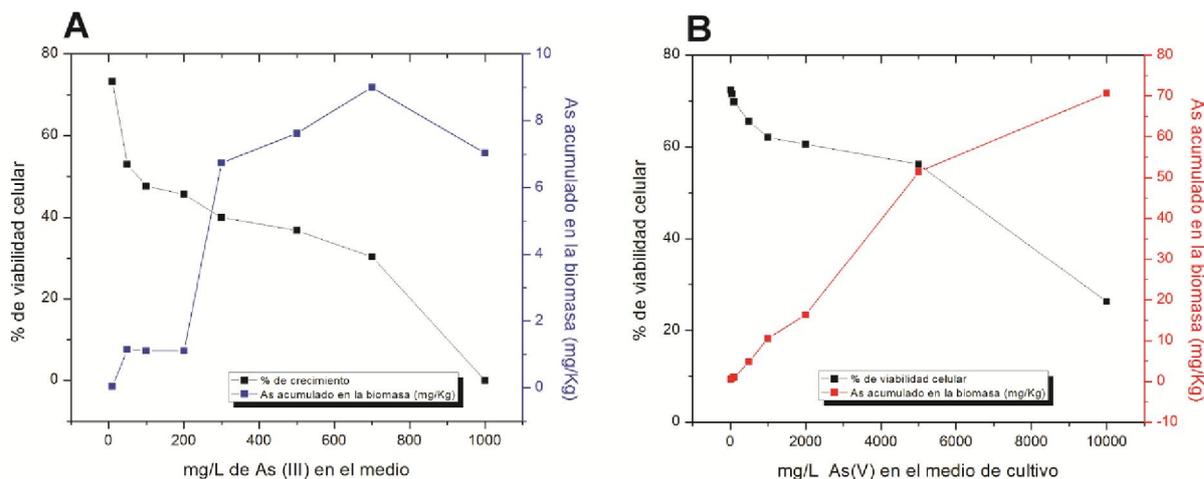


Figura 3. Porcentaje de viabilidad celular de *R. halophila* y arsénico acumulado en la biomasa con respecto a la concentración inicial de As en el medio de cultivo A. As (III) y B. As (V).

### Conclusiones

Los microorganismos presentes en ambientes extremos, como la LN, tienen una enorme potencialidad para ser utilizados en la bio-remoción de contaminantes. Los resultados obtenidos muestran una alta resistencia al As (V y III), principalmente al As (V). Su viabilidad se ve afectada a concentraciones mayores de 5000 mg/L de As (V), logrando acumular en la biomasa 51 mg de As/Kg, sin afectar su viabilidad celular. Estos resultados permiten continuar con los estudios de precipitación de carbonatos inducido por *R. halophila*, en presencia de As (III y V).

### Bibliografía

- [1] Dupraz, C., & Visscher, P. T. 2005. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in microbiology*, 13(9), 429-438.
- [2] Gomez, F. J., Kah, L. C., Bartley, J. K., & Astini, R. A. 2014. Microbialites in a high-altitude andean lake: multiple controls on carbonate precipitation and lamina accretion high-altitude lacustrine microbialites. *Palaos*, 29(6), 233-249.
- [3] Yokoyama, Y., Tanaka, K., & Takahashi, Y. 2012. Differences in the immobilization of arsenite and arsenate by calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 91, 202-219.
- [4] Roman-Ross, G., Cuello, G. J., Turrillas, X., Fernandez-Martinez, A., & Charlet, L. 2006. Arsenite sorption and co-precipitation with calcite. *Chemical geology*, 233(3-4), 328-336.
- [5] Pentecost, A. 2005. *Travertine*. Springer Science & Business Media.
- [6] Shalygin, S., Pietrasiak, N., Gomez, F., Mlewski, C., Gerard, E., & Johansen, J. R. 2018. *Rivularia halophila* sp. nov. (Nostocales, Cyanobacteria): the first species of *Rivularia* described with the modern polyphasic approach. *European Journal of Phycology*, 53(4), 537-548.
- [7] Mlewski, E. C., Pisapia, C., Gomez, F., Lecourt, L., Rueda, E. S., Benzerara, K., & Gérard, E. 2018. Characterization of pustular mats and related rivularia-rich laminations in oncoids from the Laguna Negra lake (Argentina). *Frontiers in microbiology*, 9.
- [8] Ferrari, S. G., Silva, P. G., González, D. M., Navoni, J. A., & Silva, H. J. 2013. Arsenic tolerance of cyanobacterial strains with potential use in biotechnology. *Revista Argentina de microbiología*, 45(3), 174-179.
- [9] Bhattacharya, P., & Pal, R. 2011. Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. *Journal of applied phycology*, 23(2), 293-299.