



EVALUACIÓN IN VITRO DE LA REMOCIÓN DE PLOMO EN AGUAS RESIDUALES POR *Photobacterium damsela*

IN VITRO EVALUATION OF LEAD REMOVAL IN WASTEWATER BY *Photobacterium damsela*

Lenin J. Ramírez Cando^{1,2}, Santiago P. Guerra Guevara²,
Gabriela A. Reinoso Molina²

¹ Grupo de investigación en Ciencias Ambientales (GRICAM)-Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador, Rumichaca y Morán Valverde s/n-Quito, Tel. (+593) 2 3962900/ 3962800

² Carrera de Ingeniería Ambiental-Universidad Politécnica Salesiana, Quito-Ecuador, Rumichaca y Morán Valverde s/n-Quito, Tel. (+593) 2 3962900/ 3962800

*Autor para correspondencia: lramirez@ups.edu.ec

Manuscrito enviado el 17 de enero de 2017. Aceptado, tras revisión, el 27 de abril de 2017. Publicado el 1 de septiembre de 2017.

Resumen

Con la finalidad de mitigar los impactos ambientales ocasionados por plomo en aguas residuales de sectores como: minero, petroquímico, metalúrgico, otros, se realizó una evaluación in vitro de la remoción de plomo utilizando *Photobacterium damsela*. En la fase de aislamiento y bioestimulación las cepas obtenidas fueron sometidas a un proceso de selección en un medio de cultivo modificado, al cual se añadieron concentraciones de 20 y 100 ppm de Pb, obteniendo finalmente la cepa pura que mostró resistencia y/o tolerancia al Pb. La determinación de la capacidad para remover Pb en aguas residuales se observó en dos condiciones: incubación en temperatura controlada (25°C) e incubación en temperatura ambiente de Quito-Ecuador (zona sur a 2 800 msnm). La caracterización bioquímica de la bacteria fue realizada utilizando el Kit de Microgen GN-ID A+B. En la elaboración de las curvas de cinética de crecimiento bacteriano y remoción de Pb, se utilizaron técnicas de turbidimetría y absorción atómica, se destaca que *Photobacterium damsela* presentó una mayor facilidad de crecimiento a un máximo de 72 horas y a una concentración de 20 ppm en incubación a temperatura ambiente lográndose una remoción de hasta el 69% del plomo en el medio. De lo cual se infiere el potencial que tiene esta bacteria y se abren oportunidades para continuar estudios a futuro.

Palabras claves: *Photobacterium damsela*, remoción, bioremediación, plomo, aguas residuales.

Abstract

In order to mitigate the environmental impacts caused by lead in wastewater from sectors such as: mining, petrochemical, metallurgical and others, an in vitro evaluation of lead removal using *Photobacterium damsela* was carried out. Considering isolation and biostimulation phase, obtained isolate was subjected to a selection process in a modified culture medium, to which concentrations of 20 and 100 ppm of Pb were added, finally obtaining the pure strain that showed resistance and /or tolerance to Pb. To determinate the remotion's capacity of Pb in wastewater two conditions were observed: incubation at controlled temperature (25°C) and incubation at room temperature in Quito-Ecuador (southern zone at 2800msnm). Biochemical characterization of the bacteria was performed using the GN-ID A + B Microgen Kit. In the development of bacterial growth kinetics curves and Pb removal curves, turbidimetry and atomic absorption techniques were used, it was noted that *Photobacterium damsela* presented a greater rate of growth to a maximum of 72 hours and a concentration of 20 ppm in incubation at room temperature achieving a removal rate of 69% of the lead in the medium. From this information, the potential of this bacterium is inferred and opportunities are opened to continue studies in the future.

Keywords: *Photobacterium damsela*, removal, bioremediation, lead, wastewaters.

Forma sugerida de citar: Ramírez, L., Guerra, S., Reinoso, G. 2017. Evaluación in vitro de la remoción de plomo en aguas residuales por *Photobacterium damsela*. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 26(2):64-71. pISSN:1390-3799; eISSN:1390-8596.

1 Introducción

Alrededor del mundo, el suelo y el agua se ven afectados principalmente por las industrias extractivas de metales y minerales no metálicos, que ya no solo afectan el entorno en forma de sales o elementos libres, sino también como parte de nanoestructuras y nanomateriales que traen potenciales riesgos para la salud humana y la de los ecosistemas (Coccini, Caloni, Ramírez-Cando y De Simone, 2016; Ramírez, 2015), muchos de ellos aún desconocidos. Entre las consecuencias directas podemos mencionar daños a los ecosistemas marinos y terrestres, que repercuten de manera negativa en las actividades económicas de las zonas afectadas (Greenpeace, 2008). En algunos casos los daños ocasionados al ambiente se pueden considerar irreversibles; es decir, cuando el daño cubre grandes extensiones de terreno y la remediación es muy complicada o costosa y afecta de manera considerable a las especies animales y vegetales, llegando inclusive a poner en riesgo su existencia.

Los adelantos industriales y tecnológicos de las últimas décadas han ocasionado graves problemas de contaminación ambiental con metales pesados. Según Romero (2009) las principales industrias responsables de esta contaminación son la minera, petroquímica y metalúrgica, entre ellos los contaminantes más comunes suelen ser: arsénico, cadmio, cromo y plomo (Guevara y Ramírez, 2015), muchos de éstos son elementos comunes de estudio en ecotoxicología.

Como mencionan Bustos, Garzón (2015), el sector metalúrgico genera cuatro tipos de contaminación: emisiones atmosféricas, residuos sólidos, emisiones líquidas y ruidos. Para autores como Ambuludi (2013), la generación de residuos sólidos es la que mayor contaminación produce, debido a que en los diferentes procesos metalúrgicos se generan residuos de metales pesados como plomo, níquel, cobre, zinc, mercurio, arsénico, cromo y cadmio, los cuales pueden acumularse en los organismos de seres vivos. Y ésta, de forma indirecta, contamina fuentes de aguas subterráneas, las cuales son las más difíciles de recuperar.

En pos de reducir los problemas de salud pública y ambiental ocasionados por las diferentes actividades industriales se han empleado varias técnicas de biorremediación como: la fitorremediación, que utiliza plantas para concentrar, transferir o destruir contaminantes (Volke y Velasco, 2002; Yáñez y Bár-

cenaz, 2012), tal es el caso de *Eichhornia crassipes*, una planta acuática perenne ampliamente estudiada para ser empleada en fitorremediación *ex situ*, principalmente como herramienta para la limpieza efectiva de efluentes contaminados con metales pesados, plaguicidas y colorantes vertidos por varias industrias (Guevara y Ramírez, 2015); otra de las técnicas empleadas para recuperar y limpiar estos ambientes contaminados es la remediación con bacterias, la misma que, según Sánchez y Rodríguez (2010), es considerada como una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos, específicamente su capacidad para degradar total o parcialmente una amplia gama de compuestos.

Algunos géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ferroxidans*, *Ralstonia*, *Acidobacillus* presentan capacidades muy interesantes como agentes remediadores, ya que son capaces de extraer metales de sustratos sólidos, pueden ser utilizadas como bioabsorbentes para la recuperación de metales y para el tratamiento de efluentes industriales. Es por esta razón que la aplicación de estas tecnologías y la ulterior búsqueda de una mejora continua se vuelven una necesidad imperante en cada uno de los procesos industriales.

Tomando en cuenta lo mencionado, el objetivo del presente estudio fue el de evaluar *in vitro* la capacidad de *Photobacterium damsela* (*P. damsela*) para remover plomo en aguas residuales sintéticas, el experimento fue realizado bajo dos condiciones de temperatura: incubación a temperatura controlada (25°C) en el Laboratorio del centro de investigación y valoración de la biodiversidad (CIVABI), campus Sur Universidad Politécnica Salesiana e incubación a temperatura ambiente (entre 5°C y 23°C para la zona sur de Quito en los meses de estudio). Se examinaron concentraciones que superaron 100 y 500 veces los límites máximos considerados por la legislación ecuatoriana.

2 Materiales y Métodos

2.1 Aislamiento y bioestimulación de bacterias

Las muestras de agua residual y sedimentos fueron obtenidas de los diferentes efluentes y lagunas de sedimentación de las industrias mineras, petroquímicas y metalúrgicas ubicadas en Esmeraldas y Zaruma; pertenecientes a la región costera del Ecuador, utilizando un método de muestreo aleatorio

simple. Para la bioestimulación se agregó una solución que contenía: 5g/L de extracto de levadura, 1g/L de cloruro de amonio y 0,1g/L de sal de Morh. Se dejó reposar, la mezcla 1:1 entre la solución y la muestra, durante 7 días.

Para el aislamiento se preparó medio sólido (Agar Cetrimida), a continuación se añadieron 20 ppm de plomo, posteriormente se inoculó 0,1 y 1 ml de cada muestra estimulada en cajas Petri, previamente esterilizadas, utilizando la técnica de siembra por inmersión y estriado, y se incubaron por 72 horas a 25°C. A continuación se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y se separaron las colonias que presentaron diferentes morfologías. El aislamiento bacteriano se realizó mediante siembra repetitiva de colonias obtenidas, con la técnica de agotamiento por estrías en placa de Agar Cetrimida, hasta llegar a obtener cajas con morfología uniforme. Para terminar la pureza del aislado se observó al microscopio la tinción de Gram con el fin de corroborar uniformidad de las cepas.

2.2 Caracterización bioquímica de bacterias

Se tomaron en cuenta los resultados de: i) la tinción de Gram; ii) la prueba de oxidasa; y iii) el perfil bioquímico, el cual se obtuvo utilizando el kit Microgen GN-ID A + B System, procediendo como indica el manual del usuario (Microgen 2015).

2.3 Análisis de la cinética de crecimiento bacteriano

Se consideraron como factores ambientales: viabilidad de crecimiento, temperatura, pH y como factor independiente la concentración de unidades formadoras de colonia. El inóculo se preparó con cepas aisladas que lograron adaptarse a concentraciones de 20 y 100 ppm de Pb en medio cetrimida.

Para la preparación del medio de cultivo líquido, se tomó en cuenta el procedimiento establecido por Ramírez y Coba (2012): 1 g de sulfato de amonio, 4 g de extracto de levadura, 5 g de sacarosa, aforado 1 litro con agua destilada. Y se añadió 15 ml de estándar de plomo Merck (1000 ppm) equivalente a 20 ppm de Pb. Para la segunda concentración se añadió 0,184 g de acetato de plomo que equivalen a 100 ppm de Pb. A continuación, se dispensó 500 ml de las preparaciones en cada uno de los matrazes inoculando con la cepa. Siempre se contó con

un matraz de control para cada condición, que contenía el medio de cultivo sin el metal pesado y sin inoculación de la cepa; y además se contó con cultivos duplicados bajo control negativo.

2.4 Elaboración de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon los estándares McFarland. Una vez preparados, se tomaron las lecturas por triplicado de cada uno de los estándares y el blanco o control (agua destilada) con el turbidímetro *Lovibond Water Testing TB 210 IR*. Con esos datos se realizó una regresión lineal, obteniendo así la ecuación que predice la concentración UFC/ml en función de la turbidez del medio a lo largo del tiempo.

2.5 Determinación de la curva de crecimiento

Para determinar la curva de crecimiento se inocularon cepas de *P. damsela* en los matraces, homogeneizándolas con una agitación moderada, para luego ser incubadas en dos bloques, incubación a temperatura ambiente e incubación a temperatura controlada (25°C), la primera medición se realizó luego de 4 horas de iniciada la incubación. Para realizar las mediciones se tomaron alícuotas del medio, cada 2 horas, de cultivo previamente agitado, y se registraron las lecturas con el nefelómetro ajustado a 560 nm. Luego se midió la turbidez de cada medio de cultivo inoculado en intervalos de 2 horas, hasta obtener lecturas constantes.

2.6 Determinación de la curva de remoción

Para determinar esta curva se preparó medio de cultivo líquido a 20 ppm y a 100 ppm de Pb, como se indicó previamente, se sembró la cepa bacteriana en matraces por duplicado y se tomó un matraz estéril como referencia, se incubaron a temperatura ambiente y a temperatura controlada a 25°C y se efectuaron las mediciones de pH y temperatura. Para la medición de la concentración de Pb se utilizó un equipo de Absorción atómica Varias AA500, las alícuotas fueron centrifugadas a 12g por 1 min. Y se leyó la concentración de Pb en el sobrenadante. Todos los procedimientos fueron realizados análogamente en el matraz control del experimento.

2.7 Análisis de datos

Para conocer si los datos siguieron una distribución normal (datos de pH y temperatura interna del cultivo) se utilizó la prueba de Normalidad de Shapiro Wilks, si el resultado de esta prueba era normal se aplicó un modelo ANCOVA, el mismo que permitió determinar si existe o no una diferencia entre los promedios de los datos analizados en cuanto a pH y temperatura; y si el resultado no era normal se aplicó la prueba U de Mann Whitney para comprobar si el comportamiento de las dos variables era diferente, utilizando RStudio y el paquete Stats. Las gráficas generales fueron realizadas en Excel 2010.

3 Resultados

Las cepas aisladas fueron caracterizadas utilizando una batería de 25 pruebas bioquímicas, que junto a la evaluación macroscópica y microscópica mostraron una aproximación taxonómica a *P. damselae*, con una probabilidad de acierto de 0,995 (Gramm negativa, oxidasa positiva) según el software de identificación del Kit utilizado (Microgen 2015). Para determinar si esta bacteria era capaz de interactuar con el Pb y no solo tolerar la presencia de éste en el medio se probó: i) dos bloques caracterizados por incubación bajo condiciones controladas a 25°C y a temperatura ambiente de la ciudad de Quito (2800 msnm); ii) evaluación de la temperatura interna del cultivo, con el fin de observar si existe alguna influencia sobre el crecimiento por parte de las temperaturas de incubación examinadas; iii) medición del pH del medio durante el experimento, de modo que se demuestre si existe influencia del mismo sobre el crecimiento o en su debido caso si el pH del medio era influenciado por la concentración del metal.

Al evaluar la capacidad de *P. damselae*, se determinó que el pH no se ve influenciado por la variación de la concentración de Pb, como se muestra en la Figura 1(A). Extendiendo el análisis se observa que no existe diferencia entre los cuatro tratamientos realizados ($p < 0,05$). De aquí se extrae un rango de pH (4,5-6,5) al cual la bacteria se desarrolla sin problemas, siendo expuesta a una concentración máxima de 100 ppm de Pb.

Bajo las condiciones de cultivo se observa que no existe una marcada diferencia en la temperatura interna entre los bloques estudiados ($p < 0,05$). Siendo siempre la temperatura ambiente menor y sin mostrar influencia por parte de la concentración

de Pb como muestra la Figura 1 (B). Y además esta no mostró diferencias significativas entre la capacidad para remover Pb por parte de la bacteria en diferentes concentraciones y temperaturas, como se observa en la Figura 2. Además se observó un marcado aumento en la biomasa producida a 25°C de la bacteria expuesta a 20ppm.

Durante las 96 horas en las que se condujo cada experimento de forma individual, se observó que la incubación a temperatura ambiente y 100 ppm representa el mayor porcentaje de remoción, que fue de 86%; sin embargo, en cuanto a valores absolutos, la reducción se dio hasta una concentración de 25 ppm, la cual es aproximadamente 50 veces mayor que la permitida por la legislación ecuatoriana, valor referencial utilizado para el diseño del experimento. Según esto, las reducciones en los bloques a 20ppm lograron una disminución de hasta 4 ppm, alcanzando a un valor 10 veces mayor al límite permitido para descargar aguas residuales en Ecuador (Figura 3).

4 Discusión

Pese a que *P. damselae* es considerado patógeno en acuicultura (Zorrilla *et al.*, 2003), esto no es necesariamente un limitante para aplicarlo en sistemas cerrados o batch para la recuperación de aguas contaminadas con metales pesados. Es bien sabido que muchas bacterias se adaptan y pueden remover metales pesados con cierta facilidad (Hasan *et al.*, Srivastava, y Talat, 2010; Naik y Dubey, 2013; Pongratz y Heumann, 1999). En el presente estudio se observó que *P. damselae* logró remover hasta 80 ppm de plomo.

Actualmente no se encuentran trabajos realizados directamente con esta bacteria pero en estudios similares realizados con *Aeromonas* (Hasan *et al.*, 2010; Paniagua *et al.*, 2006), *Pseudomonas* (Ramírez, 2012; Soto *et al.*, 2010) muestran la gran capacidad de las bacterias no entéricas para tolerar, interactuar y al final remover o precipitar los metales pesados presentes en aguas negras.

Estudios exploratorios de este tipo son una importante fuente de información primaria para profundizar en el conocimiento y crear una base funcional de datos sobre bacterias capaces de remover metales pesados; abriendo así líneas de investigación que profundicen en el mecanismo del que se valen las bacterias para detoxificar medios contami-

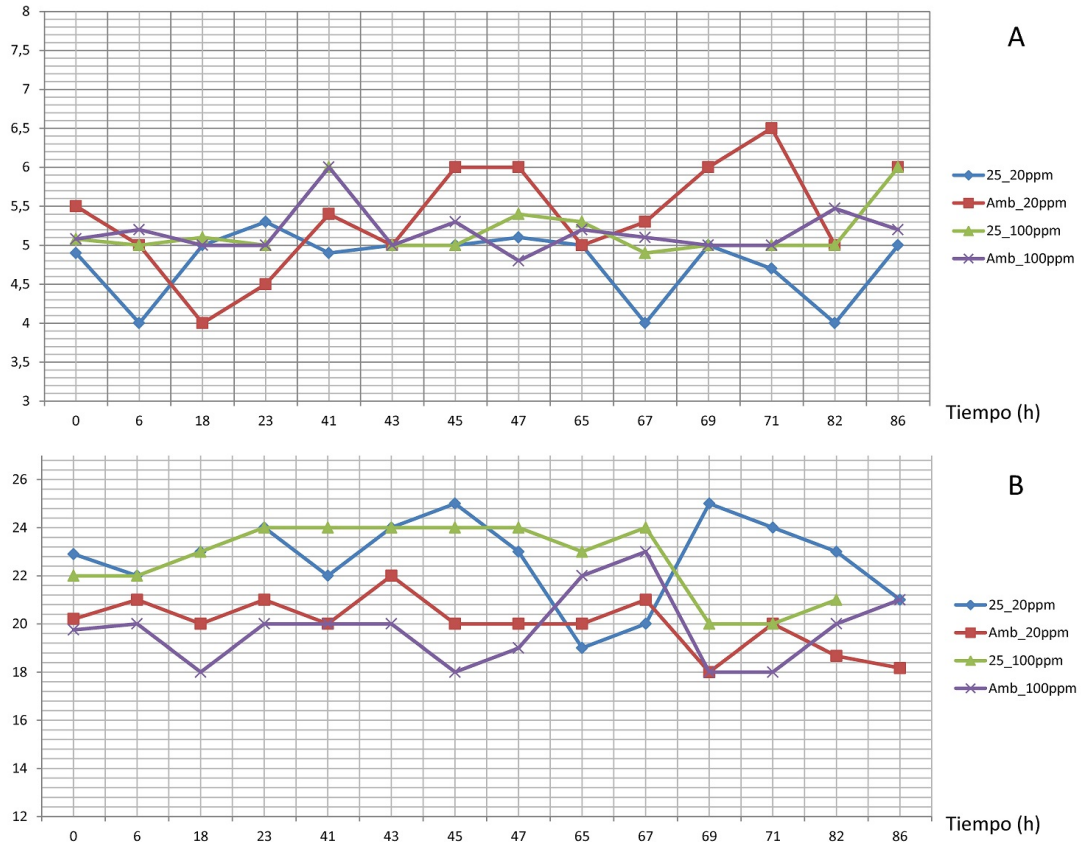


Figura 1. Comportamiento del pH (A) y la temperatura interna de cultivo (B) durante el tiempo de estudio (96h).

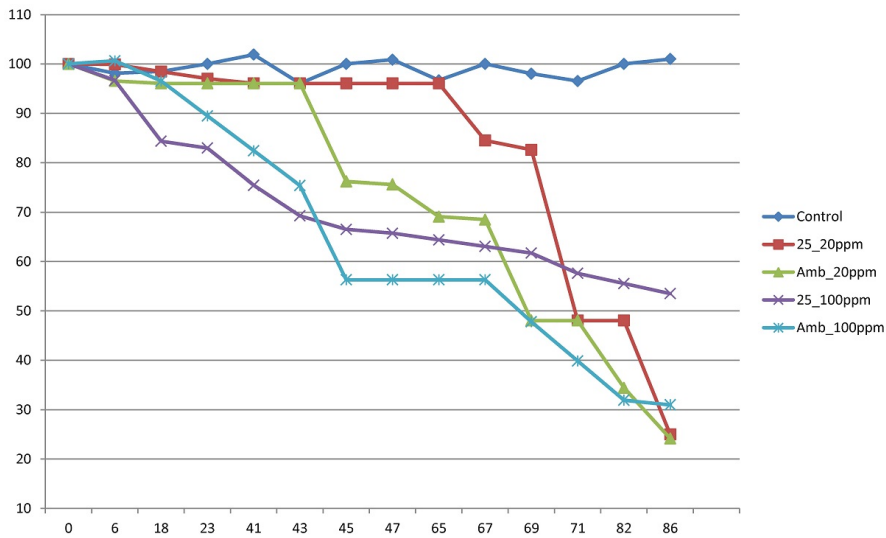


Figura 2. Curvas de Remoción *P. damsela* de Pb (%) vs Tiempo de cultivo

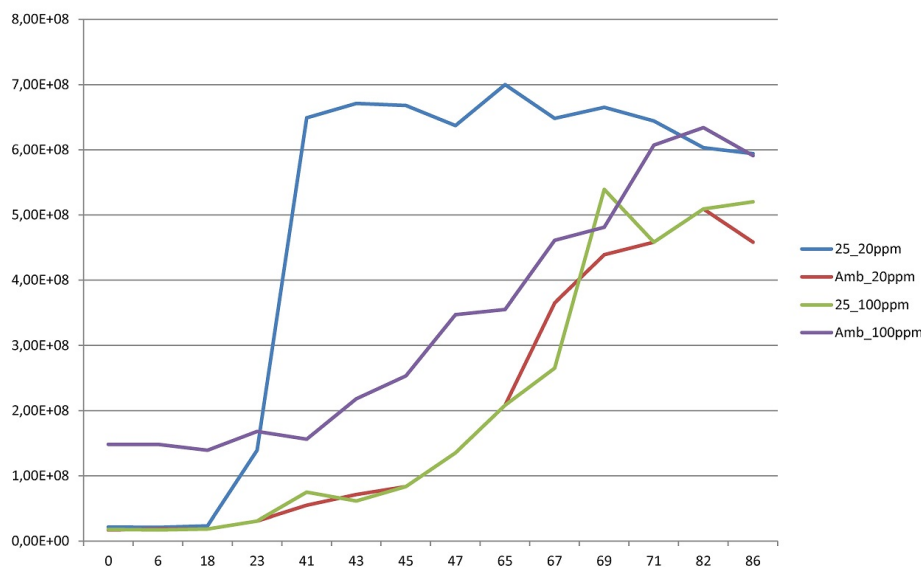


Figura 3. Curva de crecimiento de *P. damselae* en el tiempo de estudio.

nados y/o conocer mejor su caracterización molecular a fin de conocer la estructura de su genoma y clasificarlas funcionalmente de una mejor manera.

Agradecimientos

Este proyecto es financiado por la Universidad Politécnica Salesiana con sede en Quito- Ecuador, sin este apoyo no hubiera sido posible llevar a buen fin el mismo.

Referencias

- Ambuludi, A., 2013. Necesidad de reformar el Art. 11 de la Ley de Prevención y Control de la Contaminación Ambiental acerca de la responsabilidad por daños ambientales *Tesis de pregrado*, Universidad Nacional de Loja. Loja-Ecuador. Disponible en: <https://goo.gl/5LYcTt>.
- Bustos, A., y Garzón, K., 2015. Aplicación de Indicadores de Gestión Ambiental para medir la contaminación por emisiones a la atmósfera y residuos sólidos generados por las empresas del sector de la industria metalúrgica en el DMQ en el periodo 2012-2013. *Tesis de pregrado*, Universidad Politécnica Sale-

siana. Quito-Ecuador Disponible en: <https://goo.gl/TwvY7F>.

- Coccini, T., Caloni, F., Ramírez, L. y De Simone, U., 2016. Cytotoxicity and proliferative capacity impairment induced on human brain cell cultures after short- and long-term exposure to magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 37(3), pp. 361-373. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.3367>
- Greenpeace, 2008. Informe de Contaminación en España. [En línea] Disponible en: <https://goo.gl/Yxc1cr>
- Guevara, M., y Ramírez, L., 2015. Eichhornia crassipes, su invasividad y potencial fitorremediador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 22(2), pp. 5-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n22.2015.01>
- Hasan S. H., Srivastava, P. y Talat, M., 2010. Biosorption of lead using immobilized Aeromonas hydrophila biomass in up flow column system: Factorial design for process optimization. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), pp. 312-322, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.034>
- Microgen. An identification system for all currently recognised Enterobacteriaceae and an

- extensive range of oxidase-positive Gram negative Bacilli. [En línea] Disponible en: <https://goo.gl/FKRXcR>
- Naik M. M. y Dubey S. K., 2013. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and bio-monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98(1), pp. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039>
- Paniagua, G., Monroy, L., Perches, M., Negrete, E., García, O. y Vaca, S., 2006. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835). *Hidrobiología*, 16(1), pp. 75-79. Disponible en: <https://goo.gl/L9umJM>
- Pongratz, R. y Heumann, K. G., 1999. Production of methylated mercury, lead, and cadmium by marine bacteria as a significant natural source for atmospheric heavy metals in polar regions. *Chemosphere*, 39(1), pp. 89-102. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00591-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00591-8)
- Ramírez, L., 2012. Aislamiento, caracterización y conservación de bacterias no entéricas con capacidad de adaptación en altas concentraciones de plata, presentes en una laguna de sedimentación de la planta minera del sector el Pache-Portovelo-El Oro. *Tesis de pregrado*, Universidad Politécnica Salesiana. Quito-Ecuador. Disponible en: <https://goo.gl/yv7Uyh>
- Ramírez, L., 2015. Magnetite (Fe₃ O₄) nanoparticles: Are they really safe? *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 21(1), pp. 77-83. DOI: <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n21.2015.01>
- Romero, K., 2009. Contaminación por metales pesados. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12(1), pp. 45-46. Disponible en: <https://goo.gl/yJcKSZ>
- Sánchez, J., y Rodríguez, J., 2003. Fundamentos y aspectos microbiológicos: Biorremediación. *Industria y Minería*, 351, pp. 12-16. Disponible en: <https://goo.gl/cJtsJo>
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey-León, A., González-Rojas, E., 2010. Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova*, 8(14), pp. 195-205. DOI: <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.450>
- Volke, T. y Velasco, J., 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *Instituto Nacional de Ecología, México*, pp. 64. Disponible en: <https://goo.gl/N62viU>
- Yáñez, P. y Bárcenas, M., 2012. Determinación de los niveles de tolerancia a hidrocarburos y potencial de fitorremediación de cuatro especies vegetales del sector Baeza-El Chaco, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 15(1), pp. 27-48. DOI: <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n15.2012.03>
- Zorrilla, I., Chabrilón, M., Arijó, S., Díaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture*, 218(1-4), pp. 11-20. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00309-5)