

EVALUACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN DEL ARSÉNICO CON CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE RELAVES MINEROS, EN EL CANTÓN PONCE ENRÍQUEZ, ECUADOR.

Anabell Duque-Sarango¹, Yolanda Díaz - Heredia¹,* Gerardo Medina-Ramírez¹

¹Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas.
anabellduque@hotmail.com. ydiaz@esPOCH.edu.ec. medinag47@gmail.com.

R esumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la transformación del arsénico utilizando bacterianas aisladas de relaves mineros del cantón Ponce Enríquez en la provincia del Azuay. A partir de muestras de relaves, se aislaron 47 clones bacterianos que fueron sometidos a pruebas de resistencia al arsénico, para lo cual se usó como medio de cultivo Agar extracto de levadura-glucosa-oxitetraciclina (OGYE) suplementado con arsenito y arsenato a diferentes concentraciones. La capacidad de oxidación o reducción de arsénico fue evaluada mediante pruebas cualitativas con nitrato de plata. La caracterización se realizó mediante el sistema de pruebas bioquímicas MICROGEN MID 64 y MID 65. Se obtuvo 8 cepas que resistieron concentraciones de 30 mM de arsenito y arsenato, las cuales se identificaron como bacilos Gram negativos de los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella*. El 100% de las bacterias identificadas fueron capaces de reducir el arsenato a arsenito en un período de 5 días. Se concluyó que las bacterias aisladas son extremotolerantes debido a su crecimiento en un medio con altos niveles de arsénico, que además pueden reducirlo como un mecanismo de detoxificación.

Palabras claves: Transformación del arsénico, Aislamiento de bacterias, Arsenito, Arsenato.

A bstract

The aim of this study was to assess transformation of arsenic with bacterial strains isolates from mine tailings at Ponce Enriquez Canton in Azuay province, Ecuador. From tailings samples 47 bacterial strains were isolated and tested for resistance arsenic, for which it was used as culture medium Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar (OGYE) adding arsenic and arsenate in different concentrations. Oxidation capacity or reduction of arsenic was assessed by qualitative test with silver nitrate. The description was performed using biochemical test system with 64 and 65 Microgen identification (MID). It was obtained 8 strains that resisted 30mM of arsenic and arsenate concentrations, these were identified as a gram negative bacillus from *Pseudomonas*, *Pasteurella* and *Vibrio*. The 100% of bacteria were able to reduce arsenate to arsenite in a period of 5 days. It concluded that isolated bacteria are extremotolerant due to its growth on a medium containing high levels of arsenic, which can also reduce as a detoxification process.

Keywords: Transformation of arsenic, Isolation of bacteria, Arsenite, Arsenato

INTRODUCCIÓN

La minería es una actividad que ha causado impactos negativos a nivel global, debido a las emisiones contaminantes que alteran ecosistemas terrestres, acuáticos, aéreos, y producen afectaciones en

la salud humana. En el sur de Ecuador se ubica el cantón Ponce Enríquez de la provincia del Azuay, en el cual existe un alto número de compañías mineras que operan permanentemente en la extracción de oro y plata. La principal fuente de contaminación en la actividad minera son los relaves, una mezcla tóxica de rocas, tierra, agua, minerales y sustancias químicas, que constituyen un subproducto de procesos mineros, usualmente se componen de un 50 % de agua (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006).

El arsénico es un metaloide que puede llegar al agua mediante procesos naturales asociados a la composición geológica del suelo (Manahan, 2007), en algunos países como Argentina, India, Taiwán y Vietnam las altas concentraciones de arsénico en el agua se deben a la presencia natural del metal. Mientras que en países como Chile, México y China la contaminación es causada por actividades antropogénicas como la minería y la quema de carbón (Ahumada, 2014).

El arsénico se encuentra frecuentemente en el ambiente como compuestos de As(III) y As(V). Se ha evidenciado que algunas bacterias pueden oxidar o reducir el arsénico cuando se encuentran expuestas a medios con el metaloide (Muller et al., 2003; citados en Pacheco et al, 2013). La capacidad de bacterias para transformar compuestos de arsénico depende de la presencia de enzimas redox (Castillo, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

Las muestras de relaves mineros se tomaron de dos compañías que las representaremos como: compañía 1 (C1) y compañía 2 (C2), ubicadas en el Cantón Ponce Enríquez, provincia del Azuay (Latitud: 64223; Longitud: 965855), Ecuador.

Aislamiento de bacterias

Tabla 1: Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias

Medios de Cultivo	Simbología
OGYE*	A1
OGYE + NaAsO ₂ 0,1mM	A2
OGYE preparado con el agua de relaves mineros de la compañía 1	A3
OGYE preparado con el agua de relaves mineros de la compañía 2	A4

*(Agar extracto de levadura-glucosa-oxitetraciclina)

En cada medio (A1, A2, A3 y A4) se inoculó 50 µL de tres muestras: M1= Muestra líquida de C1; M2= muestra líquida de C2; y M3= Muestra de lodo de C2. Todos los cultivos fueron incubados durante 24 horas a tres temperaturas diferentes: 14 °C (temperatura ambiental promedio de la ciudad de Riobamba durante la investigación); 30 °C, y; 35 °C, este criterio fue considerado para determinar la temperatura que permite el mayor desarrollo microbiano. Se aislaron clones de los medios incubados temperatura ambiente y 30 °C, los clones que crecieron a 35 °C no fueron considerados, ya que las posteriores pruebas se realizaron a temperatura ambiente y el cambio de temperatura podría afectar su crecimiento.

Determinación de resistencia a arsénico

Se seleccionaron 47 de los clones aislados, y se les repicó en OGYE con concentraciones crecientes de arsenito y arsenato de 5, 10, 15, 20 y 30 mM. Los cultivos se incubaron a 14 °C durante el tiempo necesario hasta obtener un tamaño significativo de cada clon. El criterio establecido por el investigador para definir tamaño de los clones, se obtuvo por comparaciones cualitativas entre los tamaños de los clones evaluados (Tabla 2).

Tabla 2: Criterio para identificar el tamaño de los clones evaluados

Tamaño de clones	Simbología
Clones de tamaño grande	(+++)
Clones de tamaño mediano	(++)
Clones de tamaño pequeño	(+)
Ausencia de crecimiento	()

Pruebas de oxidación/reducción

Los clones que mostraron mayor resistencia al arsénico fueron inoculados en agua de peptona durante 72h. Pasado este tiempo, los clones fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos, los pellets formados se lava-

ron con agua desionizada y se resuspendieron en agua de peptona. De cada resuspensión se tomó un inóculo de 100µL y se colocó en tubos que contenían 200µL de agua peptonada adicionada con concentraciones de 1mM y 5mM de arsenito y arsenato. Los cultivos fueron incubados durante 5 y 10 días a 14°C. Al finalizar el tiempo de incubación se colocó 200µL de una solución de AgNO₃ 0,2M en cada cultivo para determinar la actividad de oxidación/reducción de cada clon, la misma que se determinó de acuerdo al color del precipitado que se formó (Simeonova et al. 2004).

Tabla 3: Criterio de identificación de la actividad de oxidación/reducción de los clones evaluados

Reactivos	Color del precipitado
Arsenito + AgNO ₃ 0,2M	Amarillo
Arsenato + AgNO ₃ 0,2M	Marrón

Identificación bacteriana

A las clones más resistentes se les realizó la prueba de Tinción de Gram y posteriormente fueron identificadas con las galerías MICROGEN MID 64-MID 65.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias

En todas las muestras evaluadas, se observó crecimiento de bacterias (Tabla 4, 5, 6).

Tabla 4: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 14 °C.

Muestra	Medio de cultivo			
	A1 (UFC/mL)	A2 (UFC/mL)	A3 (UFC/mL)	A4 (UFC/mL)
M1	340	20	0	20
M2	0	20	60	80
M3	1060	2240	580	860

Tabla 5: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 30°C

Muestra	Medio de cultivo			
	A1 (UFC/mL)	A2 (UFC/mL)	A3 (UFC/mL)	A4 (UFC/mL)
M1	300	520	2060	1960
M2	220	420	2800	2600
M3	4800	8200	9200	8480

Tabla 6: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 35°C

Muestra	Medio de cultivo			
	A1 (UFC/mL)	A2 (UFC/mL)	A3 (UFC/mL)	A4 (UFC/mL)
M1	2260	1060	3200	1320
M2	2400	4400	8400	660
M3	18360	38400	14400	12600

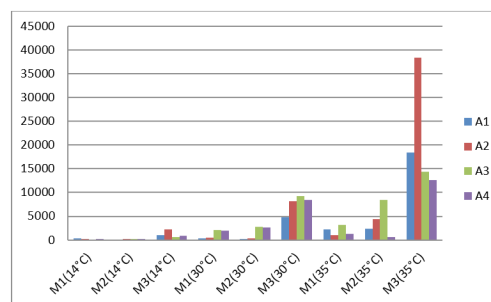


Figura. 1: Comparación del crecimiento bacteriano en los medios OGYE a diferentes temperaturas.

En la Figura 1 se puede apreciar que existe una importante influencia de la temperatura en el desarrollo de los clones bacterianos aislados, siendo 35 °C la temperatura donde se encontró mayor crecimiento y M3 la muestra que más crecimiento mostró. Farah et al. (2010) determinaron que la temperatura óptima de crecimiento para las bacterias resistentes al arsénico *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii* y *Bacillus anthracis* fue respectivamente 30 °C y 37 °C. En el presente estudio se obtuvo en general un mayor desarrollo bacteriano a 35 °C, sin embargo existieron excepciones como en el caso de M1 y M2 que presentaron más crecimiento a 30 °C que a 35 °C en el medio A3, lo que parecería indicar que el medio preparado con el agua de relaves mineros de la compañía 1 posee algún elemento que favorece el crecimiento de los clones bacterianos sobre 30 °C (Tablas 5 y 6).

Se observó una clara preferencia de las bacterias hacia los medios de cultivo que tenían arsénico, esta afirmación se demuestra claramente al observar el crecimiento de los clones en el medio A2, por lo que se asume que el metaloide aporta algún tipo de ventaja para su crecimiento. También se puede apreciar que en los cultivos a 30 °C y 35 °C las bacterias se adaptaron mejor a los medios A3 y A4, esto puede ser debido a la composición del agua de los relaves y de la laguna, en las que, la presencia de otros compuestos puede favorecer su desarrollo.

Debido a que nos interesan los clones resistentes a arsénico, se excluyeron aquellos que crecieron en el medio A1, igualmente no se consideró las que crecieron a 35 °C, ya que para pruebas posteriores se usó temperatura ambiente y el cambio de temperatura podría inhibir su desarrollo.

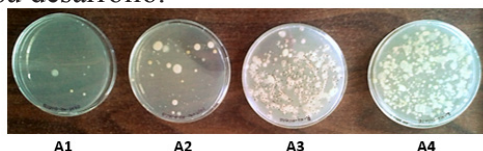


Figura. 2: Crecimiento de bacterias de la muestra M2 en diferentes medios a 30 °C.

En la Figura 2 se observa el crecimiento de bacterias de la muestra M2 en los 4 medios evaluados a 30 °C. Claramente se verifica que los clones crecieron mejor en los medios que contenían arsénico, el desarrollo fue incluso mayor en los medios A3 y A4.

Determinación de la resistencia al arsénico.

De los microorganismos aislados, se seleccionaron un total de 47 clones para evaluar su resistencia a arsenito y arsenato: 21 pertenecientes al grupo que se aisló a temperatura ambiente, y 26 al grupo aislado a 30 °C. Todas las pruebas de resistencia se realizaron a temperatura ambiente (14 °C).

Tabla 7: Resultados de la evaluación de la resistencia al arsénico de los clones aislados a temperatura ambiente.

Medio de cultivo: OGYE Agar Bacto		48h de incubación		48h de incubación		48h de incubación		96h de incubación		96h de incubación	
Origen Muestra-Medio	Nº	Arsenito 5mM	Arsenato 5mM	Arsenito 10mM	Arsenato 10mM	Arsenito 15mM	Arsenato 15mM	Arsenito 20mM	Arsenato 20mM	Arsenito 30mM	Arsenato 30mM
MI-A2	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	26	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	27	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tamaño de los clones aislados: (+++) grande; (++) mediana; (+) pequeña; (-) ausencia; celdas en blanco indican que no se realizó repique de las cepas.

Tabla 8: Resultados de la evaluación de la resistencia al arsénico de los clones aislados a 30°C.

Medio de cultivo: OGYE Agar Bacto		48h de incubación		48h de incubación		48h de incubación		96h de incubación		96h de incubación	
Origen Muestra-Medio	Nº	Arsenito 5mM	Arsenato 5mM	Arsenito 10mM	Arsenato 10mM	Arsenito 15mM	Arsenato 15mM	Arsenito 20mM	Arsenato 20mM	Arsenito 30mM	Arsenato 30mM
MI-A2	1	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
MI-A2	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	6	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
MI-A4	7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	8	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
MI-A3	9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	10	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
MI-A2	11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	13	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	15	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
MI-A2	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A2	21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A3	23	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	24	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	26	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MI-A4	27	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tamaño de los clones aislados: (+++) grande; (++) mediana; (+) pequeña; (-) ausencia; celdas en blanco indican que no se realizó repique de las cepas.

Los resultados obtenidos indican que las bacterias tienen un mejor desarrollo en arsenato que en arsenito, incluso en altas concentraciones. Este resultado coincide con el hecho de que el arsenito es más tóxico que el arsenato para todo tipo de organismo, según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (2014).

Los resultados de crecimiento obtenidos (Figuras 1 y 2) y los valores de resistencia mostrados por los clones aislados parecen indicar que nos encontramos en presencia de bacterias extremófilas, las cuales se desarrollan mejor en presencia del arsénico, incluso en concentraciones mayores a las presentes en los relaves de donde fueron aisladas (Tablas 7 y 8). Campos et al. en el 2007 y Mellado et al. en el 2008 reportaron que cepas de Pseudomonas, Enterobacter, Acinetobacter, Burkholderia, Escherichia, fueron capaces de resistir concentraciones de arsénico mayores a 8 mM. En nuestro caso se lograron aislar clones capaces de crecer en concentraciones de hasta 30 mM.

Pruebas de oxidación/reducción de arsénico

Para evaluar la capacidad de oxidación /reducción de arsénico se seleccionaron 8 clones capaces de crecer tanto en arsenito como arsenato a concentraciones de 30 mM. (clones 2, 5, 11, 15, 19 de la Tabla 7; clones 21, 22 y 25 Tabla 8) y 10 clones resistentes a concentraciones de 20mM (1, 5, 16, 18 de la Tabla 7; 2, 5, 9, 15, 16 y 26 de la Tabla 8).

Tabla 9: Resultados de las pruebas de oxidación/reducción de arsénico

Clones resistentes a 30 mM de arsénico	Color de precipitado
2	Amarillo
5	Amarillo
11	Amarillo
15	Amarillo
19	Amarillo
21	Amarillo
22	Amarillo
25	Amarillo
Clones resistentes a 20 mM de arsénico	Color de precipitado
1	Amarillo
5	Amarillo
16	Amarillo
18	Amarillo
2	Amarillo
5	Amarillo
9	Amarillo
15	Amarillo
16	Amarillo
26	Amarillo

Los resultados obtenidos luego de transcurridos 5 y 10 días, mostraron que en todos los casos los clones evaluados fueron capaces de reducir el arsenato en arsenito. Mellado et al. en el 2008 reportaron que la reducción del arsenato constituye un importante proceso de detoxificación. Esto explicaría el hecho de que todas las cepas evaluadas en el presente trabajo, fueron capaces de reducirlo.

Identificación bacteriana

Para la identificación se consideró 8 cepas resistentes a concentraciones de 30mM de arsenato y arsenito.

Tabla 10: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros.

Aisladas a Temperatura ambiente			
Origen Muestra-Medio	Nº	Tinción Gram	Género
M1-A2	2	bacilos(-)	<i>Pseudomonas sp</i>
M3-A2	10	bacilos(-)	<i>Pseudomonas sp</i>
M3-A2	11	bacilos(-)	<i>Pseudomonas sp</i>
M3-A3	15	bacilos(-)	<i>Vibrio sp.</i>
M4-A4	19	bacilos(-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
Aisladas a 30°C			
M3-A2	21	bacilos(-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-A3	22	bacilos(-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-A4	25	bacilos(-)	<i>Pasteurella sp</i>

Bibliografía

1. Fundación ecológica arcoiris. 2006. Impactos socioambientales de la minería a los recursos naturales y a la salud humana. Loja : Creativa, 2006.
2. Manahan, Stanley E. Introducción a la química ambiental. D.F. - México. 2007. pp. 152- 155.
3. Ahumada, G. 2014. Arsénico en el agua potable: una preocupación a nivel global. [Internet] 2014. [Citado el 10 de Octubre 2015.]. Disponible en: <http://www.aidis.cl/files/revista-mayo/GAhuma>

La capacidad de reducción de arsénico ha sido reportada en varios géneros de bacterias incluyendo *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Escherichia*, entre otros (Campos et al. 2007; Mellado et al. 2008). En este trabajo se aislaron cepas correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella* capaces de crecer en elevadas concentraciones de arsénico y de reducirlo a arsenito.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se aislaron e identificaron ocho bacterias a partir de relaves mineros, seis de ellas correspondieron al género *Pseudomonas*, y las dos restantes a los géneros *Vibrio* y *Pasteurella*. Estos clones fueron capaces desarrollarse en medios suplementados con concentraciones de 30 mM de arsenito y arsenato.

Se evaluó, a nivel de laboratorio, la capacidad de reducir u oxidar el arsénico en las cepas bacterianas aisladas, utilizando un método de detección cualitativo con nitrato de plata, mediante el cual se obtuvo resultados positivos para la reducción de arsenato a arsenito en todas las cepas evaluadas.

da-Arsenico2014.pdf.

4. Pacheco G, Mondragón V, Velázquez J. Oxidación del arsénico regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. *Revista Bio Ciencias*. 2013; 2(3): 92-97.
5. Castillo, F. 2005. *Biología Ambiental*. [Internet] 2005. [Citado el 11 de Octubre 2015]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
6. Farah R, Iram, Rehman A, Shakoori R. Isolation and characterization of arsenic reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of wastewater. [Internet] 2010. [Citado el 23 de Octubre 2015]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/258022850_Isolation_and_Characterization_of_Arsenic_Reducing_Bacteria_from_Industrial_Effluents_and_their_Potential_Use_in_Bioremediation_of_Wastewater
7. Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. 2014. Arsénico. [Internet] 2014. [Citado el 7 de Octubre 2015.]. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts2.html#bookmark1.
8. Campos V, Valenzuela C, Alcorta M, Escalante G, Mondaca M. Aislamiento de bacterias resistentes a Arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada camarones. Chile. [Internet] 2007. [Citado el 17 de Octubre 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0717-65382007000200003>.
9. Mellado C, Badilla C, Escalante G, Campos V, Mondaca M. Transformación de arsénico por bacterias aisladas de sedimentos enriquecidos con el metaloide. *Afinidad*. 2008; LXV: 115-119.