

BIORREMEDIACION DE NIQUEL (II) EN SOLUCION ACUOSA POR *Aspergillus niger* GC1

(Bioremediation of Nickel (II) in aqueous solution by *Aspergillus niger* GC1)

Gladys Duca^{1*}; Carlos Nuñez¹;
Antonio Navarro P² & María Rubio M²

¹Departamento Biomédico (Orientación Bioquímica) de la Facultad de Medicina

²Instituto de Biotecnología de la Facultad de Bioquímica,
Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

Correo electrónico: gladu1@hotmail.com

Palabras claves: *Aspergillus niger*; Biorremediación; Níquel, metales pesados; ambiental contaminación

Key words: *Aspergillus niger*; Bioremediation; Nickel; heavy metals; environmental pollution

RESÚMEN

Aspergillus niger GC1 es un microorganismo potencial para ser utilizado en procesos de biorremediación de níquel (II). A las concentraciones ensayadas de níquel divalente (1,5 y 3,0 mg/l) no se produjo inhibición del crecimiento celular. A pH 4,5 se obtuvo una eficiencia de 60 y 73 %, en la biorremediación de 1,5 y 3,0 mg/l de níquel (II) respectivamente, mayor al valor obtenido a pH 5,5. Se propone un mecanismo de detoxificación del Ni(II) en solución acuosa por la célula fúngica, sugiriendo que en primer lugar, el Ni (II) se adsorbe a la pared celular del hongo, y en segundo lugar, se produce la absorción del metal al interior celular, para ser posiblemente almacenado o secuestrado, en la estructura vacuolar, a fin de disminuir la toxicidad en el citoplasma celular.

INTRODUCCIÓN

El níquel (Ni) es un metal de transición de color blanco-plateado, conductor de la electricidad y del calor; es dúctil y maleable, por lo que se puede laminar, pulir y forjar fácilmente. Este posee propiedades que lo hace muy requerido para que se combine con otros metales (hierro, cobre, cromo y zinc) y formar aleaciones que se utilizan para la fabricación de monedas, joyas, válvulas, intercambiadores de calor y en la producción de acero inoxidable (Hernández Estévez, 2009).

Los seres humanos se ven expuestos al metal por aleaciones de níquel utilizadas en prótesis dentales, tornillos empleados en huesos fracturados (Smialowicz et

ABSTRACT

Aspergillus niger GC1 is a potential microorganism to be used in processes of bioremediation of nickel (II). To concentrations of divalent nickel (1.5 and 3.0 mg/l) tested there was inhibition of cell growth. To pH 4.5 was achieved an efficiency of 60 and 73% in the bioremediation of 1.5 and 3.0 mg/l of nickel (II), respectively, more than the value obtained at pH 5.5. Proposed a mechanism of detoxification of the Ni (II) in aqueous solution by the fungal cell, suggesting that firstly, the Ni (II) was adsorbs to the cell wall of the fungus, and second, occurs the absorption of metal into the cell, to be possibly stored or sequestered in the vacuolar structure, in order to reduce the toxicity in the cell cytoplasm.

al.,1998) y a través del contacto de la piel con cubiertos, monedas, cierres, joyas de acero inoxidable (Sarkar & Margules, 2002). En el medio ambiente, el níquel se encuentra principalmente combinado con oxígeno o azufre en forma de óxidos y sulfuros y puede formar complejos estables con la materia orgánica disuelta (Nieminen et al., 2007). Tanto al óxido como al sulfuro de níquel, se han asociado con cáncer de pulmón de los obreros de las refinerías de este metal (Roberts et al., 1989; Sarkar & Margules, 2002).

Las formas solubles e insolubles del níquel se clasificaron en el grupo I de carcinógenos humanos (Sarkar & Margules, 2002) debido al diagnóstico realizado por el Comité Internacional de Carcinogénesis del Hombre, quienes demostraron que el cáncer respiratorio de los trabajadores

en las refinerías del metal, se debía al contacto con el óxido y el sulfuro de níquel.

El níquel que se encuentra en aguas superficiales proviene de la precipitación pluvial de partículas suspendidas en la atmósfera y por lixiviación. La concentración natural de níquel en ríos y lagos es muy baja (menor a 10 µg/l) (ATSDR, 2000). Sin embargo, las descargas de aguas residuales domésticas y de diversas industrias (metalúrgicas, fábricas de baterías y pinturas) en los cuerpos de agua han incrementado su concentración en esos ecosistemas, disminuyendo su utilización como agua potable y para fines agrícolas e industriales (Weng, 2002; Fouladi et al., 2011)

La remoción de níquel por métodos químicos convencionales como, precipitación, filtración, intercambio iónico, oxidación-reducción, son caros e ineficaces, especialmente cuando la concentración de metales es baja (24-27 ppm). Esto es importante ya que el valor recomendado de níquel en agua potable por Environmental Protection Agency (EPA) (2010) es de 0,1 mg/l, mientras la OMS considera como valor de referencia 0,07 mg/l.

Una alternativa para disminuir el contenido de metales en soluciones acuosas, es emplear procesos biotecnológicos que utilizan microorganismos que tienen la capacidad de remover metales, mediante mecanismos tales como adsorción a las superficies de las estructuras biológicas, quelación, precipitación o absorción (Matheickal et al., 1999; Tan & Cheng, 2003; Rodríguez & Quesada, 2006; Sarkar et al., 2010). Estos mecanismos están regulados por el pH, el tipo y la concentración de los ligandos, y por el estado redox del sistema, especialmente en aquellos de remoción por adsorción, en el cual el metal se fija a la superficie del adsorbente (Haluk & Yetis, 2001; Anaya & Encinas, 2007; Fouladi et al, 2011).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de *Aspergillus niger* GC1 para remediar níquel (II) en soluciones acuosas, estudiar la influencia del pH y concentración de níquel (II) sobre el crecimiento de hongo y en la remediación del metal; y proponer el mecanismo de biorremediación de Ni (II) por el microorganismo empleado.

MATERIALES Y MÉTODO

Microorganismo: Se utilizó una cepa de *Aspergillus niger* GC1, obtenida del cepario del Instituto de Biotecnología, de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT. La misma se activó mensualmente por repiques sucesivos en medio Czapeck y se mantuvo a 4°C.

Solución de conidios: La solución de conidios se preparó adicionando conidios de *A. niger* GC1 en solución fisiológica y 1 gota de Tween 80, hasta alcanzar una DO de 0,250, para una longitud de onda de 560 nm, equivalente a 2×10^6 conidios/ml. El inóculo se agregó al medio de producción al 10 % (v/v).

Condiciones de cultivo: En todos los ensayos se utilizó un medio de producción que tiene la siguiente composición, en g/l: 3, NaNO₃; 1, K₂HPO₄; 0,5, MgSO₄ 7 H₂O; 0,5, KCl y 10, glucosa; Todos los experimentos se realizaron en un agitador rotatorio termostatzado, a 28 °C y 250 revol/min durante 96 h de incubación. Las concentraciones de Ni (II) y el pH del medio de cultivo se indicarán en cada ensayo.

Estudios de remoción de Níquel II:

Efecto de diferentes concentraciones de Ni (II):

A partir de una solución madre de 50 mg/l de NiCl₂, se extrajeron distintos volúmenes y se agregaron a 50 ml de medio de producción, para obtener diferentes concentraciones de Ni (II): 1,5 y 3,0 mg/l. El medio se llevó a pH 5,5 y se esterilizó a 120 °C durante 10 min. Posteriormente se agregó 5 ml de inóculo de *Aspergillus niger* GC1. Paralelamente se realizaron dos controles: a) Medio de producción que contiene la suspensión de conidios de *A. niger* GC1, en ausencia de iones Ni (II) y b) Medio de producción con las diferentes concentraciones de Ni (II) sin el agregado del microorganismo. Este último, se realizó para determinar que la remoción del metal no se produce por retención de los compuestos orgánicos del medio.

Influencia de pH :

El medio de producción que contiene 1,5 mg/l y 3,0 mg/l de Ni (II) se llevó a diferentes pH: 4,5 y 5,5, con H₂SO₄ (20%) o NaOH (20%). Se esterilizó a 121 °C, 10 min, se enfrió y se agregó 5 ml de la suspensión de conidios. Paralelamente se realizaron dos controles, a) medio de producción a distintos pH (4,5 y 5,5) y con la suspensión de conidios al 10 % (v/v), en ausencia de Ni (II) y b) medios a diferentes pH con 1,5 y 3,0 mg/l de Ni (II), en ausencia del microorganismo.

Mecanismo de detoxificación de Ni (II) por *A. niger* GC1:

50 ml de medio de producción (50 ml) a pH 4,5, se suplementó con 3 mg/l de Ni (II) y se agregó 5 ml de la suspensión de conidios del hongo. Los ensayos se incubaron en un agitador termostatzado a 28 °C, 250 revol/

min durante 96 h. El micelio se recuperó por filtración con papel de filtro Whatman N° 1 y se lavó con agua desionizada. El agua de lavado se guardó para medir Ni (II) adsorbido a la pared celular. Posteriormente, al micelio lavado se agregó 5 ml de agua desionizada, se molió en un mortero hasta obtener una mezcla homogénea y se filtró con membrana de acetato de celulosa (0,45 mm). El filtrado obtenido se usó para determinar Ni (II) intracelular.

Determinaciones:

La biomasa se recuperó del medio fermentado por filtración, con papel de filtro (Whatman N° 1), se lavó varias veces con agua destilada y se secó a 105°C hasta peso constante. El Ni (II) residual, se realizó por Espectroscopia de Absorción Atómica – Llama (EAA). Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de la Sección Química de Productos Agroindustriales de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes.

Reproducibilidad:

Todos los ensayos se realizaron 2 veces por duplicado y los valores reportados son el promedio de 4 valores independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente para obtener la desviación estándar con un MS-Excel. Los valores promedio fueron comparados, usando anova, a $P < 0.05$ y en un F-test.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes concentraciones de Ni (II):

Los resultados obtenidos mostraron que con las distintas concentraciones de níquel divalente (1,5 y 3,0 mg/l) no se produjo inhibición del crecimiento celular, ni hubo variación morfológica de los pellet de *A. niger* GC1, respecto al control. En la figura 1, se observa que con las concentraciones del metal ensayadas, se obtuvo un 21 % más del valor de biomasa respecto al control (sin níquel), nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores (Tobin et al., 1984; Sarkar et al., 2010) y sugieren que el níquel sería utilizado durante los procesos metabólicos del hongo, ya que se encontraron muchas enzimas que requieren Ni (II) como grupo prostético o cofactor (Hernández Estévez, 2009). Por el contrario, *Artemia franciscana* se vio afectada con concentraciones de 3,0 mg/l o mayores de NiCl₂ (Jiménez et al., 2006).

Efecto del pH:

El pH es uno de los parámetros más importante en los procesos de remediación de metales pesados por biomasa viva y biomasa inactiva. Esto se debe a que, a pH ácidos se encuentra mayor cantidad protones, mientras que a pH alcalinos, hidroxilos, en el medio de cultivo. Estos iones producen la alteración de los sitios de unión del metal a la pared celular de la célula, el transporte al interior del

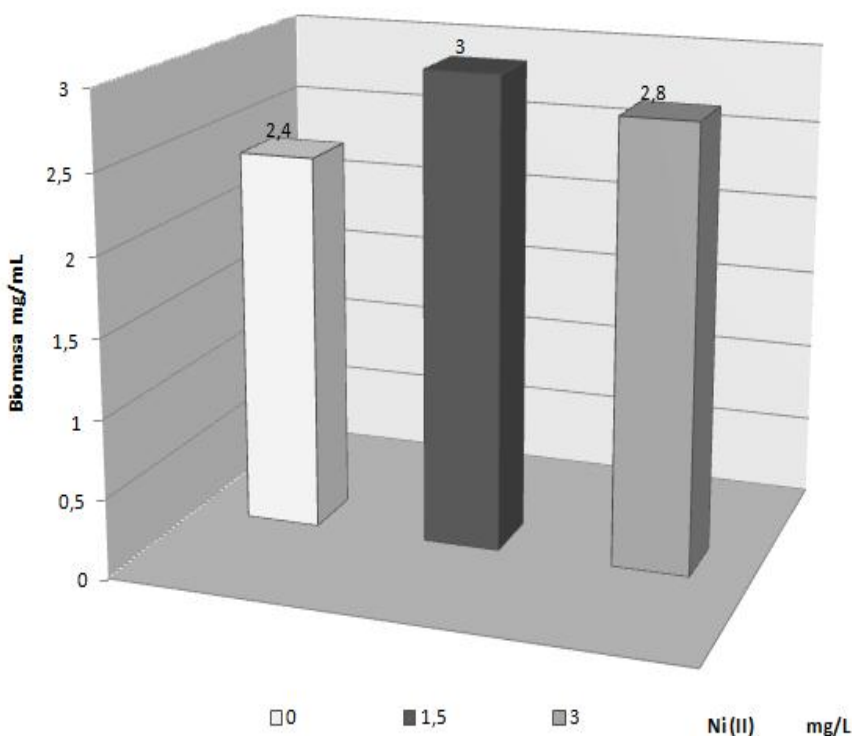


Figura 1: Efecto de la concentración de Ni(II) sobre el desarrollo de *Aspergillus niger* GC1. (II): Control, sin Ni (II) (□); 1,5 (■) y 3,0 mg/l (▒) de Ni (II). Los valores fueron obtenidos a las 96 h de incubación.

organismo, o la especiación del metal, modificando la interacción entre ellos (Hernández Estévez, 2009).

Los resultados muestran que la variación del pH tiene mucha influencia sobre la remoción de Ni (II) por *A. nigerGCI* en solución acuosa. A pH 4,5 se obtuvo la eficiencia más alta de biorremediación del metal de la solución a tratar, con un 60 y 73 % de remoción para 1,5 y 3,0 mg/l de Ni (II), respectivamente. Estos resultados coinciden con los de Volesky & Holand (1995) y Hernández Estévez (2009), quienes obtuvieron la máxima remoción de níquel (II) a pH 4,0. Mientras que difieren de aquellos encontraron con algas marinas, con la cual se obtuvo mayor remoción a pH superiores a 5,00 (Matheickal et al., 1999). La máxima eficiencia de biorremediación con *A. niger GCI* se obtuvieron a las 96 h de incubación, mientras que la máxima remoción de níquel (91%) reportado por Sarkar et al. (2010), fue a los 7 días de incubación.

A pH 5,5 solo se obtuvo una eficiencia del 60% de remoción de Ni (II) cuando la concentración fue de 1,5 mg/l. Mientras que con 3,0 mg/l del metal, la eficiencia de biorremediación disminuyó a un 17 %.

Distribución de Níquel en la masa celular de *Aspergillus nigerGCI*.

El níquel se considera un micronutriente esencial para los seres vivos, pero existe una concentración dada del metal que resulta tóxica para un organismo (Matheickal et al. 1999; Jiménez et al., 2006; Hernández Estévez, 2009; Sarkar et al., 2010). De acuerdo a los ensayos realizados, el desarrollo de *A. nigerGCI*, no fue inhibido cuando se cultivó con 3,0 mg/l de Ni (II). Cabe preguntar, el metal fue absorbido por el hongo o un gran porcentaje se encuentra adsorbido en la pared celular. Para dilucidar este interrogante se

realizaron ensayos a fin de determinar la ubicación del metal en la estructura del hongo (Figura 2).

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que un 57,8 % se encontró en el interior celular con respecto a la concentración inicial de Ni(II) (3 mg/l). Esto sugiere que parte del metal fue utilizado en el metabolismo celular, lo cual se confirma por el aumento de la masa celular respecto al control (Figura 1), posiblemente la mayor parte se encontraría retenido o incluido en la vacuola del microorganismo, a fin de disminuir la toxicidad del metal.

En la figura 2 se observa que un bajo porcentaje de Ni(II) se determinó en aguas de lavado. Este resultado muestra que, en nuestro caso, una mínima concentración del metal se encontraría unida a la pared celular del hongo, y sugiere que éste sería el primer paso, para ingresar al interior de la célula fúngica. El porcentaje de Ni (II) restante se determinó en el medio a biorremediar (Figura 2).

CONCLUSION

Se determinó que *Aspergillus nigerGCI* tiene potencial para ser utilizado en los procesos de biorremediación de Níquel (II). Su desarrollo no fue inhibido cuando se incubó en medios que contienen 1,5 y 3,0 mg/l del metal. La máxima eficiencia de biorremediación del Níquel (II) fue de un 60 y 73 %, a pH 4,5 con ambas concentraciones del metal.

Proponemos que el mecanismo de detoxificación de la célula fúngica sería como primer paso, la adsorción del Ni (II) en la pared celular del hongo, y en segundo paso, su incorporación al interior celular para ser almacenado o secuestrado, posiblemente en la estructura vacuolar, a fin de disminuir la toxicidad del metal en el citoplasma celular.

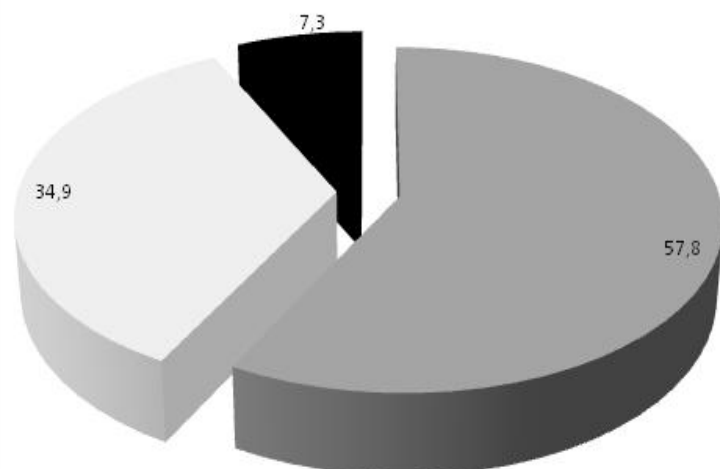


Figura 2: Distribución de Ni (II) en aguas de lavado de la superficie del micelio (■), en el interior de *Aspergillus niger GCI* (□) y en el medio de producción (▣).

REFERENCIAS

- Anaya, D. & Encinas, L.** (2007) Determinación de Metales pesados en agua residual en proceso de galvanoplastia. En: Boletín Ambiental ([http:// www.estrucplan.com.ar](http://www.estrucplan.com.ar))
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine (ATSDR)** (2000) www.atsdr.cdc.gov
- EPA** (2010) Agencia de Protección Ambiental de los EEUU. [http://: www.epa.gov](http://www.epa.gov).
- Fouladi, R.; Gholamreza, F.; Bidhendi, N. & Azimi, A.** (2011) Biosorption of nickel from batch reactor using the powder of waste activated sludge. Res. J. environ. Sciences. 5: 461-470.
- Haluk, I & Yetis, U.** (2001) Biosorption of Ni (II) and Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system kinetics. Water CA. 27: 15-20.
- Hernández Estévez, A** (2009) Biosorción de níquel divalente por materiales biológicos inactivos [http:// itzamna.bnct.ipn.mx](http://itzamna.bnct.ipn.mx) (tesis on line)
- Jiménez, J.; Gelabert, R. & Brito, R.** (2006) Efectos tóxicos del níquel y zinc en *Artemia franciscana* (Crustácea-Branchiopoda: Anostraca) Universidad y Ciencia 22: 65-74.
- Matheickal, J.; Yu, Q. & Woodbrun, G** (1999) Biosorption of Cadmium (II) from aqueous solutions by pretreated biomass of marine algae *Durvillaea potamogetonum*. Water research. 33: 335-342.
- Nieminen, T.M.; Ukonmaanaho, L.; Rausch, N. & Shotyk, W** (2007). Biogeochemistry of Nickel and Its Release into the Environment. En: Sigel A.; Sigel H.; Sigel R. K.O.(Eds.). Metal Ions in Life Sciences Nickel and Its Surprising Impact in Nature. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England. Cp2: 1-21.
- Roberts, R.; Julian, J.; Muir, D. & Shannon, H.** (1989) A study of mortality in workers engaged in the mining, smelting, and refining of nickel. . II: La mortalidad por cáncer de las vías respiratorias y los riñones Toxicol Ind Salud 1989 Dec; 5 (6) :975-993 [PubMed] II: Mortality from cancer of the respiratory tract and kidney. Toxicol Ind Health. 5: 975-993.
- Rodríguez, C. & Quesada - Rodríguez, E.** (2006) Biosorción de níquel por *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de aguas residuales industriales. Braz. J. Microbiol. 37: 465-467.
- Tan, T. & Cheng, P.** (2003) Biosorption of metals ions with *Penicillium chrysogenum*. Appl. Biochem. Biotechnol 104: 119-128.
- Tobin, J.; Cooper, D. & Neufeld, R.** (1984) Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 821-824.
- Sarkar, S. & Margules, C.** (2002) Operationalizing Biodiversity for Conservation Planning. J. Biosciences, 27: 299-308
- Sarkar, S; Satheshkumar, A; Jayanthi, R & Premkumar, R** (2010). Biosorption of Nickel by Live Biomass of *Trichoderma harzianum*. Res. J. Agric. Sciences. 1: 69-74.
- Volesky, B. & Holand, Z.** (1995). Biosorption of heavy metals. Biotechnol. Prog. 11: 235-250.
- Weng, Ch.** (2002) Removal of nickel (II) from dilute aqueous solution by sludge-ash. J. environ. Eng. 128: 716-722.