

## FORMULÁRIO DE INSCRIÇÃO, APRESENTAÇÃO DE RESUMO E TRABALHO COMPLETO

<b>Universidade:</b>	UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
<b>Faculdade/Centro/Instituto:</b>	PROIMI-CONICET
<b>Autor/es:</b>	SIMON SOLA, M. ZOLEICA(autor); ALVAREZ, ANALIA(director)
<b>Título do trabalho:</b>	Aislamiento y evaluación de microorganismos para su uso en procesos de fitorremediación de suelos co-contaminados con Cr(VI) y lindano: Un prospecto muy alentador
<b>Núcleo Disciplinario / <u>Comité Académico</u> / Outros temas:</b>	24. Medio Ambiente
<b>Email:</b>	<a href="mailto:zoleicas@hotmail.com">zoleicas@hotmail.com</a>
<b>Palabras claves (Máximo 3):</b>	ACTINOBACTERIAS-CROMO(VI)-PGPB
Tem interessem em fazer apresentação oral do seu trabalho? (X)SIM ( )NAO	
*Esta preferência está sujeita a alteração em função da disponibilidade.	

### Introdução

La contaminación ambiental con Cr(VI) ha sido detectada en una gran variedad de sitios debido a sus usos múltiples (curtiembres, textiles, metalúrgicas). Una de las posibles estrategias para tratar estos ambientes es la fitorremediación la cual comprende el uso de la vegetación y sus microorganismos asociados para el saneamiento de sitios contaminados. Debido a la sinergia propia de la asociación planta-bacteria, estas últimas pueden a su vez generar condiciones propicias para el establecimiento y desarrollo de plantas que crecen bajo condiciones de estrés, además de presentar muchas de ellas capacidad de remover plaguicidas organoclorados y/o metales pesados, en combinación con tales especies vegetales.

### Objetivos

Aislar actinobacterias desde suelo, rizósfera y especies vegetales desarrolladas naturalmente en sitios contaminados, y evaluar la remoción de Cr(VI), y las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de dichos microorganismos.

### Material e Métodos

Se realizó el aislamiento de microorganismos provenientes de muestras de suelo y de plantas recolectadas desde un sitio contaminado. Se evaluó la tolerancia a Cr(VI) y lindano en medio sólido complejo. Se evaluó la capacidad de remoción de Cr(VI), de las cepas seleccionadas en un medio mínimo (5 g L<sup>-1</sup> glucosa - asparagina), adicionado con 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Al cabo de 7 días se determinó Cr(VI) residual. Se empleó como control positivo la cepa *Streptomyces* sp. M7. Se evaluó cualitativamente propiedades promotoras del crecimiento vegetal (producción de sideróforos y solubilización de fosfato) en las cepas seleccionadas previamente.

### Resultados e Discussão

Se aislaron 57 cepas y posteriormente seleccionaron 5 con características compatibles a las de actinobacterias y que presentaron tolerancia a Cr(VI) y lindano en un medio de cultivo complejo. Se observó remoción de Cr(VI) en MM líquido, en valores comprendidos entre 30 ± 4,25% y 52 ± 5,6% con los diferentes microorganismos seleccionados y la cepa control.

Se determinó que dos microorganismos solubilizaban fosfato y una cepa producía sideróforos, en las condiciones de cultivo ensayadas.

### Conclusões

Estos resultados constituyen un aporte fundamental para futuros experimentos de fitorremediación, en los que se combinen actinobacterias con plantas tolerante como el maiz, para el tratamiento de suelos contaminados con Cr(VI).

### Agradecimientos

Agradecemos al Sr. Guillermo Borchia y a la Sra. Liliana Colombres por su asistencia técnica.

## **Aislamiento y evaluación de microorganismos para su uso en procesos de fitorremediación de suelos co-contaminados con Cr(VI) y lindano: Un prospecto muy alentador**

### **Introdução**

La fitorremediación comprende el uso de la vegetación y sus microorganismos asociados para el saneamiento de sitios contaminados<sup>1</sup>, la cual adquiere importancia al analizar la problemática actual acerca de la contaminación de vastas extensiones de suelos y sedimentos de todo el mundo. Por su parte, la contaminación con metales pesados es una problemática de larga data en nuestro país, particularmente el Cr(VI), tiene un gran número de aplicaciones en diversas, por lo que este metal ha sido detectado en las inmediaciones de numerosos sitios industrializados de la Argentina<sup>2</sup>.

Se caracteriza por ser aproximadamente 1.000 veces más tóxico y mutagénico que el Cr(III) por su mayor solubilidad en agua, difusión a través de las membranas biológicas e interacción con proteínas intracelulares y ácidos nucleicos. Nuestro grupo de trabajo desarrolla desde el año 1999 una línea de investigación sobre degradación de plaguicidas organoclorados (POs) y remoción de metales pesados por actinobacterias. El género *Streptomyces* desempeña una función esencial en biorremediación, ya que debido a su versatilidad metabólica, pueden crecer en suelos sometidos a contaminación múltiple<sup>3</sup>.

En materia de aplicación de microorganismos en procesos de fitorremediación, el prospecto es muy alentador, debido a la sinergia propia de la asociación planta-bacteria, estas últimas pueden generar condiciones propicias para el establecimiento y desarrollo de plantas que crecen bajo condiciones de estrés como las que se generan durante la acumulación de contaminantes. Algunas de las propiedades deseables en tales bacterias son: producción de fitohormonas, estimulación de la producción de enzimas vegetales involucradas en el metabolismo del etileno, estimulación de la liberación de nutrientes esenciales para las plantas o inducción de mecanismos de defensa vegetal<sup>4</sup>.

En este sentido, el estudio de actinobacterias con capacidad de remover POs y/o metales pesados, en combinación con especies vegetales con la misma propiedad, se presenta como una alternativa atractiva potencialmente aplicable para el saneamiento de sistemas sometidos a contaminación múltiple.

### **Objetivos**

Aislar actinobacterias desde suelo, rizósfera y especies vegetales desarrolladas naturalmente en sitios contaminados y evaluar la remoción Cr(VI) y las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de los microorganismos seleccionados.

### **Material e Métodos**

## **1 Aislamiento de actinobacterias desde suelo, rizósfera y especies vegetales desarrolladas naturalmente en sitios contaminados y evaluación de la remoción Cr(VI) por dichos microorganismos**

### **1.1 Toma de muestras y análisis de las mismas**

Las muestras de suelo, rizósfera y especies vegetales se colectaron en la localidad de Argentina (Santiago del Estero), en el sitio donde fue localizado el depósito clandestino de POs y metales pesados.

Con el objetivo de detectar los niveles de contaminación, se investigó acerca de la presencia de POs y metales pesados en las muestras de suelo, mediante GC- $\mu$ ECD (Cromatografía Gaseosa con Microcaptura de Electrones) y mediante ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo), respectivamente.

### **1.2 Aislamiento de actinobacterias de las muestras**

Cada muestra, fue asépticamente colectada en tubos estériles y mantenidas a 5°C hasta peso constante. Las muestras de suelo y rizósfera fueron diluidas con una solución estéril de hexametáfosfato de sodio, previamente a la inoculación en las placas para el aislamiento. Con respecto a las especies vegetales, fueron previamente esterilizadas superficialmente.

El aislamiento de microorganismos se llevó a cabo en placas con medio Caseína Almidón Agar (CAA), suplementado con una concentración final de 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ácido nalidíxico y cicloheximida para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y hongos, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 30° C y las colonias fueron purificadas sin la adición de antibióticos, mediante trasplantes periódicos en medio CAA. Se aislaron las colonias seleccionándolas según su morfología, color y presencia de pigmentos difusibles, según el Manual de Bergey.

### **1.3 Selección de microorganismos tolerantes al Cr(VI) y lindano (POs)**

Con el fin de evaluar la tolerancia al Cr(VI) de los microorganismos aislados con características aparentes a actinobacterias, se realizó un ensayo cualitativo, usando placas con medio mínimo (MM) agarizado. Canales rectangulares se cortaron en el centro de la placa y luego se llenaron con una solución de Cr(VI) de 250 mg L<sup>-1</sup> y una solución de lindano de 250  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Los microorganismos fueron sembrados de manera transversal al canal. Las placas fueron incubadas a 30° C durante 7 días. El crecimiento microbiano fue utilizado como un parámetro cualitativo de tolerancia a ambos contaminantes. Muestras controles para el crecimiento fueron realizadas usando un medio sin la adición de tóxicos.

#### 1.4 Selección de microorganismos capaces de remover Cr(VI)

Suspensiones de esporos de los microorganismos previamente seleccionados fueron inoculados en medio mínimo (MM) líquido (5 g L<sup>-1</sup> glucosa, 0,5 g L<sup>-1</sup> asparagina y sales). Una solución de Cr(VI) fue adicionada asépticamente al MM a una concentración final de 25 mg L<sup>-1</sup>. Todos los cultivos fueron incubados en un incubador rotatorio (180 rpm), a 30° C, durante 7 días. Se realizaron controles sin la adición de Cr(VI). Se realizó un control abiótico y un control positivo utilizando la cepa *Streptomyces sp.* M7 previamente aislada y caracterizada en el grupo de trabajo.

El sobrenadante de los cultivos centrifugados (9000 x g, 10min, 4° C), fue usado para determinar concentración de Cr(VI) residual, colorimétricamente por reacción con 1,5-difenilcarbazida (DFC) en solución ácida. La lectura se realizó en un Espectrofotómetro Lector de Microplacas (ELISA reader) a 540 nm.

La biomasa microbiana fue estimada por lavado del pellet con agua destilada y secado hasta peso constante a 105° C.

#### 2 Evaluación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)

Se estudiaron propiedades características de PGPB en los microorganismos seleccionados y de *Streptomyces sp.* M7.

##### 2.1 Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos

La producción de sideróforos se observó por el cambio de color del medio agar CAS de verde azulado a naranja, lo que produjo la formación de un halo claro alrededor de cada una de las colonias.

Para la preparación del colorante CAS, se realizó una solución A: 0,03025 g del colorante CAS fue disuelto en agua destilada (pH 7). Posteriormente se agregó FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0,1mM, y se adicionó KOH 10% para adquirir el color verde azulado (pasos intermedios con cambios de color). Se realizó además una solución B conteniendo CTAB (detergente), finalmente se agregó la solución A a la solución B. La mezcla (color verde azulado) se esterilizó a vapor fluente durante 20 minutos.

Se preparó MM agarizado con el agregado de PIPES, sin la adición de la fuente de hierro, y se esterilizó en autoclave (1 atm 15 min, 120° C), finalmente el MM fue suplementado con el colorante CAS. Cultivos de los microorganismos seleccionados (20µl) fueron inoculadas en placas de medio MM agar CAS e incubadas a 30° C, durante 7 días.

Se realizó un control positivo con la cepa *A. brasilense*. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa.

##### 2.2 Evaluación de la producción de solubilizadores de fosfato

Cultivos de los microorganismos seleccionados (20µl) fueron inoculadas en MM agar suplementado con fosfato tricálcico (5g L<sup>-1</sup>) e incubados a 30° C, durante 7 días. La visualización de un halo claro

alrededor de las colonias fue indicativa de la solubilización de fosfato.

### Resultados e Discussão

#### 1.1 Toma de muestras y análisis de las mismas

Los metales pesados encontrados en las muestras de suelo, se muestran en la Tabla 1

El Cr (VI) se encontró presente en concentraciones varias veces superiores a las permitidas según los Niveles Guías de Calidad para Cr(VI) en todas muestras de suelo colectadas.

Plaguicidas organoclorados también fueron detectados (datos no mostrados).

	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D
Li	Muestra ug/g	Muestra ug/g	Muestra ug/g	Muestra ug/g
Mg	43,812	33,506	52,661	42,119
Al	1107,421	607,23	1616,22	674,993
P	5135,499	84793,018	4247,75	84403,543
Mn	727,713	698,989	734,899	684,696
Co	11,587	11,365	10,17	10,705
Ni	1,192	17,34	17,087	15,43
Cu	28,785	34,245	31,42	26,736
Zn	71,94	74,978	70,639	67,599
Se	-5,724	-12,861	-9,545	-22,483
Sr	224,081	192,069	125,173	180,53
Cd	0,06	0,167	0,294	0,018
Sb	-441,045	-1474,035	-863,64	-462,184
Ba	685,093	580,602	302,167	466,253
Hg	0,561	0,474	0,679	0,755
Tl	5,496	10,08	7,338	5,099
Pb	9,982	20,586	14,081	9,412
U	3,11	3,159	4,237	3,167
V	75,655	72,512	59,509	67,389
Cr	33,338	33,34	31,562	31,119
Fe	23456,38	28116,16	20518,295	22505,344
As	8,671	8,125	6,232	8,442
Sn	115,682	190,728	129,573	94,316
Ti	8559,06	7771,515	6895,058	7775,869

**Tabla 1** Metales detectados en muestras de suelo provenientes del sitio donde se detectó el depósito clandestino de POs y metales pesados en Argentina (Localidad de Santiago del Estero)

#### 1.2 Aislamiento de actinobacterias de las muestras

Se aislaron 57 microorganismos a partir de las muestras colectadas del sitio contaminado, con características típicas de actinobacterias tales como micelio vegetativo y en algunos casos micelio aéreo y formación de esporas.

#### 1.3 Selección de microorganismos tolerantes al Cr(VI) y lindano

La evaluación cualitativa del crecimiento en presencia de 250 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y 250 µg L<sup>-1</sup> de lindano fue llevada a cabo comparando el crecimiento en presencia y ausencia de los contaminantes.

De los 57 microorganismos aislados, 5 de ellos mostraron similar crecimiento a aquel observado en los controles no contaminados. Las colonias seleccionadas fueron designadas: cepa F e I (suelo), cepa 38 y 2 (rizósfera) y cepa II (especies vegetales).

Estos resultados indican que las concentraciones usadas no fueron inhibitorias para el crecimiento de 5 microorganismos aislados bajo las condiciones ensayadas. Las concentraciones de los contaminantes fueron seleccionadas en base a estudios previos, teniendo en cuenta las normas

internacionales para los niveles permitidos en suelo ( $9 \mu\text{g kg}^{-1}$  para Cr (VI)), con el fin de asegurar que los microorganismos seleccionados presenten una alta tolerancia a la toxicidad de los contaminantes ensayados.

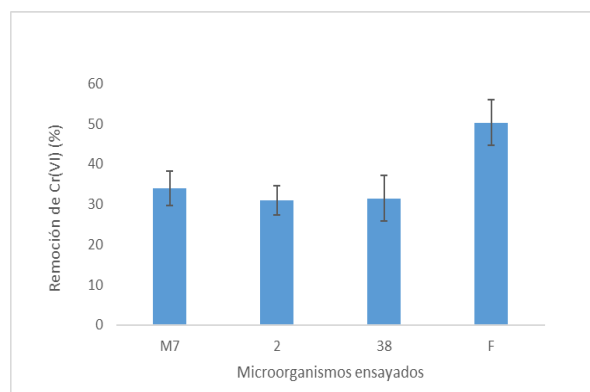
Cabe resaltar además que en primera instancia se realizó el ensayo con cada uno de los contaminantes de manera individual, observándose que aquellos microorganismos capaces de tolerar Cr(VI), también lo hacían en presencia del lindano (datos no mostrados)

La degradación de los contaminantes orgánicos por microorganismos corresponde generalmente a un sistema inducible. Sin embargo en ambientes co-contaminados, la presencia de metales pesados inhibe los metabolismos de degradación, por lo tanto es necesario evaluar la toxicidad de ambos contaminantes en combinación, con el fin de seleccionar los microorganismos más favorables para los procesos de biorremediación.

#### 1.4 Selección de microorganismos capaces de crecer en presencia de Cr (VI)

Se determinó la capacidad de remover Cr(VI) de las cepas 2, F y 38, las cuales presentan formación de esporos. El crecimiento de los microorganismos seleccionados con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) fue determinado en un MM líquido. Dos criterios fueron analizados (biomasa y Cr(VI) residual): el primero fue medido para establecer el comportamiento de la población microbiana y el segundo para determinar remoción del metal pesado.

La biomasa en presencia de Cr(VI) varió entre  $0,46 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$  y  $0,66 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ , sin mostrar inhibición del crecimiento microbiano respecto al control sin contaminante para los microorganismos ensayados. Los valores residuales de Cr(VI) estuvieron comprendidos entre  $12,58 \text{ mg L}^{-1}$  y  $17,47 \text{ mg L}^{-1}$ . Todas las cepas evaluadas fueron capaces de remover Cr(VI). La mayor remoción correspondió a la cepa F rizósferica (50%) Gráfica 1. La remoción de Cr(VI) en el control abiótico fue de un 2%.



**Gráfica 1** Remoción de Cr(VI) en un MM adicionado con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI)

Los procesos por los cuales los microorganismos interactúan con los metales pesados pueden ser biosorción, bioacumulación y reducción enzimática. El ensayo cuantitativo de resistencia fue realizado en MM, porque el metal suplementado no forma

complejos con los componentes del medio y todo el metal adicionado esta biodisponible.

Se reportaron estudios donde se demuestra que la reducción microbiana de Cr(VI) se vio incrementada con medios más nutritivos, por lo que se puede inferir que los porcentajes de remoción podrían verse incrementados en presencia de una mayor concentración de glucosa o bien en futuros ensayos con lindano, que podría ser utilizado como fuente de carbono.

#### 2. Evaluación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal

Se evaluó cualitativamente la producción de sideróforos y solubilizadores de fosfato de los cinco microorganismos previamente seleccionados: cepa F e I (suelo), cepa 38 y 2 (rizósfera) y cepa II (especies vegetales) como así también de *Streptomyces sp.* M7.

La producción se consideró positiva (+) o negativa (-) dependiendo de la aparición del correspondiente halo, como consecuencia del cambio de color del medio agar CAS de verde azulado a naranja en el caso de producción de sideróforos, o por la solubilización de fosfato. En la tabla 2 se muestra los resultados obtenidos

Cepa	F	I	2	38	II	M7
Producción de sideróforos	-	-	-	+	-	-
Producción de solubilizadores de fosfato	-	-	-	+	-	+

**Tabla 2** Evaluación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

#### Conclusiones

Se realizó el aislamiento de microorganismos provenientes de muestras de suelo y de plantas recolectadas desde un sitio contaminado (localidad de Argentina, Santiago del Estero). Se aislaron 57 microorganismos con características compatibles a las de actinobacterias. Solo 5 cepas bacterianas fueron seleccionadas por presentar capacidad de tolerancia a Cr(VI) y lindano en un medio de cultivo complejo.

Se evaluó la capacidad de remoción de Cr(VI), cultivando 3 de las cepas seleccionadas en un medio mínimo líquido ( $5 \text{ g L}^{-1}$  glucosa y asparagina), adicionado con  $25 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI). Se empleó como control positivo la cepa *Streptomyces sp.* M7. En todos los casos, se observó remoción de Cr(VI), siendo esta significativamente mayor por la cepa de suelo F, sin inhibición del crecimiento microbiano con respecto a sus respectivos controles bióticos.

Se evaluaron algunas propiedades promotoras del crecimiento vegetal (producción de sideróforos y solubilización de fosfato) en las 5 cepas seleccionadas previamente. Se determinó que dos solubilizaban fosfato y una producía sideróforos, en las condiciones de cultivo ensayadas.

- <sup>1</sup> Schwitzguébel J.; Kumpiene J.; Comino E. & Vanek T. (2009). *Agrochimica*, Vol. LIII – N°7
- <sup>2</sup> Nie M., Xian N., Fu X., Chen X. & Li B. (2010). The interactive effects of petroleum-hydrocarbon spillage and plant rhizosphere on concentrations and distribution of heavy metals in sediments in the Yellow River Delta, China. *Journal of Hazardous Materials*, 174(1): 156-161.
- <sup>3</sup> Polti M.A., Atjián M.C., Amoroso M.J. Abate CM (2011). Soil chromium bioremediation: Synergic activity of actinobacteria and plants. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65: 1175-1181
- <sup>4</sup> Dhal B., Thatoi H.N., Das N.N., Pandey B.D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 250-251, 272-291