

Arsenic-resistant bacteria in groundwater: Isolation and biochemical characterization

J. Kenedy Ramirez, MSc¹, Elvis Gilmar Gonzales-Condori, MSc², and Celia Choquenaira-Quispe, MSc¹ y Harry Ricardo Yucra-Condori, MSc³

¹Universidad Católica de Santa María, Peru, juan.ramirezch@ucsm.edu.pe, qfcelia@gmail.com

²Universidad Tecnológica del Perú, Perú, elvgonzalesc@gmail.com

³Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú, hyucrac@unsa.edu.pe

Abstract– Arsenic is a frequent contaminant of water, especially in geographical areas with the presence of volcanoes. This semi-metal is considered toxic to humans. Therefore, its removal from water resources is a constant challenge in the scientific community. The present study aims to search for bacteria capable of resisting high concentrations of arsenic and could eventually be useful in the removal of this contaminant. Three bacteria capable of tolerating 2mM arsenic were isolated and morphological and biochemical characterization was performed. In addition, by sequencing the 16S rRNA gene, it was identified that they belong to Cupriavidus and Pseudomonas and they were registered in GenBank. These bacteria are potential agents for removing arsenic from water. However, further studies are needed to evaluate this property.

Keywords-- Arsenic, groundwater, bacteria, Cupriavidus, Pseudomonas.

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2022.1.1.426>

ISBN: 978-628-95207-0-5 **ISSN:** 2414-6390

Bacterias resistentes al arsénico en agua subterránea: aislamiento y caracterización bioquímica

J. Kenedy Ramirez, MSc¹, Elvis Gilmar Gonzales-Condori, MSc², and Celia Choquenaira-Quispe, MSc¹, y Harry Ricardo Yucra-Condori, MSc³

¹Universidad Católica de Santa María, Peru, juan.ramirezch@ucsm.edu.pe, qfcelia@gmail.com

²Universidad Tecnológica del Perú, Perú, elvgonzalesc@gmail.com

³Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú, hyucrac@unsa.edu.pe

Resumen– El arsénico es un contaminante frecuente de agua, especialmente en zonas geográficas con presencia de volcanes. Este semi-metal es considerado tóxico para el ser humano por lo que su remoción del recurso hídrico es un constante desafío en la comunidad científica. El presente estudio pretende buscar bacterias capaces de resistir altas concentraciones de arsénico y eventualmente podrían ser útiles en la remoción de este contaminante. Se aisló tres bacterias capaces de tolerar 2mM de arsénico y se realizó la caracterización morfológica y bioquímica. Además, mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se determinó que pertenecen a los géneros *Cupriavidus* y *Pseudomonas* y se registraron en GenBank. Estas bacterias son potenciales agentes para remover arsénico en agua. Sin embargo, es necesario estudios posteriores que evalúen esta propiedad.

Palabras clave: Arsénico, agua subterránea, bacterias, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*.

I. INTRODUCCIÓN

El arsénico es un semi-metal (presenta características químicas de un metal y un no-metal). Es un contaminante frecuente del agua producto de fuentes naturales y antropogénicas. La contaminación natural del agua con arsénico se produce principalmente en zonas volcánicas [1], tal como sucede en ciertas ciudades del Perú y América Latina [2]. Este contaminante es clasificado como carcinogénico para humanos [3] y sus efectos tóxicos depende de la forma de ingreso al organismo, tiempo de exposición y concentración del semi-metal [4]. El límite máximo permisible de arsénico en agua de consumo humano es $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [5]. Sin embargo, actualmente incluso se recomienda disminuir la concentración de arsénico permisible por sus potenciales efectos tóxicos incluso a concentraciones inferiores [6].

Las estrategias de remoción de este contaminante son diversas. Por ejemplo, Weerasundara et al. [7] las clasifican en cuatro grupos: (i) proceso de intercambio iónico, (ii) separación por membrana, (iii) precipitación y (iv) adsorción. Además de esta clasificación, se evidencia el uso de técnicas electroquímicas [8] y recursos biológicos como plantas y microorganismos para remover este contaminante [9,10].

Se sabe que la resistencia o tolerancia de plantas o microorganismos a ciertos compuestos problemáticos para el medio ambiente y el ser humano, podría favorecer la capacidad de captar y remover estas sustancias a partir de medios contaminados [11,12]. Por lo que la búsqueda de recursos biológicos que toleran altas concentraciones de arsénico, podrían ser potenciales agentes para remover el semi-metal del agua. Entonces, el objetivo del presente estudio es aislar, caracterizar e identificar bacterias resistentes al arsénico a partir de agua subterránea contaminada con el semi-metal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Muestra de agua

Muestras de agua subterránea fue recolectada del campus de la universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú ($16^{\circ}24'21.1''\text{S}$ $71^{\circ}32'55.2''\text{W}$) en frascos estériles. La concentración de arsénico en la muestra se determinó mediante espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Optima8000 de PerkinElmer y fue $30\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La muestra para aislar bacterias fue contaminada con arsénico hasta obtener una concentración total de 2mM ($148\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), se almacenó en condiciones estériles y a temperatura ambiente (21°C aproximadamente) durante un mes.

B. Aislamiento de bacterias

De la muestra de agua subterránea contaminada con arsénico, se tomó $100\mu\text{L}$ y se cultivó en agar nutritivo contaminado con 2mM de arsénico. Se incubó a 30°C durante 48 horas. Posteriormente se transfirieron colonias de bacterias individuales a nuevas placas con el mismo medio de cultivo para el subcultivo y purificación. Este procedimiento se repitió cuatro veces. Finalmente, las colonias puras aisladas fueron transferidos a tubos de 2mL conteniendo 30% de glicerol para su preservación a -20°C .

C. Caracterización e identificación de bacterias aisladas

Las bacterias resistentes a arsénico aisladas fueron sometidas a pruebas bioquímicas para evaluar su metabolismo y síntesis de enzimas. Además, se evaluó la reacción frente a la tinción Gram y la susceptibilidad a antibióticos como sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg), oxitetraciclina (30 µg), tobramicina (10 µg), cefalexina (30 µg), vancomicina (30 µg) y ampicilina sulbactam (10 µg) utilizando placas con agar Mueller Hinton.

Finalmente, la identificación de las bacterias se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, utilizando los primers 27F/1492R. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con una desnaturalización inicial a 94°C durante dos minutos, 30 ciclos de 94°C por un minuto, 60°C por un minuto, 72°C por 3 minutos y la extensión final a 72°C por 10 minutos. La determinación de la secuencia de los productos de PCR fue realizado utilizando Dye Terminator Cycle Sequencing. Las secuencias obtenidas se analizaron y depositaron en la base de datos NCBI GenBank para obtener los números de acceso.

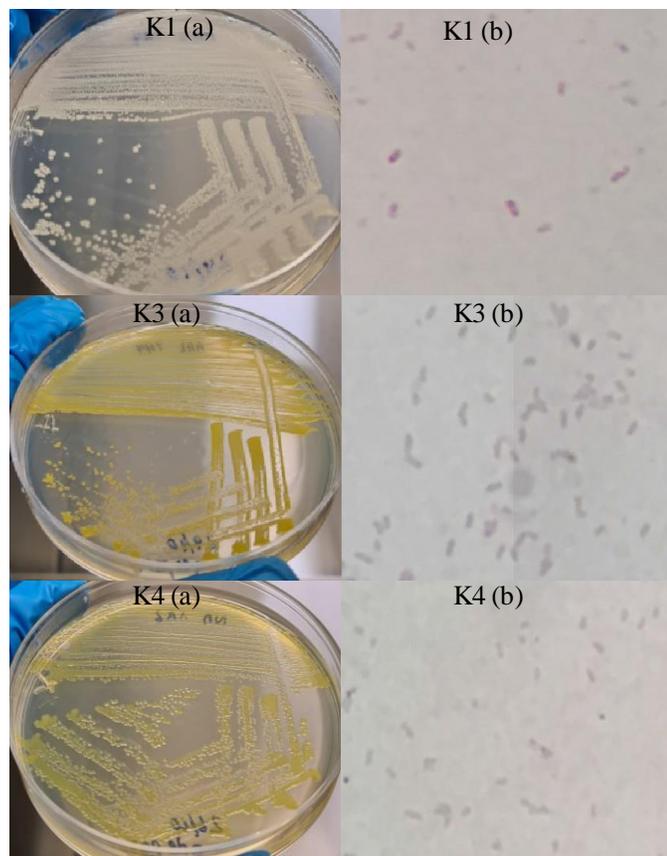


Fig. 1 Morfología de las bacterias aisladas (a) y reacción a la tinción Gram (b).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Caracterización de bacterias aisladas

Las colonias de bacterias resistentes a arsénico aisladas en el presente estudio se muestran en la Fig. 1. Las colonias de la cepa K1 son blancas, con bordes irregulares, con forma esférica. Las colonias de la cepa K3 son amarillas, planas y con bordes definidos. Las colonias de la cepa K4 son amarillo-verdosas, planas y con bordes definidos. Sólo la primera cepa fue Gram positiva.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 1. El crecimiento en agar triple azúcar (TSI) evidenció la capacidad de fermentación de lactosa y glucosa de las cepas K1 y K3. La cepa K4 no fermenta los azúcares. Todas las cepas son negativas a la producción de CO₂ y H₂S. Mediante la prueba en agar lisina hierro (LIA) se determinó que las tres cepas dan una reacción negativa a la presencia de lisina descarboxilasa y desaminasa (Fig. 2).

TABLA 1
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

| Prueba bioquímica | K1 | K3 | K4 |
|----------------------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| TSI (Lac/Glu/CO ₂ /H ₂ S) | + / + / - / - | + / + / - / - | - / - / - / - |
| LIA | - | - | - |
| Citrato | - | + | + |
| Ureasa | + | + | + |
| MR/VP | - / + | - / + | + / + |
| Movilidad/Indol | - / - | - / - | - / - |
| Metabolismo | Fermentativo | Fermentativo | No fermentativo |

Reacción positiva (+), Reacción negativa (-)

El crecimiento en agar citrato de Simmons evidenció que K2 y K3 son capaces de utilizar citrato y amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Todas las cepas tienen la capacidad de hidrolizar la urea (Fig. 3). Además, la Fig. 4 muestra que la bacteria K4 dio positivo a la reacción de rojo de metilo (MR) y las tres cepas dieron positivo a la reacción Voges-Proskauer (VP). Finalmente, la Fig. 5 muestra el crecimiento de las bacterias aisladas en el medio de sulfuro, indol, movilidad (SIM) y la prueba óxido-fermentativo (OF), con las que se deduce que ninguna bacteria aislada tiene capacidad de movilidad, ni producción de indol; y la K1 y K3 son fermentativos.

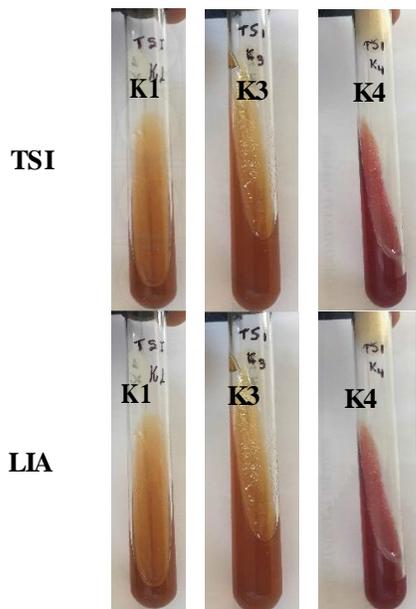


Fig. 2 Pruebas agar triple azúcar (TSI) y agar lisina hierro (LIA)

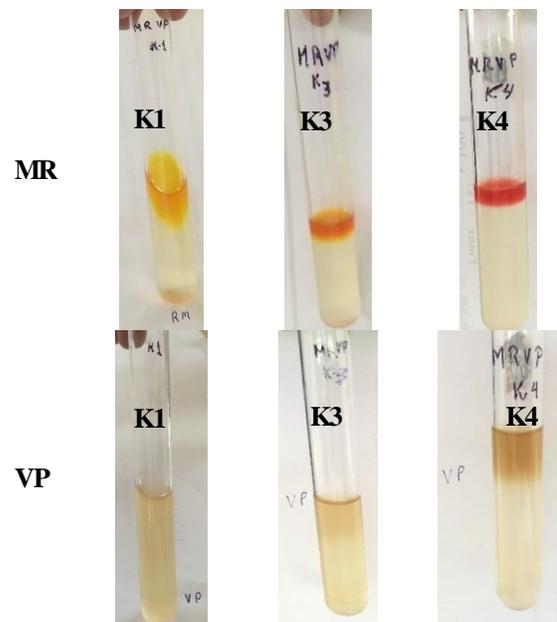


Fig. 4 Pruebas rojo de metilo (MR) y Voges-Proskauer (VP)

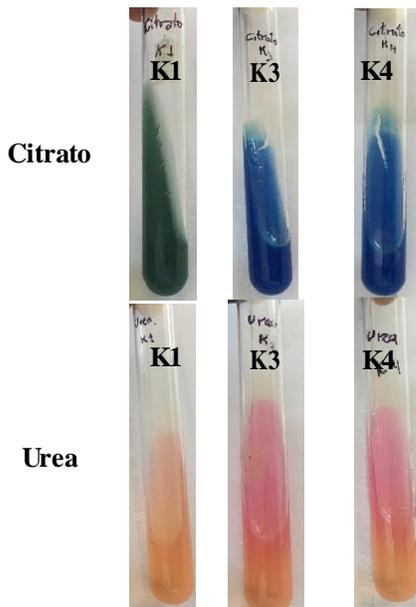


Fig. 3 Pruebas en agar citrato de Simmons (TSI) y capacidad de hidrolizar urea.

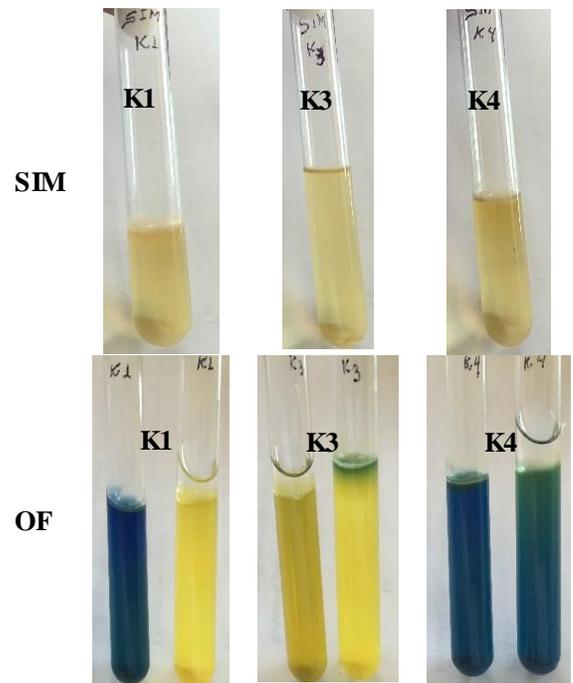


Fig. 5 Pruebas Sulfuro, indol y movilidad (SIM) y prueba de oxidación/fermentación (OF)

En la Tabla 2 y Fig. 6 se observa la sensibilidad de las bacterias aisladas a antibióticos. Las tres especies aisladas son sensibles a al menos dos antibióticos utilizados. Según estos resultados se puede deducir que estas bacterias son resistentes a los antibióticos de los grupos betalactámicos (ampicilina y cefalexina) y glucopéptidos (vancomicina). Además, estudios sugieren que la resistencia a metales está relacionada a la aparición de resistencia a antibióticos [13, 14]. Sin embargo, el presente estudio no evidenció modificación de la susceptibilidad a los antibióticos utilizados.

B. Identificación de bacterias aisladas

Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA se logró identificar las tres bacterias resistentes a arsénico. K1 fue identificado como *Cupriavidus* sp. y K3 y K4 fueron identificados como *Pseudomonas* sp. Los números de acceso en GenBank son KU519712, KU519713 y KU519714,

respectivamente. Las Fig. 7 y 8 muestran la relación filogenética de las bacterias aisladas y las especies más cercanas basadas en la secuencia del gen 16S rRNA mediante el método de unión de vecinos (Neighbor Joining).

en la habilidad de acumular el semi-metal. Por lo tanto, las bacterias aisladas en este estudio tienen la propiedad potencial de acumular y remover este contaminante en agua. Sin embargo, es necesario estudios más profundos.

TABLA 2

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

| Antibiótico | Zona de inhibición de crecimiento (mm) | | |
|-------------------------------------|----------------------------------------|----|----|
| | K1 | K3 | K4 |
| Sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg) | 37 | NZ | 15 |
| Oxitetraciclina (30 µg) | 27 | 27 | 13 |
| Tobramicina (10 µg) | 17 | 27 | 11 |
| Cefalexina (30 µg) | NZ | NZ | NZ |
| Vancomicina (30 µg) | NZ | NZ | NZ |
| Ampicilina Sulbactam (10 µg) | NZ | NZ | NZ |

NZ: Sin zona de Inhibición

Especies de ambos géneros de bacterias aisladas fueron reportados como posibles agentes para la biorremoción de arsénico en agua. Por ejemplo, Yang et al. [15] reportaron que *Cupriavidus basilensis* es un facilitador para optimizar la fito-acumulación de arsénico. Por otro lado, especies del género *Pseudomonas* actúan de forma sinérgica con un alga para la acumulación de arsénico [16]. En este contexto, Jebeli et al. [17] aislaron e identificaron bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* para captar altas concentraciones de arsénico en agua. Además, Satapute et al. [12] señalan que la capacidad de resistencia a arsénico de una especie de *Pseudomonas* influye

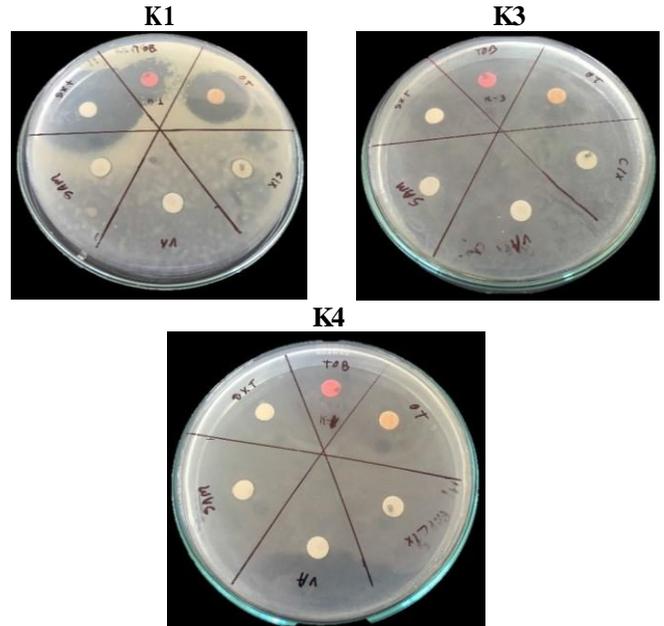


Fig. 6 Resultado de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana

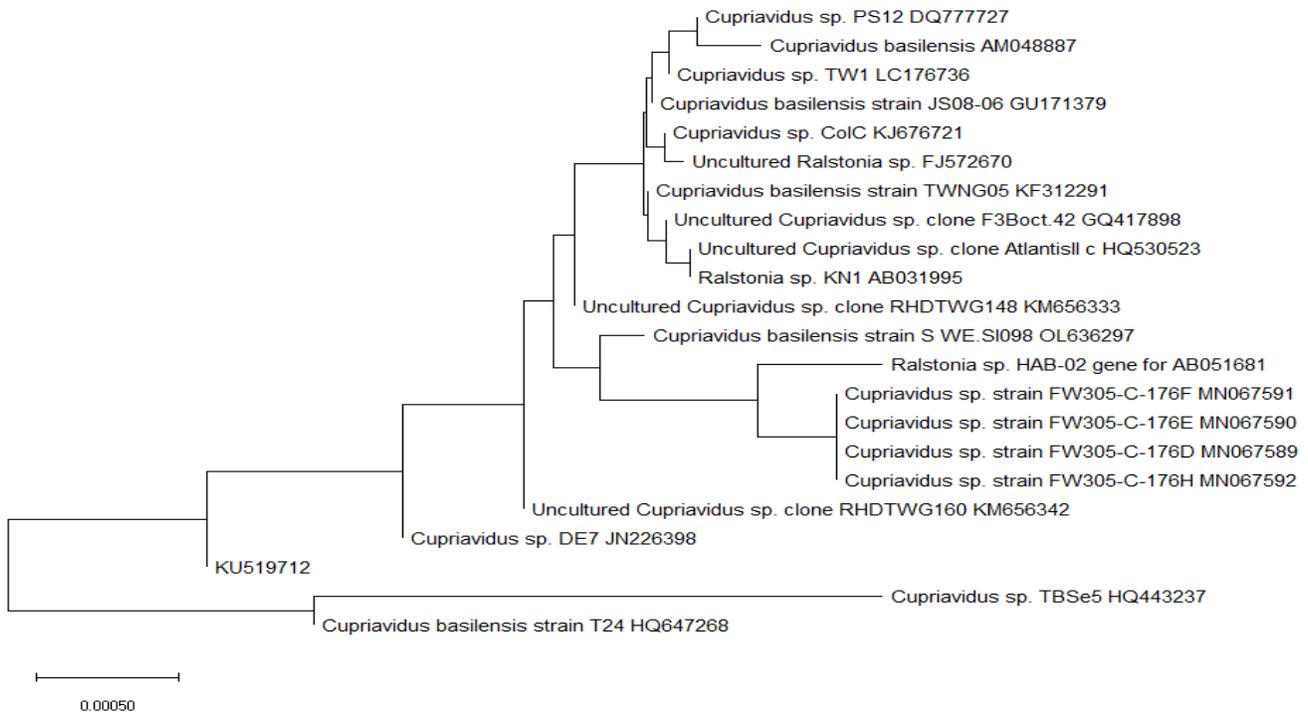


Fig. 7 Árbol filogenético de la bacteria aislada K1 (KU519712) que muestra los taxones más probables basados en secuencias del gen 16S rRNA de NCBI utilizando MEGA11.

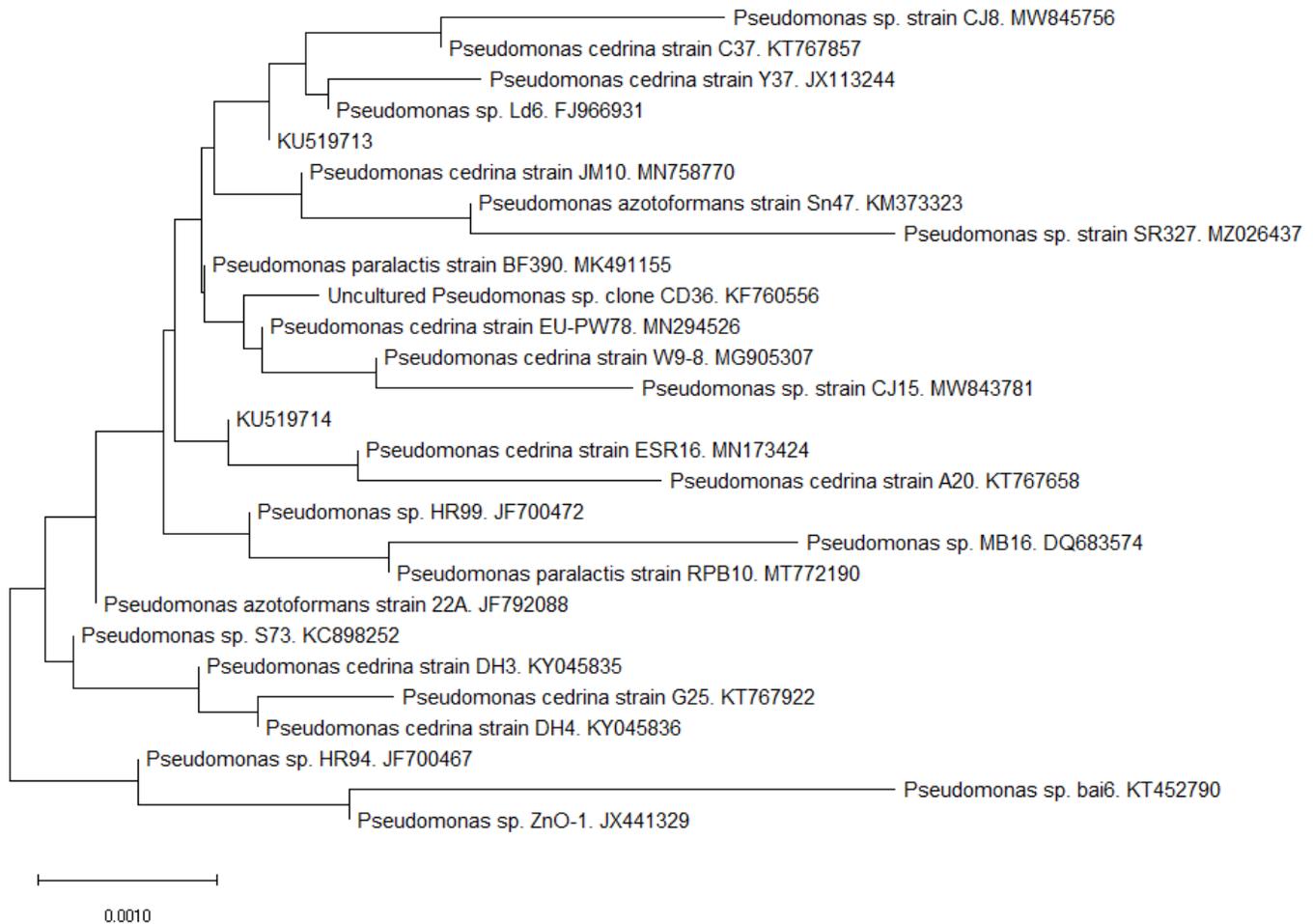


Fig. 8 Árbol filogenético de las bacterias aisladas K3 (KU519713) y K4 (KU519714) que muestra los taxones más probables basados en secuencias del gen 16S rRNA de NCBI utilizando MEGA11.

IV. CONCLUSIONES

Se aisló, caracterizó e identificó tres especies de bacterias con capacidad de crecimiento en un medio que contiene 2mM de arsénico (148mg*L-1). La secuencia completa del gen 16S rRNA fue depositada en GenBank de NCBI con los números de acceso KU519712, KU519713 y KU519714. Estas bacterias pertenecen a los géneros *Cupriavidus* y *Pseudomonas*. Finalmente, estas especies aisladas son potenciales agentes para remover arsénico en agua. Sin embargo, es necesario estudios posteriores que evalúen esta propiedad.

REFERENCIAS

[1] Litynska, M., Astrelin, I., & Tolstopalova, N. (2017). Ways of Arsenic Compounds Getting into Natural Waters. *Modern Environmental Science and Engineering*, 3(01),

- 50–60. [https://doi.org/10.15341/mese\(2333-2581\)/01.03.2017/007](https://doi.org/10.15341/mese(2333-2581)/01.03.2017/007).
- [2] Morales-Simfors, N., Bundschuh, J., Herath, I., Inguaggiato, C., Caselli, A. T., Tapia, J., Choquehuayta, F. E. A., Armienta, M. A., Ormachea, M., Joseph, E., & López, D. L. (2020). Arsenic in Latin America: A critical overview on the geochemistry of arsenic originating from geothermal features and volcanic emissions for solving its environmental consequences. *Science of the Total Environment*, 716(November 2019), 135564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135564>.
- [3] IARC. (2012). Arsenic, metals, fibres and Dusts. *Iarc Monographs*, 100(Arsenic, metals, fibres, and dusts), 47.
- [4] Palma-Lara, I., Martínez-Castillo, M., Quintana-Pérez, J. C., Arellano-Mendoza, M. G., Tamay-Cach, F., Valenzuela-Limón, O. L., García-Montalvo, E. A., & Hernández-Zavala, A. (2020). Arsenic exposure: A public health problem leading to several cancers. *Regulatory*

- Toxicology and Pharmacology*, 110(November 2019), 104539. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104539>.
- [5] WHO. (2017). Guidelines for drinkingwater quality. 4th edition with 1st addendum. WHO.
- [6] Ahmad, A., & Bhattacharya, P. (2019). Arsenic in Drinking Water: Is 10 µg/L a Safe Limit? *Current Pollution Reports*, 5(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s40726-019-0102-7>.
- [7] Weerasundara, L., Ok, Y. S., & Bundschuh, J. (2021). Selective removal of arsenic in water: A critical review. *Environmental Pollution*, 268, 115668. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115668>.
- [8] Kobya, M., Soltani, R. D. C., Omwene, P. I., & Khataee, A. (2020). A review on decontamination of arsenic-contaminated water by electrocoagulation: Reactor configurations and operating cost along with removal mechanisms. *Environmental Technology and Innovation*, 17, 100519. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100519>.
- [9] Alka, S., Shahir, S., Ibrahim, N., Chai, T. T., Mohd Bahari, Z., & Abd Manan, F. (2020). The role of plant growth promoting bacteria on arsenic removal: A review of existing perspectives. *Environmental Technology and Innovation*, 17, 100602. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100602>.
- [10] Sher, S., & Rehman, A. (2019). Use of heavy metals resistant bacteria—a strategy for arsenic bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 6007–6021. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09933-6>.
- [11] Beauchamp, S., Jerbi, A., Frenette-Dussault, C., Pitre, F. E., & Labrecque, M. (2018). Does the origin of cuttings influence yield and phytoextraction potential of willow in a contaminated soil? *Ecological Engineering*, 111 (March 2017), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.11.019>.
- [12] Satapute, P., Paidi, M. K., Kurjogi, M., & Jogaiah, S. (2019). Physiological adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental Pollution*, 251, 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.054>.
- [13] Chen, J., Li, J., Zhang, H., Shi, W., Liu, Y. (2019). Bacterial heavy-metal and antibiotic resistance genes in a copper tailing dam area in northern China. *Front Microbiol*, 10(Aug), 1916. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01916>.
- [14] Zhang, M., Wan, K., Zeng, J., Lin, W., Ye, C., Yu, X. (2020). Co-selection and stability of bacterial antibiotic resistance by arsenic pollution accidents in source water. *Environ Int.* 1(135), 105351. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105351>
- [15] Yang, C., Ho, Y. N., Makita, R., Inoue, C., & Chien, M. F. (2020). *Cupriavidus basilensis* strain r507, a toxic arsenic phytoextraction facilitator, potentiates the arsenic accumulation by *Pteris vittata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190(June 2019), 110075. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110075>.
- [16] Awasthi, S., Chauhan, R., Dwivedi, S., Srivastava, S., Srivastava, S., & Tripathi, R. D. (2018). A consortium of alga (*Chlorella vulgaris*) and bacterium (*Pseudomonas putida*) for amelioration of arsenic toxicity in rice: A promising and feasible approach. *Environmental and Experimental Botany*, 150(February), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.001>.
- [17] Jebelli, M. A., Maleki, A., Amoozegar, M. A., Kalantar, E., Gharibi, F., Darvish, N., & Tashayoe, H. (2018). Isolation and identification of the native population bacteria for bioremediation of high levels of arsenic from water resources. *Journal of Environmental Management*, 212, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.075>.