
La bioencapsulación como alternativa en la remediación biológica de aguas

**García, Ma. Cecilia¹; Bruschi, Julieta¹; Alonso, Mónica¹; Romanelli, Agustina¹;
Sansinanea, Aldo¹.**

1. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA- Tandil-
Campus Universitario- 7000 Tandil- Buenos Aires- Argentina

mcg@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 9 de octubre de 2015

Publicado: 30 de diciembre de 2015

RESUMEN

Los compuestos nitrogenados son unos de los contaminantes más importantes de las aguas residuales. Si bien nitratos y nitritos forman parte del ciclo del nitrógeno en la naturaleza, las actividades realizadas por el hombre han llevado a un aumento de los mismos. Cuando estos compuestos se encuentran en concentraciones que superan los niveles aceptables, causan problemas de salud tanto humana como animal y contaminación ambiental. Existen métodos de remediación de agua tanto físicos, químicos como biológicos. Los primeros son soluciones parciales, en la mayoría de los casos trasladan el contaminante de un lugar a otro, los segundos son una solución pero la biomasa involucrada en estas técnicas es un problema en sí mismo. La bioencapsulación es una alternativa a este problema, los procesos acotados que se realizan permiten el manejo y la eliminación de la biomasa empleada en los mismos. Este trabajo presenta las experiencias realizadas para adaptar la encapsulación de bacterias desnitrificantes en el proceso de remoción de nitratos y nitritos en agua. La misma se realizó empleando alginato de sodio sobre cloruro de calcio y como microorganismo desnitrificante una cepa de referencia *Pseudomonas stutzeri*. Las capsulas obtenidas se enfrentaron a soluciones de nitrato y nitrito y se determinó la disminución de los mismos por Kits comerciales. Se lograron obtener estructuras esféricas, sumamente homogéneas. A las 24 h de acción desnitrificante se obtuvieron valores admitidos para nitratos, siendo necesario mayor tiempo de acción para la disminución de los nitritos. Fue posible la reutilización y conservación de las estructuras. Estos resultados proponen a la bioencapsulación como una metodología interesante a ser aplicada en la remediación de aguas con alto contenido de nitratos.

Palabras clave: Bioencapsulación, desnitrificación, nitratos, nitritos, *Pseudomonas stutzeri*.

ABSTRACT

Nitrogen compounds are one of the most important water pollutants. Nitrates and nitrites are part of the nitrogen cycle in nature but men activities increase them. High concentration of these compounds cause human and animal health problems and environmental contamination. There are chemical and biological water remediation methods. The first one is a partial solution because it moves the contaminant to different places, while the second one involves biomass contamination.

Bioencapsulation is an alternative to this problem because it allows handling and elimination of the biomass used. The main purpose of this paper is to adapt denitrification method by *Pseudomonas stutzeri* using encapsulation with sodium alginate and calcium chloride. The spheres are suspended in nitrate and nitrite solutions and their levels were tested by commercial kits. Spherical and homogeneous structures were obtained. After 24hs of denitrifying activity we obtained values below the threshold limits for nitrate, whereas for nitrites was necessary longer time. Spheres were reused and its structures were conserved. These results suggest that the bioencapsulation could be a useful methodology to be applied in water remediation with high levels of nitrates.

Keywords: Bioencapsulation, denitrification, nitrates, nitrites, *Pseudomonas stutzeri*.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua es fundamental e indispensable para la vida en nuestro planeta. La acelerada explosión demográfica provoca una demanda de la misma cada vez mayor y origina gran cantidad de aguas residuales. En los países en desarrollo alrededor del 90% de estas son descargadas directamente en ríos, lagos y mares sin ningún tratamiento de remediación. Se estima que cada año mueren 5 millones de personas por enfermedades transmitidas por el agua (Freeman, 2001). Esto genera problemas de disponibilidad, salud y contaminación ambiental.

Entre los contaminantes inorgánicos más importantes se encuentran los compuestos nitrogenados, siendo éste un problema reportado por numerosos autores en los últimos años a nivel mundial (Alexander et al., 2000; McIsaac et al., 2002; Rabalais et al., 2002; Criss and Davisson, 2004, Ward et al., 2005). Esta realidad se repite en diversas provincias de Argentina (Petcheneshky, 1988, Fernández, 2005, García et al., 2005, 2007, Barranquero, 2006, Ruiz de Galarreta et al., 2010, López et al., 2011).

Los ciclos biogeoquímicos describen el movimiento de materia a través de reacciones en toda la biosfera de manera cíclica. Los compuestos nitrogenados forman parte de este ciclo fundamental en la naturaleza, sin embargo el hombre ha contribuido en gran medida alterando el mismo. Se estima que en los últimos 100 años, se ha duplicado la cantidad de nitrógeno fijado en la biosfera, principalmente por las industrias químicas y agroquímicas (Galloway, 1998, Breemen, 2002). Entre los efectos adversos que generan la alteración de este ciclo se encuentran la acumulación de diversos intermediarios; no sólo nitrato, principal contribuyente de la eutrofización en cuerpos de agua, sino también los óxidos nítrico y nitroso que transferidos a la atmósfera contribuyen con el efecto invernadero (Soares, 2000).

Trabajos publicados sobre la contaminación de los cursos de agua por nitratos, concluyen claramente que el lixiviado de los fertilizantes agrícolas es la principal fuente no puntual de contaminación. Otras causas del nitrógeno antropogénico son la quema de combustibles fósiles y el cultivo de ciertos productos agrícolas como las legumbres (Fields, 2004).

La presencia de nitratos en agua no sólo genera alteraciones en el ambiente sino que tiene efectos adversos sobre la salud, tanto humana como animal. En nuestro país existen normas que establecen los límites máximos para nitratos y nitritos en el agua de consumo humano. El Código Alimentario Argentino (CAA) determina en el Capítulo

XII – Artículo N° 982, las características físicas, químicas y bacteriológicas que deberá cumplir el agua para ser considerada potable, fijando las concentraciones máximas permitidas: Nitrato 45 mg/l, Nitrito 0,10 mg/l (CAA, 2012). Cuando los nitratos se encuentran por encima de los valores permitidos puede causar metahemoglobinemia, patología que afecta principalmente a bebés menores de tres meses y embarazadas. Además el consumo excesivo de nitratos se ha relacionado estrechamente con la presencia de cáncer gástrico (Yang et al., 1998; Knobeloch et al., 2000; Ward et al., 2005, Umbreit, 2007)

Estas circunstancias han llevado a desarrollar métodos físicos, químicos y biológicos para paliar las consecuencias generadas por este contaminante. El uso de los primeros está limitado por los altos costos y problemas operativos, además estos protocolos no resuelven el problema real ya que en la mayoría de los casos trasladan el contaminante de un lugar a otro. Los métodos biológicos se basan principalmente en la desnitrificación, mecanismo principal por el que el nitrógeno del suelo y medios acuáticos, vuelve a la atmósfera (Conrad, 1996; Philippot, 2005 a y b). Existe una gran variedad de bacterias, que en condiciones adecuadas transforman los nitratos en dióxido de carbono y nitrógeno gaseoso (Tavares et al., 2006).

La ventaja del uso de la desnitrificación en el tratamiento de aguas residuales sobre otros sistemas, reside en la posible eliminación simultánea de compuestos nitrogenados y de una amplia variedad de compuestos orgánicos, que van desde los fácilmente oxidables, como los ácidos grasos, hasta compuestos de difícil oxidación, como los derivados del petróleo (Cervantes –Carrillo et al., 2000).

La desnitrificación biológica ofrece una posible solución para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de nitratos, sin embargo el manejo y la eliminación de la biomasa generada en este proceso es un problema en sí mismo. Si bien solucionaría la problemática de los nitratos, se originarían aguas contaminadas microbiológicamente. Es aquí donde los procesos que pueden realizarse a través de la encapsulación cobran un papel fundamental, porque facilitan el manejo y la eliminación de la biomasa involucrada en el mismo.

La encapsulación es un proceso de fabricación de pequeñas esférulas constituidas por un núcleo central, que puede contener materiales de diversa índole, recubierto por una estructura que hace las veces de membrana semipermeable (Chang, 1984). De esta manera enzimas, células, bacterias, toxinas u otras sustancias son inmovilizadas en

matrices de polímeros, pudiendo usarse para la liberación sostenida y/o controlada de fármacos, sabores, aromas, perfumes, fertilizantes y otros (Popplewell et al., 1995, Park y Chang, 2000). La gelificación iónica es uno de los métodos de encapsulación que consiste en la formación de una cubierta por reacción entre una solución polimerizadora y un ión de carga opuesta. Sustratos y productos de bajo peso molecular pueden difundir libremente dentro y fuera de las esférulas de alginato, sin verse afectados por el tamaño de poro del gel. Esto hace posible la múltiple reutilización de enzimas, bacterias u otros materiales al no haber posibilidad de su dispersión en el medio ambiente (Park y Chang, 2000).

Ante la necesidad de buscar estrategias de remediación para mantener la concentración de nitratos dentro de valores admisibles, este trabajo propone adaptar la tecnología de la bioencapsulación en la desnitrificación de agua como posible herramienta de remediación ambiental. Teniendo como objetivo generar conocimientos que posibiliten el desarrollo de un sistema desnitrificante viable técnica y económicamente.

METODOLOGÍA

-Selección de microorganismos: en ensayos previos se comparó la acción desnitrificante de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588, *Pseudomonas fluorescens*, ATCC 13525, *Escherichia Coli* HB 101 y *Flavimonas*, sobre caldo nitrato a 26°C. La cepa que presentó mayor efecto fue *Pseudomonas stutzeri*, la cual se seleccionó para este trabajo (García et al, 2012).

-Obtención de cápsulas por gelificación iónica: se utilizó solución acuosa al 2% de alginato de sodio, a la cual se incorporaron 10% de suspensiones bacterianas de *Pseudomonas stutzeri* con una concentración de 10^7 UFC/ml. Esta solución se hizo gotear por medio de una bomba peristáltica con un flujo de 10 ml/h sobre una solución de cloruro de calcio 0,1 M en agitación (400 rpm) y tiempo de endurecimiento de 15 minutos.

-Caracterización de las estructuras: una vez obtenidas las cápsulas se caracterizaron por observación microscópica determinando el tamaño de partículas con el soporte Pinnacle Systems Software Pro. Posteriormente se realizaron los cálculos de rendimiento (peso cápsulas/ peso material x 100) y porcentaje o eficacia de atrapamiento (cantidad de bacteria encapsulada/ cantidad de bacteria utilizada x 100).

-Pruebas de desnitrificación: se colocó 1g de cápsulas en 5 ml de soluciones estándar de nitrato (100 mg/l) y nitrito (80 mg/l) respectivamente. Las mismas fueron mantenidas en condiciones controladas de temperatura (26°-30°C) por un período de cuatro días. Cada 24 h se determinó el contenido de nitrato y nitrito remanente por medio de los Kits comerciales AQAssay GL Lab.

-Reutilización y conservación de las cápsulas: una vez finalizado el período de ensayo las capsulas fueron coladas lavadas con agua destilada estéril y colocadas nuevamente en soluciones de nitrato y nitrito. En forma paralela 1g de cápsulas se conservó en 5 ml de agua destilada estéril a 4°C para observar la supervivencia de los microorganismos y su acción desnitrificante.

-Análisis de datos: los resultados se indican como valores promedio $\pm$ error estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la metodología mencionada anteriormente se lograron estructuras insolubles con membrana semipermeable reteniendo en su interior los microorganismos. Las cápsulas fueron sumamente regulares, esféricas de $2,20 \pm 0,08$ mm de diámetro, con un espesor de membrana de $225 \pm 10 \mu\text{m}$. La eficacia de la encapsulación resultó del 85-90%, con un rendimiento de producción del 63-65%. En la figura 1 se observan algunas de las estructuras obtenidas.

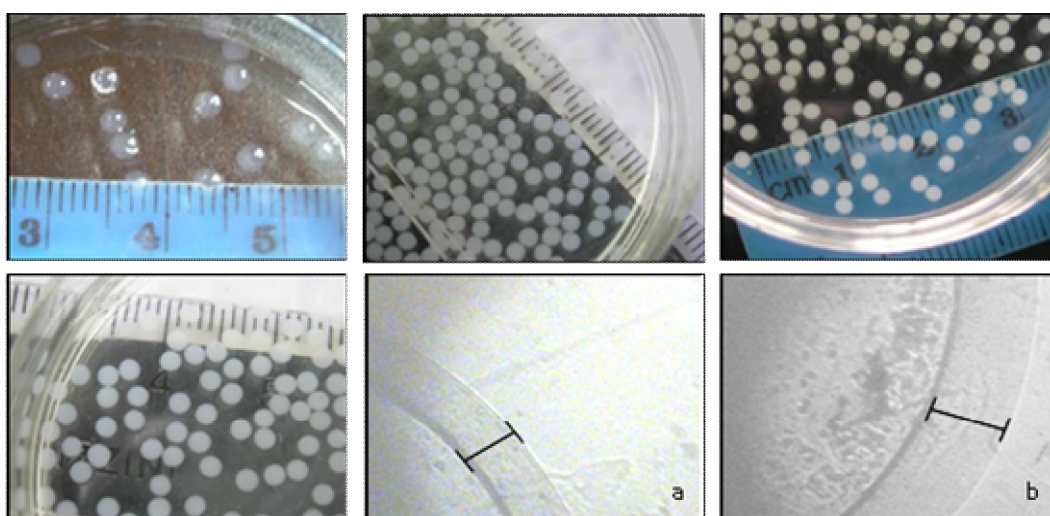


Figura 1. Cápsulas obtenidas y escala de referencia. Con vector se indica el espesor de membrana Aumento empleado en la observación: 200x (a) y 400x (b).

Con estas cápsulas la concentración de nitratos inicial (100 mg/l) disminuyó a $49,84 \pm 1,25$ mg/l a las 24 h, valores aceptables según CAA. Este efecto desnitrificante continuó hasta las 72 h donde se estabilizó y permaneció constante hasta las 96 h, observándose valores de $5,24 \pm 0,23$ mg/l. Se observó el mismo comportamiento sobre la solución de nitritos, si bien se requirió más tiempo de acción y se alcanzaron concentraciones $0,2 \pm 0,015$ mg/l en los tiempos ensayados. Los resultados obtenidos con *P. stutzeri* en la eliminación de nitrato, fueron similares y en algunos casos superiores a los obtenidos en tratamientos de remediación de aguas con fangos bacterianos o reactores de flujo continuo (Cervantes- Carrillo et al., 2000).

Las cápsulas reservadas en agua a 4°C mantuvieron su viabilidad durante 4 meses, demostrando la estabilidad de su membrana, no se observó el pasaje de microorganismos al medio acuoso.

Es importante destacar que si bien la acción desnitrificante disminuyó con la segunda aplicación, la reutilización de las cápsulas fue posible. Esto coincide con los trabajos de remoción empleando *Microvirgula aerodenitrificans* en alginato (Saucedo et al., 2001).

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo, demuestran que la bioencapsulación es una metodología que puede ser adaptable y transferible para la remediación de aguas residuales con alto contenido de nitratos. Las reacciones de este sistema, impiden la liberación de los microorganismos al medio y evita la contaminación bacteriana del agua. Al mismo tiempo permite la extracción de las cápsulas con el valor agregado de su reutilización. Esta es una gran ventaja por sobre los métodos de remediación biológica que utilizan fangos bacterianos o reactores de alimentación continua.

Este es un punto de partida interesante para el tratamiento de aguas residuales a gran escala. La simplicidad de la metodología, el bajo costo ambiental y la factibilidad económica, hacen de la bioencapsulación una herramienta promisorio para el mejoramiento de la calidad del agua.

BIBLIOGRAFÍA

Alexander, R. B., Smith, R.A. and Schwarz, G. E. (2000). Effect of the stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. *Nature*, 403(17), 758-761.

- Barranquero, R., Ruiz de Galarreta, A. y Banda Noriega, R. (2006). Evaluación de nitratos en los pozos de explotación en la ciudad de Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Memorias VIII Congreso Latinoamericano de Hidrología Subterránea. Asunción, Paraguay.* p-29.
- Breemen, N. V. (2002). Nitrogen cycle: Natural organic tendency. *Nature*, 415, 381-382.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. y Gómez, J. (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 42, 73-82.
- Chang, T. M. S. (1984). Artificial cells in medicine and biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol*, 10, 5-24.
- CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. Capítulo XII. "Bebidas hídricas, agua y agua gasificada". Agua potable. Artículo 982 (Res MSyAS N° 494 del 7/07/1994). (Actualizado 2012).
- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O and NO). *Microbiol. Rev.* 60, 609-640.
- Criss, R. E. and Davisson, M. L. (2004). Fertilizers, water quality and human health. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 536.
- Fernández, N. R. (2005). *Estudio de la concentración de nitratos, nitritos y amonio en el agua de consumo del Pdo. Moreno-Pcia de Bs. As.* Facultad de Ingeniería. Universidad de Flores.
- Fields, S. (2004). Global nitrogen. *Environmental Health Perspective*, 112(10), 556-563.
- Freeman, K. (2001). The future of fresh water. *Environmental Health Perspectives*, 109 (4), 158.
- Galloway, J. N. (1998). The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environ. Pollut.*, 102(S1), 15-24.
- García, C., Díaz, O., Martín, V. y García, M. C. (2007). Mediciones de nitratos en aguas de la ciudad de Tandil, con determinaciones de áreas de mayor concentración espacial de riesgo. *I Simposio Nacional de Estudio de Contaminantes en Agua y Salud*. Organizado por el CIG y el IFAS, UNCPBA, Tandil. 12-14 Abril. p -16.

- García, M. C, García, M., Cerone, S. y Sansinanea, A. (2005). Contenido de nitratos en aguas del partido de Tandil. *Ponencia III Congreso Argentino de Química Analítica*. Merlo, San Luis, 16-18 de noviembre.
- García, M. C, Bruschi, J., Cerone, S, y Sansinanea, A. (2012). Selección de la cepa bacteriana para la desnitrificación de agua. *II Jornadas Interdisciplinarias "Ciclo del Agua en Agroecosistemas"*. 12-14 de Septiembre. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA. Bs As.-Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A., Postle, J. and Anderson, H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ Health Perspect.*, 108, 675-678.
- López, C, Macaño, H. y Arijón, G. (2011). Evaluación de fuentes de nitratos en aguas subterráneas de la localidad de Salsipuedes (Córdoba) por análisis de factores. *Presentación en XXIII Congreso Nacional del Agua*. Resistencia, Chaco, Argentina 22 al 25 de junio.
- Mclsaac, G. F., David, M. B., Gertner, G. Z. and Goolsby, D. A. (2002). Nitrate flux in the Mississippi river. *Nature*, 414(8), 166-167.
- Park, J.K. and Chang, H.N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.*, 18, 303-319.
- Petcheneshky, T. (1988). *Evaluación del Nivel de Nitratos en Agua de Bebida en los partidos del Gran Buenos Aires*. Dirección Nacional de Calidad Ambiental, Ministerio de Salud y Acción Social. Buenos Aires.
- Philippot, L. (2005a). Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Trans.*, 33, 200-4.
- Philippot, L. (2005b). Denitrification in pathogenic bacteria: for better or worst?. *Trends Microbiol.*, 13,191-2.
- Popplewell, L. M, Black, J. M., Norris, L. and Porzio, M. (1995). Encapsulation systems for flavors and colors. *Food Technol.*, 49(5), 76-82.
- Rabalais, N., Turner, R. and Wiseman Jr., W. J. (2002). Gulf of Mexico hypoxia A.K.A. "The dead zone". *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 33, 235-263.
- Ruiz de Galarreta, V., Banda Noriega, R., Barranquero, R., Diaz, A., Rodriguez, C. y Miguel, R. (2010). Análisis integral del sistema hídrico, uso y gestión. Cuenca del arroyo Languayú, Tandil, Argentina. *Boletín Geológico y Minero*, 121(4), 343-356.

Saucedo, V., Cruz, D., Rustrian, E., y Houbon, E. (2001). Estrategias de bioaumentación con *Microvirgula aerodenitrificans* en un SBR para remoción biológica de nutrientes. *IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* 10-14 Septiembre. Veracruz. OVI-16.

Soares, M. I. M. (2000). Biological denitrification of groundwater. *Water, Air, and Soil Pollution.*, 123, 183-193.

Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. and Moura, I. (2006). Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J Inorg Biochem.*, 100(12), 2087-100.

Umbreit, J. (2007). Methemoglobin-It's not just blue: a concise review. *American Journal of Hematology*, 82,134-144.

Ward, M. H., deKok, T. M., Levallois, P., Brender, J., Gulis, G., Nolan, B. T. and VanDerslice, J. (2005). Workgroup report: drinking-water nitrate and health-recent findings and research needs. *Environmental Health Perspectives.*, 113(11), 1607-1614.

Yang, C. Y., Cheng, M. F., Tsai, S. S. and Hsieh, Y. L. (1998). Calcium, magnesium, and nitrate in drinking water and gastric cancer mortality. *Jpn j. Cancer Research.*, 89 (2), 124-130.