



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
CENTRO DE CIENCIAS AMBIENTALES EULA-CHILE**

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A ROCAS  
VOLCÁNICAS Y SU INFLUENCIA EN LA MOVILIZACIÓN DE ARSÉNICO**

Por

**VICTOR LEANDRO CAMPOS ARANEDA**

Tesis presentada a:

Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción

Para optar al Grado de:

Doctor en Ciencias Ambientales con mención en Calidad de Agua y Conservación de  
Sistemas Acuáticos Continentales

CONCEPCION (Chile), 2011

## Resumen

El arsénico forma parte de más de 300 minerales, tales como arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), realgar ( $\text{AsS}$ ) y ornopirent ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ). La erosión, el volcanismo y la actividad antropogénica (minería, fundición, fabricación de vidrio, industria farmacéutica, electrónica, pesticidas, y las armas químicas) favoreciendo el ingreso de arsénico a la atmósfera, suelo y aguas superficiales y subterráneas.

La contaminación de los suministros de agua potable con arsenito y arseniato ha sido ampliamente reportado, y el arsénico se ha identificado como un riesgo importante para la salud humana en distintas partes del mundo (noreste de la India, Bangladesh, el noroeste de Estados Unidos y el norte de Chile). Los efectos toxicológicos del arsénico están relacionados con su forma química y el estado de oxidación; las formas orgánicas son menos tóxicas. Entre las formas inorgánicas, el As (III) es en promedio 100 veces más tóxico y más móvil que el As (V). En la Unión Europea, la norma de calidad para el arsénico en el agua potable está fijado en 10 mg/L.

Una gran cantidad de bacterias reductoras y oxidantes de Arsénico, han sido aisladas desde sedimentos, rocas y columna de agua. La diversidad de bacterias capaces de reducir arseniato, son mayoritariamente heterotróficas y se extienden a bacterias del grupo de las  $\delta$ -proteobacteria,  $\epsilon$ -proteobacteria, bacterias Gram positivas del género *Clostridium*, *Bacillus*, *Desulfitobacterium* y *Chrysiogenis arsenatis*. Por otro lado, estudios realizados en rocas provenientes de minas de oro (arsenopirita y arginita), fuentes hidrotermales y sedimentos, han permitido aislar un grupo de microorganismos con la capacidad de oxidar arsénico. Entre estos se incluyen bacterias heterotróficas como *Pseudomonas putida* y *Alcaligenes faecalis* y bacterias quimiolitioautotróficas, como *Pseudomonas arsenitoxidans* y algunas cepas del género *Ancylobacter*, *Thiobacillus*, *Hydrogenophaga*, *Acidithiobacillus* y la cepa NT-26 *Agrobacterium*. Sin embargo, la mayoría de las bacterias descritas, capaces de movilizar arsénico, directa e indirectamente, se han aislados desde drenajes ácidos de minas (pH ácido), como es el caso de *Acidithiobacillus*, bacteria tolerante a arsénico y algunas cepas de *Thiomonas*. Sin embargo, Rhine et al. (2008) reportó el aislamiento de una alfa-proteobacteria, con la capacidad para movilizar arsénico desde rocas en condiciones aeróbicas, a pH circumneutral (pH 5,5-7,4).

El objetivo de esta tesis fue conocer el rol de los microorganismos en la especiación y movilización del arsénico en los sistemas acuáticos, a pH circumneutral, utilizando como modelo ecológico rocas volcánicas, que entre sus constituyentes se encuentre arsénico. Los estudios de especiación química elemental en cultivos bacterianos incubados bajo condiciones controladas de laboratorio, permite entender los cambios o biotransformaciones químicas del arsénico por las poblaciones bacterianas resistentes

El río Camarones fue caracterizado fisicoquímicamente y microbiológicamente. Los resultados obtenidos demuestran que el río Camarones presenta un gradiente de concentración de arsénico, detectándose en la parte superior del río (potamon) las concentraciones más altas de arsénico (1100  $\mu\text{g/L}$ ), en cambio en la zona media se detectó una concentración de 750  $\mu\text{g/L}$  y en la zona baja (desembocadura) 550  $\mu\text{g/L}$  de arsénico total. La caracterización microbiológica del río demostró la presencia de bacterias resistentes a arsenito y arseniato, con niveles de tolerancia mayores a 8mM. Al investigar las propiedades redox (oxidación y/o reducción) se encontró que el 36,84% de las cepas, aisladas de sedimentos ricos en arsénico (potamon), presentaron actividades reductoras en porcentajes mayores al 50%. En cambio, en bacterias aisladas desde sedimentos con bajas concentraciones del metaloide (Zona media y baja), 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).

Los estudios de biomovilización de arsénico, desde rocas volcánicas, fueron realizados en experimentos de microcosmos. Los experimentos fueron realizados incubando la comunidad natural asociada a la roca volcánica durante 45 días (Control biótico). Un control abiótico (roca esterilizada) fue implementado como control negativo. A las bacterias adheridas (biopelícula) a las rocas volcánicas fueron caracterizadas en base a estudiar su capacidad de movilizar arsénico, desde la roca volcánica, a pH circumneutral. La estructura de la biopelícula fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido asociada a un espectrómetro de energía dispersiva (MEB-EED). Las cepas fueron aisladas desde la biopelícula e identificadas mediante análisis de secuencias del gen ADNr 16s. La actividad oxidante y reductora de las cepas aisladas fueron estudiadas mediante la amplificación de los genes *aox* y *arsC*, respectivamente. La composición de la comunidad bacteriana asociada a la roca volcánica fue analizada mediante electroforesis en gel de gradiente denaturante (DGGE). Los análisis de MEB-EED demostraron la presencia de una biopelícula estable, luego de 45 días de incubación. Además se detectó la presencia de arsénico y otros metales trazas. Los análisis mediante secuenciación del gen ADNr 16s, de las cepas aisladas, detectaron la presencia de 6 géneros bacterianos diferentes *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia* y *Acinetobacter*. El 80% de las cepas aisladas fueron resistentes a arsenito y solo 65 % de ellas fueron capaces de oxidar el metaloide, con una eficiencia de transformación de As(III) a As(V) cercana a 97 %. En cambio el 100 % las cepas resistentes a arseniato fueron capaces de reducir el metaloide, con una eficiencia de transformación de As(V) a As(III) entre 69-86%. Los análisis polifásico de las cepas aisladas determinaron la presencia de una nueva especie bacteriana denominada *Pseudomonas arsenicoxydans*. El análisis de las secuencias del gen ADNr 16S obtenidos mediante DGGE revelaron la presencia de 4 grupos bacterianos ( $\alpha$ -proteobacteria  $\gamma$ -proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria). Los resultados de los experimentos de microcosmos demostraron que en los cultivos estériles la concentración de arsénico fue de 0,37 mM, luego de 45 días de incubación. En cambio en los experimentos con la comunidad natural, la concentración total de arsénico total fue alrededor de 1,31 mM. Estos resultados demuestran que la comunidad bacteriana epilítica participa en la movilización y especiación de arsénico. Además, la comprensión de estos procesos biológicos pueden ser utilizado en el modelamiento de la movilización de arsénico desde rocas hacia fuentes de agua potable.

Palabras Claves: Movilización de arsénico, genes de resistencia arsénico, Bacterias arsenito-oxidantes, biopelícula bacteriana, *Pseudomonas arsenicoxydans*.