

# *aisladas de sedimentos enriquecidos con el metaloide*

C. Mellado, C. Badilla, G. Escalante, V.L. Campos, M.A. Mondaca\*

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile, Casilla 160-C

*Arsenic transformation by isolated bacteria from sediments enriched with the metalloid*

*Transformació d'arsènic per bacteris aïllats de sediments enriquits amb el metal·loide*

Recibido: 13 de enero de 2007; revisado: 11 de junio de 2007; aceptado: 24 de octubre de 2007

## RESUMEN

Las bacterias presentes en ambientes contaminados con arsénico son capaces de resistir esta presión ambiental y adaptarse mediante mecanismos de resistencia, lo que involucra, entre otros, la oxidación y/o reducción del metaloide. El objetivo del presente trabajo fue investigar las propiedades redox en bacterias tolerantes a arsénico, aisladas de sedimentos naturales. Los sedimentos se obtuvieron del río Camarones (I región, Chile). Las muestras se incubaron en medio mineral durante 7 días, a temperatura ambiente. Diluciones apropiadas fueron sembradas en agar R2A e incubaron a 25 °C, hasta 7 días. Los niveles de tolerancia para cada metal se determinaron mediante dilución seriada en placa. La propiedad de oxidar o reducir arsénico se investigó mediante nitrato de plata. Los resultados muestran la presencia de bacterias resistentes a arsenito y arseniato, con niveles de tolerancia > 8mM. El 36,84% de las cepas aisladas de sedimentos ricos en arsénico presentaron actividades reductoras (>50%). En cambio, en bacterias aisladas de sedimentos con bajas concentraciones del metaloide, la actividad reductora varió entre un 10% y 25%. Se puede concluir que la presencia de arsénico selecciona bacterias con la capacidad de tolerar concentraciones altas de arsénico a través de la transformación de As(V) en As(III).

**Palabras claves:** Tolerancia a arsénico. Oxidación de arsenito. Reducción de arseniato.

## SUMMARY

The bacteria in environments contaminated with arsenic are affected, surviving those microorganisms that are capable of resisting this environmental pressure and to adapt by means of arsenic-resistance mechanisms: the oxidation and reduction of the metalloid. The aim of the work was to investigate the properties redox in arsenic-tolerant bacteria isolated from natural sediments. The sediments were obtained from Camarones river (I region, Chile). The samples were incubated in mineral media for 7 days, to environment temperature, with agitation. Appropriate dilutions of the samples were sowed in agar R2A and incubated to 25 °C, up to 7 days. The tolerance levels for As(III) and As (V) were determined by dilution plate. The property of As- oxidizing or As-reducing of the selected bacteria was investigated using nitrate of silver. The results show the presence of As- resistant bacteria with tolerance levels to >8mM. We found that 36,84% of the bacteria isolated from arsenic-rich sediments presented arseniate reductase activity bigger than 50%. On the other hand, in bacteria isolated from sediments with low concentrations of the metalloid, arseniate reductase activity change among 10% and 25%. This indicated the arsenic selects bacteria witch tolerated high concentrations of arsenic across the transformation of As(V) en As(III).

**Key word:** Arsenic tolerance. Arsenite oxidation. Arsenate reduction.

\* E-mail: [mmondaca@udec.cl](mailto:mmondaca@udec.cl)

## RESUM

Els bacteris presents en ambients contaminats amb arsènic són capaces de resistir aquesta pressió ambiental i adaptar-se mitjançant mecanismes de resistència, el que involucra, entre d'altres coses, l'oxidació i/o reducció del metal·loide. L'objectiu del present treball és investigar les propietats redox en bacteris tolerants a l'arsènic, aïllades de sediments naturals. Els sediments s'han obtingut al riu Camarones (I regió, Xile). Les mostres s'incuben en medi mineral durant 7 dies, a temperatura ambient. Es sembren dilucions apropiades en agar R2A i s'incuben a 25°C fins a 7 dies. Els nivells de tolerància per a cada metall es determinen mitjançant dilució seriada en placa. La propietat d'oxidar o reduir arsènic s'investiga emprant nitrat de plata. Els resultats mostren la presència de bacteris resistents a arsenit i arseniat, amb nivells de tolerància > 8mM. El 36,84% de les soques aïllades de sediments rics en arsènic presenten activitats reductores (>50%). Per contra, en bacteris aïllats de sediments amb baixes concentracions del metal·loide, l'activitat reductora varia entre un 10% i un 25%. Es pot concloure que la presència d'arsènic selecciona bacteris amb la capacitat de tolerar concentracions altes d'arsènic a través de la transformació d'As(V) en As(III).

**Mots clau:** Tolerància a arsènic. Oxidació d'arsenit. Reducció d'arseniat.

## INTRODUCCION

El arsènic es un metal·loide tòxic que se distribueix extensament, però irregularment a nivell de atmosfera, hidrosfera, sòls, sediments i organismes vius (Cullen & Reimer, 1989). Les fonts naturals d'arsènic ambiental inclouen el volcanisme, la activitat hidrotèrmica i l'erosió de roques sedimentàries i ígneas (Kulp *et al.* 2004). L'acció antropogènica, per la seva part, constitueix una segona font d'arsènic en el medi; mitjançant l'ús de compostos químics agrícoles, com pesticides i herbicides; preservatius per a fusta; materials colorants i residus de la fundició i explotació minera.

En ambients naturals, l'arsènic inorgànic, existeix principalment en dos estats: reduït, sota la forma d'arsenit, com As(III), o oxidat, com [As(V)], en forma d'arseniat. Ambdós estats són tòxics per a la majoria dels organismes. L'arsenit, interfereix amb els grups sulfhidrils dels aminoàcids, podent interrompre la estructura de la proteïna; mentre que l'arseniat, com a anàleg del fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), pot alterar una varietat de processos cel·lulars que impliquen el seu ús (Tamaki & Frankenberger, 1992).

Els microorganismes han desenvolupat diversos mecanismes de resistència i detoxificació per a l'arsènic, dels quals se basen principalment en la reducció i oxidació del metal·loide.

L'objectiu del treball és investigar les propietats redox en bacteris resistents a arsènic, aïllats dels sediments naturals del riu Camarones, I Regió.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron aisladas desde sedimentos provenientes del río Camarones, I región, Chile (19°05' S 70°04' W) e incubadas en medio mineral durante 7 días, a temperatura ambiente, con agitación (Macur *et al.* 2004).

Diluciones apropiadas de las muestras se sembraron en agar R2A y se incubaron a 25 °C hasta 7 días. Para su mantenimiento se prepararon cultivos en medios líquidos y glicerol (50%) y se mantuvieron a -70°C.

### Identificación bacteriana

Las bacterias aisladas se caracterizaron de acuerdo a su afinidad tintorial mediante la tinción de Gram. Los bacilos Gram negativos se identificaron de acuerdo a la presencia de oxidasa y propiedades bioquímicas.

### Niveles de tolerancias a arsénico

Los niveles de tolerancia se determinaron mediante la técnica de dilución seriada en placa (NCCL, 1992). Se utilizó agar Luria adicionado de concentraciones variables de arsenito de sodio o arseniato de sodio, entre 0.1 y 8 mM. Cada una de las placas se inoculó con diluciones apropiadas de cultivos bacterianos de 24 h de incubación. Como control, se inocularon placas con Agar Luria, sin arsénico. Las placas se incubaron a 25 °C durante 24 a 48 h y se observó la presencia de desarrollo bacteriano. (Muller *et al.* 2003).

### Transformaciones redox

Las cepas bacterianas seleccionadas se cultivaron en caldo Luria a 25 °C, hasta obtener una densidad óptica entre 0.4-0.6 a 600 nm. 1 ml del cultivo fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. El pellet fue lavado dos veces con medio mineral y resuspendido en 1 ml del mismo medio. 100 µl de la suspensión se trasapó a un tubo eppendorf con 400 µl de medio mineral (pH 7.0) adicionado con As(III) o As(V), 2mM, respectivamente. Luego de incubar a 25 °C durante 24h se agregó a cada tubo 100 µl de  $\text{AgNO}_3$  0.1 M, preparado al momento de su uso. Los resultados obtenidos fueron comparados con un estándar descrito por Simeonova *et al.* (2004).

## RESULTADOS

En este estudio se aislaron 27 cepas bacterianas seleccionadas desde sedimentos naturales, 8 cepas provenientes de sedimento del río Lauca, utilizadas como control debido a que presentan bajos niveles de arsénico (90-100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y 19 cepas aisladas de sedimento del río Camarones, zona con altas concentraciones del metal·loide (1100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Las cepas bacterianas, provenientes de sedimento del río Lauca, fueron identificadas como bacilos Gram negativos, no fermentadores, oxidasa positivos, pertenecientes al género *Pseudomonas* (100%). Las aisladas de muestra de sedimento del río Camarones, correspondieron a bacilos Gram negativos fermentadores, oxidasa negativo (81%) y no fermentadores, oxidasa positivo (19%). Los fermentadores se identificaron como especies de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Enterobacter* y *Klebsiella*. Los no fermentadores, se identificaron como especies correspondientes al género *Pseudomonas*.

A cada una de las cepas seleccionadas se les determinaron los niveles de tolerancia a arsenito y arseniat. Las cepas bacterianas aisladas del río Lauca, presentaron niveles de tolerancia de 2mM y 4mM para As (III) y As (V), respectivamente (Tabla I), mientras que las aisladas del río Camarones muestran niveles de tolerancia de 6mM y  $\geq 8\text{mM}$ , para As (III) y As (V) respectivamente (Tabla II).

**TABLA I**  
Niveles de tolerancia a arsénico de 8 cepas bacterianas aisladas desde sedimento del río Lauca (I Región, Chile).

| Niveles de tolerancia (mM) |         |       |
|----------------------------|---------|-------|
| Cepas                      | As(III) | As(V) |
| LC1                        | 1.0     | 2.0   |
| LC4                        | 1.0     | 2.0   |
| LC5                        | 1.0     | 2.0   |
| LC6                        | 1.0     | 2.0   |
| LC7                        | 1.0     | 2.0   |
| LC10                       | 1.0     | 2.0   |
| LC11                       | 1.0     | 2.0   |
| LC12                       | 1.0     | 2.0   |

Al estudiar las propiedades oxidantes y/o reductoras de las cepas bacterianas ensayadas, se encontró que las bacterias aisladas del sedimento del río Lauca no presentaron actividades oxidantes y la actividad reductora fue muy bajas, entre 0 y 10% (Tabla III). De 19 bacterias, aisladas del sedimento del río Camarones, sector Illapata, 7 mostraron una actividad reductora parcial, la que varió entre el 50 y 75% y 12 cepas presentaron una débil actividad reductora, entre 10 y 25% (Tabla IV).

**TABLA II**  
Niveles de tolerancia de 19 cepas bacterianas aisladas desde sedimentos del río Camarones ( I Región ).

| Niveles Tolerancia (mM) |         |       | Niveles Tolerancia (mM) |         |       |
|-------------------------|---------|-------|-------------------------|---------|-------|
| Cepas                   | As(III) | As(V) | Cepas                   | As(III) | As(V) |
| IA1                     | >8.0    | >8.0  | IA12                    | >8.0    | >8.0  |
| IA2                     | >8.0    | >8.0  | HA1                     | >8.0    | >8.0  |
| IA3                     | >8.0    | >8.0  | HA2                     | >8.0    | >8.0  |
| IA4                     | >8.0    | >8.0  | HA3                     | 6.0     | >8.0  |
| IA5                     | >8.0    | >8.0  | HA5                     | 4.0     | >8.0  |
| IA6                     | >8.0    | >8.0  | HA7                     | 6.0     | >8.0  |
| IA8                     | 6.0     | >8.0  | HA8                     | 6.0     | >8.0  |
| IA9                     | >8.0    | >8.0  | HA10                    | 4.0     | >8.0  |
| IA10                    | 6.0     | >8.0  | HA11                    | >8.0    | >8.0  |
| A11                     | 6.0     | >8.0  |                         |         |       |

**TABLA III**  
Detección de actividad arsenito-oxidante y arseniato-reductora de bacilos Gram negativos aislados de sedimento del río Lauca, I región, Chile.

| Numero de cepas arsenito oxidante      | 0-10                           | 10-25 | 25-50 | 50-75 | 75-90 | 90-100 |
|--|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
|  | Incubación<br>Con As(III)<br>8 | +     |       |       |       |        |
| Numero de cepas<br>Arseniato reductasa | 0-10                           | 10-25 | 25-50 | 50-75 | 75-90 | 90-100 |
|  | Incubación con As(V)<br>4      | +     |       |       |       |        |
| 4                                      |                                | +     |       |       |       |        |

**TABLA IV**

**Detección de actividad arsenito-oxidante y arseniato-reductora de bacilos Gram negativos aislados de sedimento del río Camarones, I región, Chile.**

| Numero de cepas arsenito oxidante      |      |       |       |       |       |        |
|--|------|-------|-------|-------|-------|--------|
|  | 0-10 | 10-25 | 25-50 | 50-75 | 75-90 | 90-100 |
| Incubación<br>Con As(III)<br>19        | +    |       |       |       |       |        |
| Numero de cepas<br>Arseniato reductasa |      |       |       |       |       |        |
|  | 0-10 | 10-25 | 25-50 | 50-75 | 75-90 | 90-100 |
| Incubación con As(V)<br>1              | +    |       |       |       | +     |        |
| 6                                      |      |       |       | +     |       |        |
| 8                                      |      | +     |       |       |       |        |
| 4                                      | +    | +     |       |       |       |        |

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que, los niveles de tolerancia a arsénico de las bacterias aisladas de muestras de sedimentos del río Camarones, en comparación, con los niveles de tolerancia de bacterias aisladas desde sedimentos del río Lauca son mayores ( $\geq 8\text{mM}$ ). Las bacterias aisladas de sedimento del río Lauca, serían sensibles al arsénico, en cambio las aisladas de sedimento del río camarones serían resistentes a arsénico, de acuerdo al criterio utilizado por Saltikov y Olson (2002). Estos resultados están de acuerdo con lo informado por otros autores, donde se demuestra que la presencia del metaloide selecciona bacterias resistentes (Muller *et al.* 2003). En este caso el arsénico estaría ejerciendo una presión selectiva, lo que implica la expresión de genes de resistencia que permiten transformar el metal y de esta manera pueden sobrevivir las bacterias más resistentes (Oremland & Stolz, 2003).

La mayoría de las bacterias fue identificada como bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. La aparente ubicuidad de bacterias entéricas, As(V) resistentes, sugiere que la resistencia fisiológica puede jugar un rol significativo en el fenotipo observado (Saltikov and Olson, 2002).

Los mecanismos de resistencia para arsénico, descritos en bacterias Gram negativas, involucran la oxidación y/o reducción (propiedades redox) del metaloide (Jackson y col. 2003). Al investigar las propiedades redox, se encontró que el 36.84% de las bacterias aisladas de sedimentos ricos en arsénico, presentaron actividad reductora. En cambio, en las bacterias aisladas de sedimentos, con bajas concentraciones de arsénico, no se detectaron actividades oxidantes ni reductoras, lo que indicaría que probablemente estas bacterias podrían presentar otros mecanismos de resistencia (Silver & Phung, 2005). Como el As(V) es estructuralmente similar al fosfato, en *E.coli* el As(V) es captado a través del sistema transportador de fosfato (Willisky and Malamy, 1980). En bacterias Gram negativas, el sistema *ars*, reduce a As(III) el As(v) intracelular. El As(III) es bombeado fuera de la célula por la bomba unida a membrana *ArsAB*. Alternativamente, fisiológicamente aumenta el As(V) como resultado de una disminución en la regu-

lación del sistema de transporte de fosfato (pit), produciéndose una disminución en la captación de As(V) y por ende una insensibilidad a la toxicidad del As(V) (Saltikov and Olson, 2002).

Diversos autores señalan que en sedimentos anóxicos, suelos y sistemas acuáticos subsuperficiales, la reducción de As(V) es uno de los procesos de resistencia más importante para los microorganismos. En el caso de ambientes ricos en arsénico, la reducción del arseniato, puede representar un aceptor terminal de electrones para la mineralización de carbono orgánico (Oremland *et al.*, 2000).

Niggemyer *et al.* (2001), informaron que en bacterias, aisladas de sedimentos ricos en arsénico, predominaban aquellas cepas bacterianas con capacidad de relacionar el crecimiento con la reducción de As(V) a As(III). Por el contrario, la oxidación de As(III) a As(V), genera la mitad de la energía producida por la oxidación de lactato en la reducción de arseniato, de manera que un grupo reducido de bacterias utilizarían este mecanismo para favorecer su crecimiento.

Esto explicaría el hallazgo de un mayor número de cepas bacterianas reductoras en los sedimentos del río Camarones. Las propiedades redox que presentan las bacterias, tienen relación con la detoxificación del metaloide y probablemente estarían jugando un rol en la especiación química del arsénico en el ambiente.

## CONCLUSIONES

La presencia de arsénico selecciona bacterias con la capacidad de tolerar concentraciones altas de arsénico a través de la transformación de As (V) en As (III). La capacidad de estas bacterias, de oxidar o reducir arsénico, es un proceso de detoxificación potencialmente útil para la descontaminación de aguas residuales y otros desechos contaminados con arsénico.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el proyecto Fondecyt 1050088 y proyecto DIUC 204.036.027-1.0

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmann, D.; Roberts, A.; Krumholz, L.; and Morel F. M.: «Microbe grows by reducing arsenic». *Nature*. **371**, 750-750 (1994).
- Anderson, L.; Williams, J. and Hille R.: «The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase». *J. Biol. Chem.* **267**, 23674-23682 (1992).
- Cullen, W. and Reimer K.: «Arsenic speciation in the environment». *Chem. Rev.* **89**, 713-764 (1989).
- Ehrlich, H. L.: «Bacterial oxidation of As(III) compounds», in: W. T. Frankenberger Jr (Ed), *Environmental Chemistry of Arsenic*, Marcel Dekker, New York. pp. 313-327 (2002).
- Ellis, P.; Conrads, T.; Hille, R.; and Kuhn P.: «Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 and 2.03 Å». *Structure*. **9**, 125-132. (2001).
- Ferguson, J. and Gavis J.: «A review of the arsenic cycle in natural waters». *Wat Res.* **6**: 1259-1274. (1972).
- Jackson, C.; Jackson E.; Dugas, S.; Gamble, K. and Williams S.: «Microbial transformations of arsenite and arsenate in natural environments». *Recent Research Developments in Microbiology*. **7**: 103-118. (2003).
- Kulp, T.; Hoefft, S. and Oremland, R.: «Redox Transformations of Arsenic Oxyanions in Periphyton Communities». *Appl Environ Microbiol.* **70**, 6428-6434. (2004).
- Macur, R.; Jackson, C.; Botero, L.; McDermott, T. and Inskeep W.: «Bacterial Populations Associated with the Oxidation and Reduction of Arsenic in an Unsaturated Soil». *Environ Sc. Technol. environ.* **38**, 104-111 (2004).
- Mansilla, H. D.; Comejo, L.; Lara, F.; Yañez, J.; Lizama, C. & L. Figueroa. 2002: «Manual de Remoción de Arsénico por Oxidación Solar, Capítulo 2: Remoción de Arsénico de Aguas del río Camarones», Arica, Chile. AICD, OEA.
- Muller, D.; Lièvreumont, D.; Simeonova, D.; Hubert, J.C. & M.C Lett. 2003: «Arsenite Oxidase aox Genes from a Metal-Resistant  $\beta$ -Proteobacterium». *Journal. Bacteriology*. **185**: 135-141.
- Oremland, R. S. & J. F. Stolz. 2003: «The Ecology of Arsenic». *Science* **300(5621)**: 939-44.
- Roberto, F.; Barnes, J. & D. Bruhn. 2002: «Evaluation of a GFP Reporter Gene Construct for Environmental Arsenic Detection». **58**:181-188.
- Romero L.; Alonso H.; Espinoza S.; Campano P.; Fanfani L.; Cidu R.; Lorrain M.; Lopez L. & R.E. Ferreyra. 2001: «Arsenic and boron contamination in the Loa basin (northern Chile)». Proceedings WRI-10, Cidu (ed.), *Balkema Publishers-The Netherlands*. 1127-1130.
- Smith, A.H.; Goycololea, M.; Haque, R. & M. L. Biggs. 1998: «Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water». *American Journal of Epidemiology*. **147**: 660-669.
- Simon, S. & L. Phung. 2005: «Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic». *Applied and Environmental Microbiology*. **71(2)**: 599-608.
- Simeonova, D.D.; Lievreumont, D.; Lagarde, F.; Muller, D.A.; Groudeva, V.I. & M. C. Lett . 2004: «Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria». *FEMS Microbiol Letters*. **237(2)**: 249-53.
- Tamaki, S. & W. T. Jr. Frankenberger. 1992: «Environmental Biochemistry of Arsenic». *Review Environmental Contamination and Toxicology*. **124**: 79-110.
- Welch, A.H.; Westjohn, D.B.; Helsel, D.R. and R.B. Wanty. 2000: «Arsenic in ground water of the United States: Occurrence and geochemistry». *Ground Water*. **38(4)**, 589pp.