Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental

• Irina Salgado-Bernal • María Elena Carballo-Valdés •
• Armando Martínez-Sardiñas • Mario Cruz-Arias •
Universidad de La Habana, Cuba

• María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa •
Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

La amenaza de los metales pesados a la salud pública y el ambiente ha conllevado a la búsqueda de tecnologías que permitan la remoción o neutralización de su toxicidad. Dentro de las nuevas técnicas, los microorganismos presentan gran relevancia. El trabajo se propuso caracterizar las interacciones de 13 aislados bacterianos rizosféricos obtenidos de plantas hidrófitas de humedales naturales, con cuatro metales de interés: cromo (Cr^{6+}), plomo (Pb^{2+}), cadmio (Cd^{2+}) y mercurio (Hg^{2+}), para la selección de cepas con potencialidades para la remediación de aguas. Se determinó la resistencia de los aislados a los cuatro metales, seleccionando tres concentraciones y suplementando el medio agar nutritivo con sales de los metales, para lograr las concentraciones correspondientes (cromo y plomo 1.0, 2.0 y 3.0 mM; cadmio 0.6, 1.2 y 1.8 mM; mercurio 0.01, 0.02 y 0.03 mM). Se realizaron ensayos de biosorción frente a soluciones mixtas y se determinó la cantidad de metal removido por gramos de biomasa (q). El 100% de los aislados mostró resistencia a más de un metal. Se encontró remoción por algunas cepas, destacándose cuatro de ellas, que podrían formar un consorcio para la eliminación de plomo, cromo y mercurio. Los resultados presentan importancia, pues las concentraciones de metales estudiadas se encuentran por encima de las concentraciones máximas permisibles normadas en aguas según la Norma Cubana NC 27-1999 y otras normas internacionales; por lo tanto, las cepas que mostraron resistencia y remoción podrían resultar agentes biorremediantes prometedores para su empleo en el saneamiento de aguas contaminadas.

Palabras clave: bacterias, metales pesados, resistencia, remoción, tratamiento de aguas.

Introducción

La contaminación del ambiente con metales tóxicos surge como resultado de las actividades humanas, principalmente industriales; sin embargo, fuentes como la agricultura y la eliminación de residuos también contribuyen (Cañizares, 2000). Aun cuando las descargas de algunos metales causadas por actividades humanas ha disminuido, su liberación indirecta a través de diferentes fuentes tiene un gran impacto en el ciclo ambiental (D'ltri, 1992). El desarrollo industrial ha creado un importante número y volúmenes de aguas residuales procedentes de los nuevos procesos de manufacturación, conteniendo algunas de ellas diferentes elementos químicos, entre los que se incluyen los metales pesados, siendo unos de los contaminantes más abundantes en aguas residuales (Filali *et al.*, 2000).

Estos elementos no pueden ser degradados naturalmente, permanecen en los sedimentos y son lentamente liberados en los cuerpos de agua (Cañizares, 2000; Pérez *et al.*, 2002); aun cuando

se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, su recalcitrancia y consiguiente persistencia implica que a través de procesos naturales, como la biomagnificación, su concentración pueda llegar a ser tan elevada, que se convierta en tóxica (Cañizares, 2000). Por estas razones, la contaminación de las aguas con metales ha sido identificada internacionalmente como uno de los principales problemas ambientales, ya que se vierten a los ecosistemas, de manera indiscriminada, aguas residuales sin tratar o con tratamientos deficientes.

La amenaza de los metales pesados a la salud pública y el medio ambiente ha conllevado a la búsqueda de sistemas que permitan la remoción o neutralización de sus efectos tóxicos de una forma natural y económica (Valls y De Lorenzo, 2002; Huang *et al.*, 2003). Se han empleado numerosos métodos convencionales para el tratamiento de estos elementos, fundamentalmente físicos y químicos, pero algunos han resultado costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de metales es muy baja. Por este motivo, actualmente, una de las tecnologías más promisorias en aras de la recuperación de ambientes naturales contaminados es la biorremediación, la cual se basa en el uso de sistemas biológicos para la eliminación de contaminantes y, específicamente, el empleo de biomasas microbianas representa una alternativa viable (Gupta *et al.*, 2000; Pethkar *et al.*, 2001).

Los microorganismos se han empleado desde hace varias décadas para diferentes funciones: producción de bioproductos en el ámbito industrial, en la industria bacteriológica y de fermentaciones, y más recientemente, para el tratamiento de aguas residuales (Domínguez *et al.*, 2009). Constituyen una de las formas más beneficiosas y eficientes para la remoción de metales de aguas contaminadas, particularmente en presencia de bajas concentraciones de metal en grandes volúmenes de solución. Además presentan una gran variedad de mecanismos para la resistencia y captura de estos elementos (Slaba y Dlugonski, 2004), y tienen la posibilidad de ser manipulados genéticamente.

Existen numerosas tecnologías para el tratamiento de aguas, pero en muchas de ellas, como el caso de los humedales artificiales o construidos, el reto está en optimizar la tecnología, maximizando las fuerzas de interacción biológica en la zona de las raíces de la planta (rizosfera) (Kuschk *et al.*, 1999), donde precisamente las bacterias hacen una gran contribución en la eliminación de contaminantes (Chaudhry *et al.*, 2005). Aislamientos microbianos bien adaptados a hábitats con metales pesados podrán llevar a cabo remediación, probablemente, y resultan de gran interés para las estrategias de conservación ambiental, por lo que la búsqueda de microorganismos con altas capacidades de acumulación y características estables de resistencia es una parte inevitable de cualquier estrategia de remediación (Haferburg y Kothe, 2007). Esto sugiere que la introducción selectiva de bacterias con propiedades específicas frente a los contaminantes en un humedal artificial puede mejorar la remediación de aguas contaminadas (Tabacchioni *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta los aspectos mencionados, la presente investigación se propuso como objetivo caracterizar las interacciones de 13 aislados bacterianos rizosféricos, obtenidos de la rizosfera de plantas hidrófitas de humedales naturales, con cuatro metales pesados de importancia ambiental: cromo, plomo, cadmio y mercurio, como premisa para la selección e introducción de cepas, con potencialidades para la remediación, en sistemas de tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados.

Materiales y métodos

Cepas empleadas

Se emplearon 13 cepas bacterianas autóctonas provenientes de la rizofera de plantas

hidrófitas (especie *Typha dominguensis*, Pers. Kunth) de humedales naturales de La Habana, Cuba (Posición GPS: Humedal 1-Lat. 23º 02.323', Long. 82º 24.002'; Humedal 2-Lat. 23º 02.863', Long. 082º 23.443'; Humedal 3-Lat. 23º 03.318', Long. 082º 24.014'). Las cepas estudiadas se seleccionaron a partir de 58 aislados de acuerdo con estudios previos realizados en cuanto a remoción de contaminantes.

Aislamiento de bacterias rizosféricas

Se siguió el protocolo propuesto por Muratova *et al*. (2003). Se removió el suelo no rizosférico de las raíces; la raíz con suelo rizosférico adherido se lavó en 100 ml de agua destilada y se agitó por treinta minutos. Se dejaron sedimentar las partículas de suelo y con la suspensión se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7}. Se prepararon placas con tres réplicas de cada dilución en medio de cultivo con agar nutritivo y se incubó a 30 °C (temperatura del lugar de muestreo) por 48 horas. Se seleccionaron las colonias de cada muestra con características visibles diferentes y se conservaron en agar nutritivo, plano inclinado y a 4 °C.

Determinación de la resistencia a los metales

Se realizó según la metodología empleada por Anisimova *et al*., 1993.

Preparación de las soluciones de metales

Se prepararon soluciones concentradas (10 mM, pH 7) de los metales cromo, plomo, cadmio y mercurio, utilizando los compuestos dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), nitrato de plomo [$Pb(NO_3)_2$], nitrato de cadmio [$Cd(NO_3)_2$]) y cloruro de mercurio ($HgCl_2$), respectivamente. Estas soluciones concentradas sirvieron de partida para la preparación de los medios con las diferentes concentraciones de metales a ensayar.

Preparación de los medios de cultivo

Para cada metal se seleccionaron tres concentraciones para el estudio: cromo y plomo 1.0, 2.0 y 3.0 mM; cadmio 0.6, 1.2 y 1.8 mM, y mercurio 0.01, 0.02 y 0.03 mM. Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta los límites máximos permisibles normados en aguas, según la Norma Cubana NC 27-1999. Se prepararon matraces tipo Erlenmeyer con agar nutritivo (28 g de agar para 1 000 ml de agua destilada) para cada metal y cada medio fue suplementado con un determinado volumen de la solución de concentración 10 mM, para lograr las diferentes concentraciones deseadas. Posteriormente, el medio se agitó para mezclar el metal añadido con el agar y se vertió en placas Petri.

Siembra de las cepas

Se partió de un pre-inóculo preparado en caldo nutritivo con un desarrollo de 24 horas y se realizó la siembra por estría de cada aislado con su réplica en medio agar nutritivo suplementado con el metal. Como control de la proliferación de las cepas, se empleó el medio agar nutritivo sin los metales, donde se inoculó cada una, para verificar su correcto desarrollo en ausencia de los metales. Como controles para la verificación de la esterilidad de los medios, se empleó agar nutriente con cada concentración para cada metal sin inocular, y como controles del desarrollo a los correspondientes niveles de metales, se emplearon cepas bacterianas caracterizadas en cuanto a su resistencia a metales, pertenecientes al cepario de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

Lectura de los resultados

Se realizaron tres lecturas del desarrollo, a las 24, 48 y 72 horas, debido a que los diferentes aislados estudiados mostraron diferencias en la velocidad de proliferación. Para la lectura se observó el desarrollo o no de la cepa bacteriana en el medio suplementado con la solución de

metal. Se clasificó la presencia de proliferación como resistencia (R) y la ausencia de desarrollo como sensibilidad (S).

Determinación de la remoción de los metales

Obtención de la biomasa. Obtención del preinóculo

El medio de cultivo líquido (caldo nutritivo) se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 500 ml, con un volumen efectivo de 200 ml, y se inoculó a partir de los desarrollos en los medios de conservación. Las bacterias se mantuvieron durante 24 horas a 30 ± 2 °C, en agitación a 100 rpm.

Obtención del inóculo

Se realizó una dilución de 1/5, utilizando el volumen total del preinóculo en caldo nutritivo, y se incubó en condiciones similares para la obtención de la biomasa celular.

Colecta de la biomasa

Se realizó después de transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo el desarrollo y se colectaron las células. Este procedimiento se realizó por centrifugación a 10 000 rpm durante veinte minutos; los aglomerados microbianos se lavaron con agua bidestilada y se centrifugaron durante diez minutos. Se eliminó el sobrenadante y se recuperó el aglomerado microbiano.

Ensayo de biosorción de metales

En dependencia de la resistencia mostrada por los aislados se prepararon los ensayos; si mostraron multirresistencia se prepararon soluciones mixtas (pH 7). La biomasa de cada aislado (0.03 g) fue puesta en contacto en matraces Erlenmeyer de 100 ml, con 15 ml de la solución mixta de metales correspondiente. Se incubó a 30 ± 2 °C, 100 rpm, durante 72 horas. La biomasa se separó de la solución de los metales residuales por centrifugación a 10 000 rpm durante diez minutos; el aglomerado microbiano se desechó y el sobrenadante se filtró y se conservó acidificado con ácido nítrico concentrado a 4 °C, para la posterior cuantificación de la cantidad de metal removido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis y cuantificación del metal capturado

Las muestras se analizaron por espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente, ICP-OES (*Inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy*) en la Facultad de Química, Conjunto D, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para el Cd^{2+} se usó una longitud de onda de 228.802 nm, para el Cr^{2+} de 267.716 nm, para el Hg^{2+} de 253.652 y para el Pb^{2+} de 220.361. Los cálculos para determinar la cantidad de metal capturado se realizaron según la ecuación (Holan y Volesky, 1995; Vieira y Volesky, 2000):

$$q = (C_i - C_f)\, V/\mathrm{m}$$

donde q corresponde a los mg de metal capturado por gramos de biomasa (mg/g); C_i, la concentración inicial del metal (mg/l); C_f, la concentración final del metal (mg/l); m, la masa de la biomasa en la mezcla de reacción (g), y V es el volumen de la mezcla de reacción (L).

Resultados y discusión

Resistencia de los aislados en los medios suplementados con los metales a las 24, 48 y 72 horas

En la figura 1 se muestra un ejemplo de cómo se observó el desarrollo de los aislados estudiados en el medio de agar nutritivo, suplementado con los metales en el ensayo de resistencia.

En los cuadros 1 a 4 se muestra que el 100% de los aislados mostró resistencia a plomo, el 85% a cromo, el 15% a cadmio y el 100% a mercurio. Además, los 13 aislados mostraron resistencia a más de un metal, es decir, multirresistencia; un

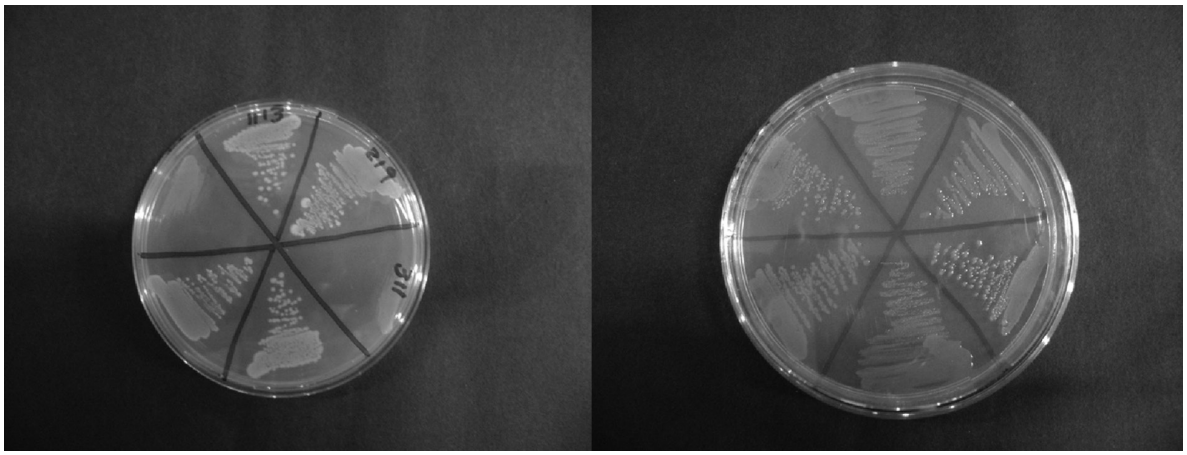


Figura 1. Muestra del ensayo de resistencia a metales en placa de agar nutritivo suplementado con el metal. Desarrollo de las cepas ensayadas.

aislado mostró resistencia a los cuatro metales ensayados, 11 aislados mostraron resistencia a tres metales y un aislado mostró resistencia a dos metales. Las respuestas encontradas están en estrecha relación con el lugar de donde fueron aisladas estas bacterias. Las plantas se seleccionaron de humedales cercanos al río Almendares, ubicado en la ciudad de La Habana, Cuba. Actualmente, el cauce principal de este río presenta una situación higiénico-sanitaria crítica, como consecuencia de las descargas que recibe de aguas residuales urbanas e industriales sin tratamiento o con tratamiento ineficiente. Aproximadamente setenta fuentes contaminadas de diferentes tipos vierten sus aguas residuales a este río, por lo que se estima la existencia de altos niveles de contaminación (CCAV, 1999). Estos niveles de contaminación pueden haber influido para que las bacterias desarrolladas en esa zona presenten características para resistir altas concentraciones de metales. La respuesta adaptativa de los microorganismos en ambientes contaminados ha sido ampliamente estudiada, y muchas de las investigaciones han indicado que los organismos que sobreviven en estas condiciones desarrollan o adquieren sistemas que contrarrestan los efectos de las altas concentraciones de metales (Trajanovska *et al.*, 1997).

Estos resultados son interesantes teniendo en cuenta que el plomo, cromo, cadmio y mercurio son metales pesados no esenciales para los organismos vivos (Trajanovska *et al.*, 1997; Valls y De Lorenzo, 2002), por lo que resultan tóxicos, incluso a bajas concentraciones. Sumado a esto, los aislados que mostraron resistencia a las concentraciones del metal probadas más elevadas resaltan con respecto al resto debido a su capacidad para proliferar a concentraciones que resultan altamente perjudiciales para la mayoría de los organismos. Se categoriza el comportamiento de estos aislados como resistencia, teniendo en cuenta la definición del término planteada en la literatura: resistencia define la habilidad de sobrevivir y desarrollarse en presencia de metales pesados, induciendo mecanismos codificados en plásmidos o el cromosoma (Smith, 1967; Nakahara *et al.*, 1977; Vullo *et al.*, 2005).

Han sido informadas numerosas bacterias resistentes a metales tanto aisladas de suelos y aguas como de sedimentos. En la mayoría de las investigaciones, las concentraciones de metales estudiadas son menores que las ensayadas

Cuadro 1. Resistencia de los 13 aislados bacterianos a plomo (concentraciones de 1, 2 y 3 mM).

Aislados	1.0 mM	2.0 mM	3.0 mM
TAN316	R	R	S
TAN1113	R	R	S
TAN219	R	R	R
TAN217	R	R	R
TAN119	R	R	R
TAN118	R	R	S
TAN1111	R	R	S
TAN117	R	R	R
TAN1115	R	R	-
TAN229	R	R	R
TAN221	R	R	R
TAN216	R	R	R
TAN3110	R	R	R

R: resistente; S: sensible.

Cuadro 2. Resistencia de los 13 aislados bacterianos a cromo (concentraciones de 1, 2 y 3 mM).

Aislados	1.0 mM	2.0 mM	3.0 mM
TAN316	R	S	S
TAN217	R	S	S
TAN1113	R	S	S
TAN219	R	R	S
TAN119	R	R	S
TAN118	R	R	S
TAN1111	S	S	S
TAN117	R	R	R
TAN1115	R	R	R
TAN229	S	S	S
TAN221	R	R	S
TAN216	R	S	S
TAN3110	R	S	S

R: resistente; S: sensible.

Cuadro 3. Resistencia de los 13 aislados bacterianos a cadmio (concentraciones de 0.6, 1.2 y 1.8 mM).

Aislados	0.6 mM	1.2 mM	1.8 mM
TAN316	S	S	S
TAN217	S	S	S
TAN1113	S	S	S
TAN219	S	S	S
TAN119	S	S	S
TAN118	S	S	S
TAN1111	R	S	S
TAN117	S	S	S
TAN1115	S	S	S
TAN229	S	S	S
TAN221	S	S	S
TAN216	S	S	S
TAN3110	R	S	S

R: resistente; S: sensible.

Cuadro 4. Resistencia de los 13 aislados bacterianos a mercurio (concentraciones de 0.01, 0.02 y 0.03 mM).

Aislados	0.01 mM	0.02 mM	0.03 mM
TAN316	R	S	S
TAN217	R	R	R
TAN1113	R	S	S
TAN219	R	S	S
TAN119	R	R	R
TAN118	R	S	S
TAN1111	R	S	S
TAN117	R	S	S
TAN1115	R	R	R
TAN229	R	S	S
TAN221	R	S	S
TAN216	R	S	S
TAN3110	R	S	S

R: resistente; S: sensible.

en esta investigación (Filali *et al*., 2000; Vullo *et al.*, 2005) y en otros son similares a las del presente estudio (De Souza *et al.*, 2006). Por tal motivo, los aislados obtenidos representan microorganismos interesantes, al poder resistir concentraciones elevadas y superiores a lo encontrado en la mayoría de los informes.

Las concentraciones de metales estudiadas se encuentran por encima de los Límites Máximos Permisibles Promedio (LMPP) para los parámetros de los residuales líquidos, según la Norma Cubana NC 27-1999 (ver cuadro 5).

Es decir, que las concentraciones estudiadas son 200 veces mayores que las concentraciones máximas permisibles. Teniendo en cuenta estos datos, los aislados que mostraron resistencia podrían resultar agentes biorremediadores prometedores para ser empleados en una tecnología para el saneamiento de aguas contaminadas con metales pesados, en dependencia de sus potencialidades para la remoción de estos elementos. Existen numerosos mecanismos de resistencia de las bacterias a los metales que no necesariamente incluyen la remoción de las soluciones, pero existen otros que son la base para el uso de los microorganismos en la biorremediación.

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005), por ejemplo, los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad; b) enzimas que modifican el estado rédox de los metales, convirtiéndolos en formas menos perjudiciales, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes *et al.*, 2006).

Cuadro 5. Límites máximos permisibles promedio (LMPP) para los parámetros de efluentes residuales líquidos.

Parámetro	Unidades	LMPP
Cadmio	mg/l	< 0.3
Cromo hexavalente	mg/l	< 0.5
Mercurio	mg/l	< 0.01
Plomo	mg/l	1.0

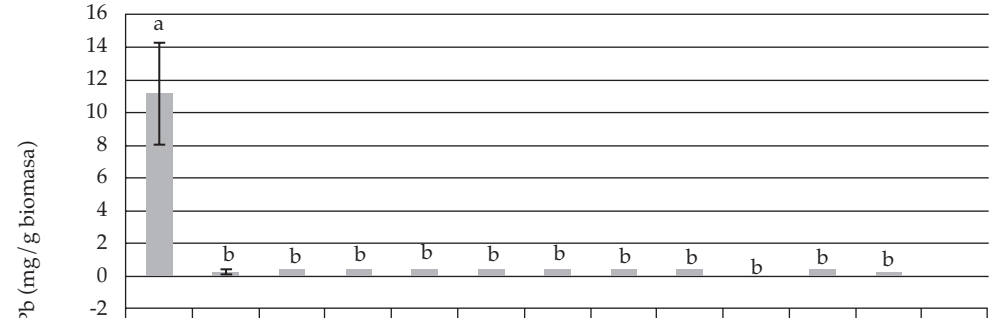
El desarrollo de nuevos sistemas para el tratamiento de aguas requerirá de la supervivencia de los microorganismos presentes en estos sistemas y su resistencia a agentes altamente inhibitorios. La habilidad de cepas microbianas de proliferar en la presencia de metales pesados puede ser saludable en el tratamiento de aguas residuales, donde los microorganismos están directamente involucrados en la descomposición de materia orgánica en procesos biológicos para el tratamiento de aguas (Filali *et al.*, 2000).

Remoción de metales de soluciones mixtas simuladas

En las figuras 2 a 5 se muestra que, para los cuatro metales estudiados, se observaron resultados diferentes. En el caso del plomo, la mayoría de los aislados que resultaron resistentes presentaron remoción de la solución. Con respecto al cromo, sólo dos aislados presentaron remoción. De los dos aislados que resultaron resistentes a cadmio, ninguno logró remoción del metal en solución, y los resultados del mercurio, al igual que en el plomo, muestran que la mayoría de los aislados removió el metal de la solución.

Para el plomo (figura 2), el aislado TAN1111 resultó ser el mejor de todos, dando un valor de remoción desde el punto de vista estadístico significativamente superior a los valores de remoción del resto. Para el cromo (figura 3), TAN1113 y TAN1115, a pesar de haber sido los únicos que presentaron remoción, presentan la diferencia de que TAN1113 es el único cuyo valor es estadísticamente significativo con respecto del resto (a), no presentando relación, pues en el caso de TAN1115 presenta una media corrompida (ab). Para el mercurio (figura 5), los aislados TAN 119, TAN117, TAN217, TAN1113, TAN 216 y TAN1115 mostraron los valores más altos, pero TAN119 fue el único que reveló una diferencia significativa total con el resto de los aislados (a). Hay que resaltar que los aislados TAN1113 y TAN1115 se repiten con buenos resultados frente al mercurio, pues ya se habían visto buenos resultados con el cromo.

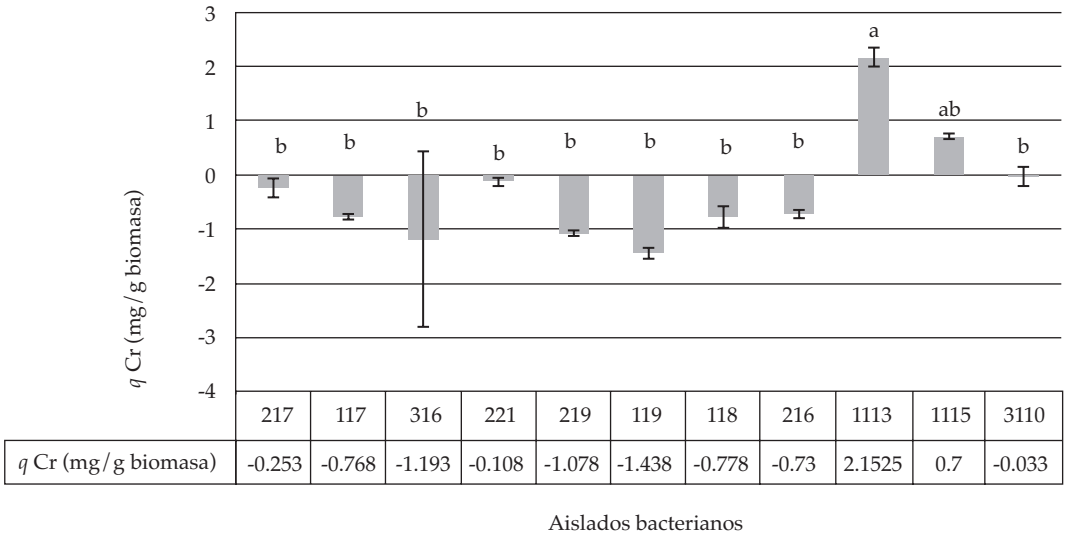
Los casos donde no se obtuvo remoción (valores 0 o negativos) sugieren que los aislados obtenidos presentan un mecanismo de resistencia que no implica la eliminación del metal en solución. Por otra parte, en estos resultados puede influir la competencia que se establece por los sitios de unión a los metales en la célula bacteriana, donde algunos cationes



	1111	217	117	316	221	219	119	118	216	1113	1115	3110	229
q Pb (mg/g biomasa)	11.16	0.252	0.436	0.419	0.441	0.445	0.452	0.442	0.454	-0.06	0.443	0.277	0

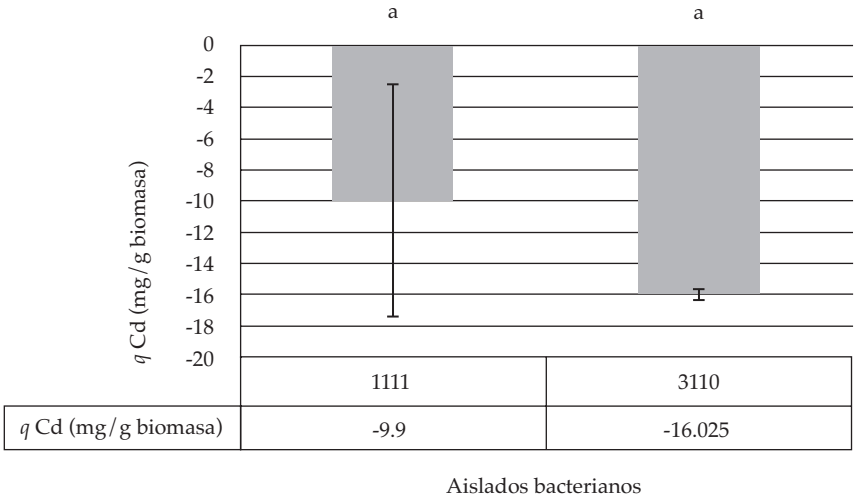
Aislados bacterianos

Figura 2. Remoción de plomo por aislados bacterianos a temperatura 30 ± 2 °C, pH 7, 72 horas de contacto, 100 rpm.



	217	117	316	221	219	119	118	216	1113	1115	3110
q Cr (mg/g biomasa)	-0.253	-0.768	-1.193	-0.108	-1.078	-1.438	-0.778	-0.73	2.1525	0.7	-0.033

Figura 3. Remoción de cromo por aislados bacterianos a temperatura 30 ± 2 °C, pH 7, 72 horas de contacto, 100 rpm.

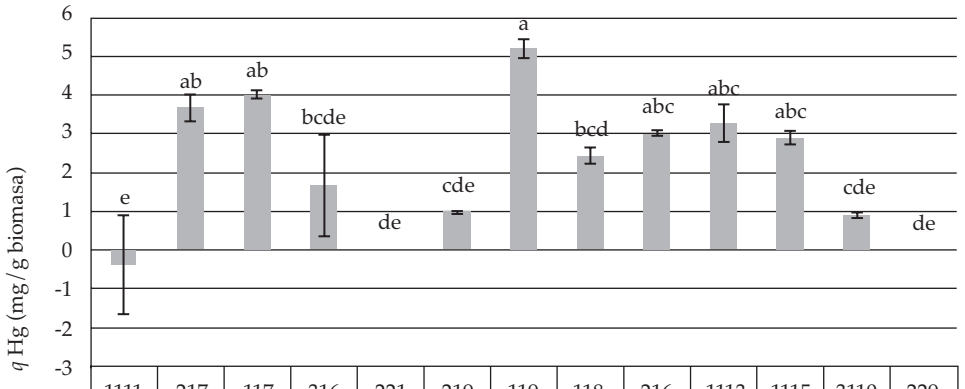


	1111	3110
q Cd (mg/g biomasa)	-9.9	-16.025

Figura 4. Remoción de cadmio por aislados bacterianos a temperatura 30 ± 2 °C, pH 7, 72 horas de contacto, 100 rpm.

metálicos pueden verse más favorecidos. Este comportamiento diferente puede explicarse debido a las características de cada metal (valencia y número atómico) (Holan y Volesky, 1994) y al tipo de enlace que establecen con la biomasa microbiana, lo cual también influye en la afinidad (Volesky, 1999).

Cuando se trabaja con mezcla de metales puede encontrarse que la cantidad total de metal biosorbido en el sistema multimetal sea menor que en un sistema simple (Chang y Hong, 1994; Figueira *et al.*, 1997; Utigikar *et al.*, 2000) pues, en ocasiones, la presencia de cualquier ión metálico en la mezcla, ya sea



	1111	217	117	316	221	219	119	118	216	1113	1115	3110	229
q Hg (mg/g biomasa)	-0.38	3.68	4.005	1.673	0.015	0.979	5.225	2.428	3.035	3.268	2.883	0.915	0

Aislados bacterianos

Figura 5. Remoción de mercurio por aislados bacterianos a temperatura 30 ± 2 °C, pH 7, 72 horas de contacto, 100 rpm.

binaria o mezcla de más de dos metales, tiene un fuerte efecto antagonista en los procesos de biosorción (Hussein *et al.*, 2004).

La obtención de aislados que mostraron remoción de algunos de los metales estudiados es de suma importancia, ya que en los sistemas naturales, los metales no se encuentran de forma individual. Con frecuencia es posible encontrar una variedad de iones que pueden competir aumentando o disminuyendo su afinidad por los sitios de enlace disponibles. A pesar de no haberse encontrado elevados niveles de remoción, hay que destacar que se ensayaron concentraciones de metales altas, considerando la toxicidad de estos elementos para los organismos vivos, por lo que estas bacterias pudieran ser empleadas, optimizando el proceso de remoción, en el mejoramiento de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados.

Se podría proponer la formación de un consorcio para la eliminación de plomo, cromo y mercurio, pues para el cadmio los aislados probados no resultaron efectivos, con la participación de los aislados TAN1113, TAN1115, TAN119 y TAN117, teniendo en cuenta que las bacterias en consorcio parecen incrementar la remoción de contaminantes en relación con las remociones que muestran en cultivos puros (Sprocati *et al.*, 2006; Hafersburg y Kothe, 2007).

Aunque se demostró el potencial de estos aislados para la remoción de metales, para aplicar cualquier microorganismo en una tecnología ambiental para el tratamiento de aguas esto no es suficiente. Se hace indispensable la identificación hasta especie de estos aislados, pues a pesar de que estas bacterias fueron obtenidas de la rizosfera de plantas hidrófitas, lo cual supone que no deban ser patógenas, hay que corroborarlo a través de las técnicas de identificación existentes. Este aspecto es muy importante dentro de la investigación con microorganismos para ser propuestos como agentes biorremediantes, pues el objetivo de su aplicación es disminuir el riesgo ambiental de determinados contaminantes y no implicar una mayor fuente de contaminación.

Conclusiones

Los aislados bacterianos rizosféricos obtenidos presentaron multirresistencia a varios

de los metales estudiados y muchos de ellos presentaron además la propiedad de remover los cationes metálicos de soluciones acuosas simuladas; estos últimos constituyen agentes biorremediantes potenciales de aguas contaminadas con metales pesados. A pesar de que este estudio se realizó en laboratorio, tiene posibilidades de aplicación, pues las bacterias estudiadas pudieran ser incorporadas en tecnologías para el tratamiento de aguas, por ejemplo bioaumentando humedales construidos, y contribuir a la remoción de cromo, plomo y mercurio, presentes de manera individual o conjunta en aguas residuales industriales. Por supuesto, la aplicación concreta de una tecnología determinada requerirá de la elección y optimización del sistema de tratamiento, de acuerdo con las características de la interacción específica cepas bacterianas-metales, lo cual será objetivo de futuras investigaciones.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por la International Foundation for Science, Estocolmo, Suecia, a través de un financiamiento otorgado a la M.C. Irina Salgado Bernal (proyecto W/4860-1). Se agradece la beca otorgada para la estancia realizada en la UNAM, México, en la que parte de esta investigación se realizó, al personal académico y administrativo de los Laboratorios 301 al 303 del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, y al candidato a doctor, maestro Ciro Márquez (Facultad de Química de la UNAM) por la ayuda brindada en los análisis de las muestras de metales.

Recibido: 26/03/10
Aceptado: 30/01/12

Referencias

ANISIMOVA, L., SUINORA, T., and BORONIN, A. Resistance to metals gram negative isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology*. Vol. 62, núm. 5, 1993, pp. 505-508.

CAÑIZARES, R.O. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiano. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 42, 2000, pp. 131-143.

CCAV. Reporte Técnico sobre la Cuenca Almendares-Vento. La Habana: Consejo de Cuenca Almendares-Vento, CITMA, 1999, 54 pp.

CERVANTES, C., ESPINO, A.E., ACEVEDO, F., LEÓN, I.L., RIVERA, M.E., AVILA, M., WRÓBEL, K., WRÓBEL, K., GUTIÉRREZ, J.F., RODRÍGUEZ, J.S. y MORENO, R. Interacciones microbianas con metales pesados. *Rev. Latinoam. Microbiol*. Vol. 48, núm. 2, 2006, pp. 203-210.

CHANG, J. and HONG J. Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 44, 1994, pp. 999-1006.

CHAUDHRY, Q., BLOM-ZANDSTRA, M., GUPTA, S., and JONER, E.J. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. and Pollut. Res*. Vol. 12, No. 1, 2005, pp. 34-48.

DE SOUZA, M.J., NAIR, S., LOKA-BARATHI, P.A., and CHANDRAMOHAN, D. Metal and antibiotic resistance in psychrotrophic bacteria from Antartic marine waters. *Ecotoxicology*. Vol. 15, 2006, pp. 379-384.

D'LTRI, F.M. El ciclo de metilmercurio y otros metales pesados en ambientes lacustres. *Ingeniería hidráulica en México*. Vol. VII, núm. 2, mayo-diciembre de 1992, pp. 75-91.

DOMÍNGUEZ, A.R., TORRES, J.A., CARMONA, R. y AGUILAR, R. Estudio teórico práctico de la remoción de contaminantes presentes en el río de Los Remedios, Estado de México. *Ingeniería hidráulica en México*. Vol. XXIV, núm. 2, abril-junio de 2009, pp. 81-91.

FIGUEIRA, M.M., VOLESKY, B., and CIMINELLI, V.S.T. Assessment of interference in biosorption of heavy metal. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 54, 1997, pp. 344-350.

FILALI, B.K., TAOUFIK, J., ZEROUAL, Y., DZAIRI, F.Z., TALBI, M., and BLAGHEN, M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Current Microbiology*. Vol. 41, 2000, pp. 151-156.

GUPTA, R., AHUJA, P., KHAN, S., SAXENA, R.K., and MOHAPTRA, H. Microbial biosorbents: meeting the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current Science*. Vol. 78, 2000, pp. 967-973.

HAFERBURG, G. and KOTHE, E. Microbes and metals: interactions in the environment. Journal of Basic Microbiology. Vol. 47, 2007, pp. 453-467.

HOLAN, Z. and VOLESKY, B. Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. Appl. Biochem. *Biotechnol*. Vol. 53, 1995, pp. 133-146.

HOLAN, Z. and VOLESKY, B. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnology and Bioenginering*. Vol. 43, 1994, pp. 1001-1009.

HUANG, C., SU, C., HSIEH, J., TSENG, C., LIN, P., and CHANG, J. Polypeptides for heavy-metal biosorption: capacity and specificity of two heterogenous Mer P proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 33, núm. 4, 2003, pp. 379-385.

HUSSEIN, H., IBRAHIM, S.F., KANDEEL, K., and MOAWAD, H. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas sp. Environmental Biotechnology*. Vol. 7, 2004, pp. 41-46.

KUSCHK, P., WIESSNER, A., and STOTTMEISTER, U. *Biotechnology. Section 12 Biological processes in wetland systems for wastewater treatment*. Vol. 11a. Second Completely Revised Edition. Rehm, H.J. and Reed, G. (editors). Leipzing: Wiley-VCH, 1999, pp. 242-251.

MURATOVA, A., HÜBNER, T.H., TISCHER, S., TURKOVSKAYA, O., MÖDER, M., and KUSCHK, P. Plant – Rhizosphere – Microflora association during phytoremediation of PAH – contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. Vol. 5, No. 2, 2003, pp. 137-151.

NAKAHARA, H., ISHIKAWA, T., SARAI, Y., KONDO, I., KOZOKUE, H., and SILVER, S. Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol. 33, 1977, pp. 975-976.

NC 27. *Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado. Especificaciones*. La Habana: Oficina Nacional de Normalización, ICS: 13.060.30, 1999.

PÉREZ, M., ALONSO, J., LOPÉZ, C., and VAAMANDE, E. Cadmium removal by living cells of marine microalgae *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*. Vol. 84, 2002, pp. 265-270.

PETHKAR, K., GAIKAIWARI, R.P., and PAKNIKAR, K.M. Biosorptive removal of contaminating heavy metals from plant extracts of medicinal plants. *Current Science*. Vol. 80, 2001, pp. 1216-1218.

SILVER, S., PHUNG, L.T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. Vol. 32, 2005, pp. 587-605.

SLABA, M. and DŁUGONSKI, J. Zinc and lead uptake by mycelium and regenerating protoplasts of *Verticillium marquandii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 20, 2004, pp. 323-328.

SMITH, D.H. R-Factor mediated resistance to mercury, nickel and cobalt. *Science*. Vol. 156, 1967, pp.1114-1115.

SPROCATI, A.R., ALISI, C., SEGRE, L., TASSO, F., GALLETTI, M., and CREMISINI, C. Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. *Sci. Total Environ*. Vol. 366, 2006, pp. 649-658.

TABACCHIONI, S., BEVIVINO, A., DALMASTRI, C., and CHIARINI, L. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: A minireview. *Ann. Microbiol*. Vol. 52, 2002, pp. 103-117.

TRAJANOVSKA, S., BRITZ, M.L., and BHAVE, M. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram positive and Gram-negative bacteria isolated from lead contaminated site. *Biodegradation*. Vol. 8, 1997, pp. 113-124.

UTIGIKAR, V., CHEN, B.Y., TABAK, H.H., BISHOP, D.F., and GOVIND, R. Treatment of acid mine drainage. I. Equilibrium biosorption of zinc and copper on non-viable activated sludge. *International Biodeterioration Biodegradation*. Vol. 46, 2000, pp. 19-28.

VALLS, M. and DE LORENZO, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 26, 2002, pp. 327-338.

VIEIRA, R. and VOLESKY, B. Biosorption: A solution to pollution? *International Microbiology*. Vol. 3, 2000, pp. 17-24.

VOLESKY, B. *Biosorption for the next century*. International Biohydrometallurgy Symposium, El Escorial, Spain, June, 20-23, 1999.

VULLO, D.L., CERETTI, H.M., HUGHES, E.A., RAMIREZ, S., and ZALTS, A. Indigenous heavy metal multiresistant microbiota of Las Catonas stream. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 105, 2005, pp. 81-97.

Abstract

SALGADO-BERNAL, I., CARBALLO-VALDÉS, M.E., MARTÍNEZ-SARDIÑAS, A., CRUZ-ARIAS, M. & DURÁN-DOMÍNGUEZ-DE-BAZÚA, M.C. Interaction of rhizosphere bacterial isolates with environmentally significant metals. Water Technology and Sciences *(in Spanish). Vol. III, No. 3, July-September, 2012, pp. 83-95.*

The threat of heavy metals to public health and the environment has led to the search for technologies that enable the removal or neutralization of their toxic effects. Microorganisms are among the most relevant new techniques. This study set out to describe the interactions of 13 rhizosphere bacterial isolates obtained from hydrophytic plants found in natural wetlands, with 4 environmentally significant heavy metals –chromium (Cr^{6+}), lead (Pb^{2+}), cadmium (Cd^{2+}) and mercury (Hg^{2+})– for selection of strains with the potential for water remediation. The resistance of the isolates to the 4 metals was determined, selecting 3 concentrations and supplementing nutrient agar with metal salts to achieve the corresponding concentrations (chromium and lead 1.0, 2.0, 3.0 mM; cadmium 0.6, 1.2, 1.8 mM, and mercury 0.01, 0.02, 0.03 mM). Biosorption tests were conducted with mixed metal solutions and the quantity of metal removed per biomass mass (q) *was determined. All studied isolates showed resistance to more than one metal. It was found that some strains removed metals, 4 of which were notable for their possible joint usage to remove lead, chromium and mercury. The results obtained are significant since the metal concentrations studied are above the maximum allowable limits for water, according to Cuban Standard NC 27-1999 and other international standards. Therefore, the strains that demonstrated resistance and removal may be promising bioremediation agents for removing pollutants from water.*

Keywords*: bacteria, interaction, heavy metals, resistance, removal, water treatment.*

Dirección institucional de los autores

M.C. Irina Salgado Bernal

Universidad de La Habana
Departamento de Microbiología y Virología
Laboratorio de Ecosistemas Acuáticos
Calle 25 núm. 455 entre J e I, Vedado, 10400
La Habana, Cuba
Teléfono: +53 (7) 8329 241
Fax: +53 (7) 8321 321
irina@fbio.uh.cu
irina.salgado@yahoo.com.mx

Dra. María Elena Carballo Valdés

Universidad de La Habana
Departamento de Microbiología y Virología
Laboratorio de Ecosistemas Acuáticos
Calle 25 núm. 455 entre J e I, Vedado, 10400
La Habana, Cuba
Teléfono: +53 (7) 8329 241
Fax: +53 (7) 8321 321
mecarballo@fbio.uh.cu

M.C. Armando Martínez Sardiñas

Universidad de La Habana
Departamento de Microbiología y Virología
Laboratorio de Ecosistemas Acuáticos
Calle 25 núm. 455 entre J e I, Vedado, 10400
La Habana, Cuba
Teléfono: +53 (7) 8329 241
Fax: +53 (7) 8321 321
armando@fbio.uh.cu

Dr. Mario Cruz Arias

Universidad de La Habana
Departamento de Microbiología y Virología
Laboratorio de Ecosistemas Acuáticos
Calle 25 núm. 455 entre J e I. Vedado. 10400
La Habana, Cuba
Teléfono: +53 (7) 8329 241
Fax: +53 (7) 8321 321
mcruz@fbio.uh.cu

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Paseo de la Investigación Científica s/n
Conjunto E. Laboratorios 301 al 303
Primer piso
Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán
04510 México, D.F., México
Teléfono: +52 (55) 5622 5300 al 04
Fax: +52 (55) 5622 5303
mcduran@servidor.unam.mx