

Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá

Tolerance lead of native *Pseudomonas* spp. wastewater from Aburrá Valley

Jessica María Bedoya Vélez*; Gustavo Castaño**; Susana Ochoa Agudelo ***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146

RESUMEN

El plomo (Pb) es un metal pesado cuyas características físico-químicas lo convierten en un contaminante ambiental persistente, bioacumulable y de alta toxicidad. La biorremediación surge como una alternativa con múltiples ventajas en comparación con los tratamientos convencionales para remover contaminantes como metales pesados de aguas residuales, basándose en las capacidades de tolerancia y mecanismos de resistencia de los microorganismos. Con el fin de conocer la tolerancia de *Pseudomonas* spp. al plomo presente en aguas contaminadas, se obtuvieron cuatro aislados nativos, procedentes de aguas residuales colectadas en el río del Valle de Aburrá (zona norte), los cuales se caracterizaron bioquímicamente. Se realizaron bioensayos de tolerancia en diferentes concentraciones de plomo por difusión en agar, como prueba tamiz, y determinación de la concentración mínima inhibitoria, determinando la viabilidad del microorganismo en cada exposición. No se presentó diferencia significativa para la tolerancia al plomo entre los aislados, identificados bioquímicamente como *Pseudomonas aeruginosa*, ni entre las diferentes concentraciones de plomo a las cuales fueron expuestos los aislados. A partir de estos resultados, se discute a cerca de los mecanismos reportados por diferentes autores, mediante los cuales *Pseudomonas* spp. puede actuar en presencia de Plomo. De esta manera, se concluye que los aislados de *Pseudomonas* spp. presentan mecanismos de tolerancia y/o resistencia hasta concentraciones de 2500 mg/L en presencia de nitrato de plomo, como potenciales agentes que pueden integrarse en procesos que impulsan nuevas tecnologías de biorremediación.

Palabras clave: Biorremediación ambiental, metales pesados, contaminantes del agua, microbiología del agua (fuente: DeCS).

ABSTRACT

Lead (Pb) is a heavy metal whose physico-chemical characteristics make it a persistent environmental pollutant, bioaccumulable and highly toxic. Bioremediation emerges as an alternative with multiple advantages compared to conventional treatments to remove contaminants such as heavy metals from wastewater, based on the tolerance capacities and/or resistance mechanisms of microorganisms. In order to know the tolerance of *Pseudomonas* spp. to the lead present in contaminated waters, four native isolates were obtained, coming from wastewater collected in the north from Aburrá Valley River, which were characterized biochemically. Tolerance bioassay was carried out in different concentrations of lead by agar diffusion, as a screening test, and determination of the minimum inhibitory concentration, determining the viability of the microorganism in each exposure. There was no significant difference for lead tolerance between the isolates, identified biochemically as *Pseudomonas aeruginosa*, nor between the different concentrations of lead to which the isolates were exposed. From these results, we discuss about the mechanisms reported by different authors, by means of which *Pseudomonas* spp. can act in the presence of lead. In this way, it is concluded that the isolates of *Pseudomonas* spp. they present tolerance and/or resistance mechanisms up to 2500 mg/L in the presence of lead nitrate, as potential agents that can be integrated into processes that promote new bioremediation technologies.

Keywords: Environmental bioremediation, metals heavy, water pollutants, water microbiology (Source: DeCS).

Recibido: noviembre 15 de 2018 **Aprobado:** mayo 6 de 2019

* Bacterióloga y laboratorista clínico, Especialista en microbiología ambiental, IUCMA; <https://orcid.org/0000-0003-3303-1842>; jbedoyav7@gmail.com

** Biotecnólogo, IUCMA; <https://orcid.org/0000-0002-2358-1448>; GUSTAVO121994@hotmail.com.

*** MSc. Biotecnología, Docente investigador IUCMA, grupo Biociencias; Carrera 78 # 65-46, Medellín - Antioquia; <https://orcid.org/0000-0001-5369-7137>; susana.ochoa@colmayor.edu.co.

INTRODUCCIÓN

Con el rápido crecimiento industrial, enormes cantidades de residuos, incluyendo metales pesados, son dispuestos en el ambiente (Naik & Dubey 2013). En las últimas décadas las concentraciones de metales no esenciales (p.e. Pb, Cd y Hg) han aumentado en aguas y sedimentos rápidamente, esto como consecuencia de actividades industriales, como galvanoplastia, pinturas, baterías, curtidos, textiles, entre otras, los cuales generan aguas residuales con elevada concentración de metales pesados, además estos están considerados dentro de los mayores agentes tóxicos asociados a contaminación ambiental (Majumder *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2010). Su presencia en los recursos hídricos ha sido responsable de muchas situaciones de impacto no solo ecológico sino también sobre la salud pública en general (Mancera & Álvarez 2006). Este creciente desarrollo industrial sumado al manejo inadecuado de los residuos con contenidos de metales pesados, constituyen una gran problemática a nivel mundial, pues estos son contaminantes que a diferencia de los compuestos orgánicos no pueden ser sintetizados o degradados, estos únicamente pueden ser transformados de un estado de valencia a otro y este influye a su vez en la biodisponibilidad y los efectos que pueda generar en los sistemas vivos (Fairbrother *et al.*, 2007).

El plomo (Pb) hace parte del grupo de metales pesados, es un contaminante ambiental persistente, que se acumula lentamente dando lugar a procesos de biomagnificación en los diferentes niveles de la cadena trófica; además se ha determinado que este metal puede causar lesiones oxidativas en el ADN (Xu *et al.*, 2018), daños a proteínas, lípidos y puede sustituir también iones metálicos esenciales tales como Zn, Ca y Fe, presentes en algunas enzimas (Naik & Dubey, 2013). La exposición al plomo por largos períodos de tiempo produce anemia, alteraciones en la reproducción, insuficiencia renal, cáncer y daño neurodegenerativo (Kang *et al.*, 2015), por lo tanto, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) ha incluido el plomo en la lista de residuos peligrosos inorgánicos (Naik & Dubey, 2013). Los múltiples efectos tóxicos causados por este metal lo han convertido en un problema de preocupación mundial. La Organización Mundial de la Salud clasifica el plomo como uno de los 10 productos químicos que más causa afecciones graves de salud, lo cual a su vez se convierte en un problema de salud pública. Se estima que 143.000 vidas son cobradas cada año debido a la exposición a este metal, con registro de tasas más altas en los países en desarrollo (OMS, 2014).

Debido a los innumerables problemas que genera el vertimiento de aguas residuales con contenido de metales pesados, especialmente aquellos que se encuentran en el grupo de no esenciales, es necesario tratar estos efluentes antes de su descarga al medio ambiente (Barakat, 2011). En los últimos años, varios procesos se han desarrollado con el objetivo de reducir o recuperar metales pesados de los ambientes contaminados (Kang *et al.*, 2016). Los tratamientos físicos-químicos son capaces de eliminar un amplio espectro de contaminantes (Kang *et al.*, 2016), sin embargo, las principales desventajas de estos métodos son la eliminación incompleta, los requisitos de alta energía y la producción de lodos tóxicos (Barakat, 2011).

Existen algunos tratamientos biológicos que pueden resultar eficientes, amigables con el ambiente, permiten reducir costos en el proceso y además, son eficientes aun cuando hay bajas concentraciones del metal; adicionalmente pueden realizarse en el sitio de contaminación, por lo que no genera impactos negativos en las zonas tratadas o alteraciones al ecosistema (Kang *et al.*, 2015; Majumder *et al.*, 2014; Mani & Kumar, 2014). Los microorganismos pueden tolerar y crecer en diversas condiciones extremas de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, así como en concentraciones altas de metales, debido a que han desarrollado estrategias de supervivencia en hábitats contaminados, para el caso de metales pesados, y dichas estrategias de desintoxicación microbiana pueden ser aplicadas para diseñar procesos de biorremediación económicos (Muñoz *et al.*, 2012). Algunas cepas microbianas, incluyendo bacterias, emplean una variedad de mecanismos de tolerancia y/o resistencia para sobrevivir en altos niveles de metales, como el plomo, sin mayor impacto en su crecimiento o metabolismo (Naik & Dubey, 2013). Entre estos mecanismos se incluyen: precipitación extra e intracelular, biotransformación, adsorción por polisacáridos, unión a elementos de la pared celular o sistemas de eflujo (Jarosławiecka & Piotrowska, 2014). Una gran variedad de microorganismos que son resistentes a metales han sido aislados de sitios contaminados con estos elementos. Los suelos o aguas contaminados exponen a los microorganismos presentes a metales pesados, lo cual conduce a que desarrollen tolerancia a estos (Oves *et al.*, 2017). Entre los géneros bacterianos que han sido reportados, se encuentran bacterias Gram positivas como: *Bacillus cereus*, *Arthrobacter* sp. y *Corynebacterium* sp. y Gram negativos: *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* spp. y *Ralstonia* sp. (Jarosławiecka & Piotrowska 2014; Oves *et al.*, 2017). Las bacterias del género *Pseudomonas* spp. están presentes en la mayoría de los ecosistemas de suelo y agua, estas son capaces de metabolizar

una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, además son bien conocidas por su capacidad de tolerar y resistir moléculas tóxicas, incluidos antibióticos, metales pesados, detergentes y disolventes orgánicos (Chien *et al.*, 2013).

Dado que diariamente se depositan altas concentraciones de metales pesados, como plomo, en el ambiente, especialmente en aguas superficiales, y en vista de que estos constituyen un gran riesgo ecológico, ambiental y para la salud de los seres vivos, es necesario buscar e implementar mecanismos que permitan remover estos contaminantes tóxicos de los efluentes de una manera eficiente y a su vez amigable con el medio; es por esto que el objetivo de este proyecto fue evaluar el nivel de tolerancia al plomo de aislados de *Pseudomonas* spp. y discutir acerca de los mecanismos reportados por diferentes autores, mediante los cuales dichos microorganismos pueden actuar en presencia del metal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los aislamientos de *Pseudomonas* spp.

Se tomaron muestras de aguas residuales del río Medellín, zona norte (Girardota), de un sector aledaño a industrias emisoras de residuos con plomo. El contenido de plomo se midió en el agua en el laboratorio LACMA (Laboratorio de control calidad microbiológica, Ins. Universitaria Colegio Mayor de Antioquia), por la técnica referenciada del *Standard Methods for examination of water and wastewater APHA* (2005), reportada como contenido de plomo en mg/L. Una vez detectada la presencia de plomo, se procedió a preparar las muestras para siembra en Agar cetrimide (Oxoid®), mediante siembras en superficie a partir de diluciones seriadas, incubadas a 35°C durante 24 a 48 horas. Se realizó recuento de UFC/mL y se seleccionaron colonias que presentaron diferentes morfologías para su purificación por la técnica de agotamiento en placa (Agar cetrimide), y a partir de su identificación microscópica por tinción de Gram, se determinó su pureza. El perfil bioquímico se realizó por la técnica semiautomatizada VITEK2® (biomerieux®) y se complementó con otras pruebas bioquímicas (Catalasa, oxidasa, urea) para confirmar su identidad consistente con *Pseudomonas* spp., siendo nuestro microorganismo de interés.

Bioestimulación de aislados de *Pseudomonas* spp. en una solución de plomo

Este método se realizó con el fin de hacer una selección de los aislados de *Pseudomonas* spp. con capacidad de crecer en presencia de plomo, basado en la metodología utilizada por Garza (2005). Brevemente, se utilizaron er-

lenmeyer de 250 mL, los cuales contenían 50 mL de medio caldo de infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid®), suplementados con una suspensión de 5 mL de Nitrato de Plomo ($Pb(NO_3)_2$) en concentración de 500 mg/L; para el control negativo se utilizó el medio BHI con la solución de plomo, sin microorganismo y otro medio sin el metal y sin microorganismo. Las muestras se inocularon por triplicado e incubaron a temperatura ambiente con agitación a 150 rpm durante 10 días. Se determinó masa celular por turbidimetría medida por espectrofotometría (Espectrofotómetro Mindray Microplate Reader® MR-96 A) y las muestras se leyeron a una longitud de onda de 600 nm (Chien *et al.*, 2013).

Determinación del nivel de tolerancia al plomo

Bajo las condiciones controladas del ensayo de bioestimulación, se seleccionaron aislados con capacidad de crecer en presencia de plomo. De esta manera, y a partir de un ensayo tamiz por la técnica de difusión en agar, se utilizaron dos concentraciones de la solución de $Pb(NO_3)_2$ (500 y 2000 mg/L), para explorar la capacidad de crecer de los aislados obtenidos, en su presencia, con el fin de determinar las concentraciones que se utilizarían para el método de concentración mínima inhibitoria (CMI). La tolerancia se estimó por la intensidad de crecimiento alrededor de los discos o inhibición del crecimiento con halos superiores a 2 mm (Garza, 2005)

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de plomo

Inicialmente, cada uno de los aislados seleccionados, se inocularon en 100mL de caldo BHI, durante 24 horas a 35° C, con el fin de obtener un inóculo madre en fase exponencial. Por otro lado, se dispuso de tubos con 10 mL de caldo BHI (Oxoid®) para cada aislado por duplicado, los cuales se suplementaron con una solución de $Pb(NO_3)_2$ en concentraciones crecientes: 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 mg/L, como unidades experimentales independientes. Cada tubo se inoculó con 1 mL de cada aislado en suspensión previamente preparado en fase exponencial ($1,5 \times 10^8$ células/mL), tomando como referencia la turbidez de 0,5 en la escala de Mac Farland; como control negativo se emplearon tubos con el caldo BHI y las diferentes soluciones de plomo. Las unidades experimentales se incubaron durante 10 días a temperatura de 35°C. Se determinó crecimiento microbiano por turbidimetría medida por espectrofotometría (Espectrofotómetro Mindray Microplate Reader® MR-96 A) a una longitud de onda de 600 nm (Chien *et al.*, 2013) en el tiempo final. Adicionalmente, cada unidad experimental se sembró en Agar Cetrimide, para verificar que la turbidez medida de cada muestra, correspondía a biomasa viable en el tiempo final del experimento. Las placas se incubaron a temperatura de 35 °C durante 48 horas.

Análisis de datos

Para la primera parte de aislamiento e identificación de los microorganismos de interés, se realizó un análisis descriptivo de los datos recolectados en el laboratorio, y correlacionados con la literatura para la aproximación de su identidad, incluyendo los datos obtenidos por la técnica semiautomatizada VITEK2® (biomerieux®) para complementar su identificación soportada en los resultados de la probabilidad y un nivel de confianza descriptivo arrojado por el software.

Para definir el nivel de tolerancia de los aislados obtenidos al plomo, el estudio se abordó en dos momentos, un primer momento de tipo descriptivo a partir del ensayo de bioestimulación de los aislados con plomo, para determinar la capacidad de sobrevivir en una concentración de plomo, superior a la inicialmente expuesta en la matriz de aislamiento (en caso de no presentarse diferencia estadísticamente significativa entre los aislados, en esta fase, estos serán tratados como replicas para los subsecuentes experimentos). El resultado de esta fase determinó el siguiente momento asociado a la fase explicativa y experimental de variaciones concomitantes dentro del diseño completamente aleatorizado incluyendo el factor de la concentración de plomo en el medio, bajo cinco niveles (500, 1000, 1500, 2000 y 2500 mg/L), para


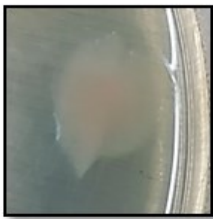
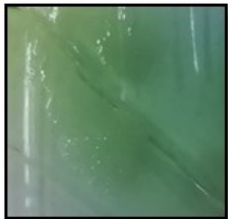
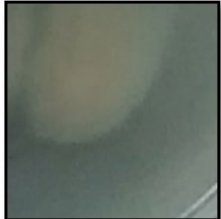
un total de cinco tratamientos. Los datos fueron estudiados a través de un análisis de varianza de una sola vía, considerando cada concentración como un tratamiento. Una vez detectada alguna diferencia estadística entre las varianzas, se procedió a la realización de una comparación múltiple de medias a través de la prueba de Tukey (HSD). Para todos los efectos, se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$ con un nivel de confianza de 95%. Cabe resaltar, que previo a cualquier análisis, se realizó una prueba de normalidad (Shapiro Wilks), prueba de homogeneidad de varianza (Levene) e independencia de los residuos. Para el análisis de los datos, se utiliza un paquete estadístico SPSS versión 25 (IBM® SPSS® Statistics GradPack).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de los aislamientos de *Pseudomonas* spp.

Caracterización morfológica y bioquímica. En la diversidad morfológica obtenida en el agar cetrímide, se obtuvieron seis aislados, que, dentro de las características macroscópicas y microscópicas, presentaron una aproximación en la búsqueda de especies de *Pseudomonas*. Los aislados sometidos a las pruebas bioquímicas en VITEK2®, con una probabilidad superior al 90%, se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa* (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de características macroscópicas, microscópicas e identificación bioquímica de los aislados.

Código Aislados	P01	P02	P05	P06
Morfología microscópica	Bacilos Gram negativos			
Morfología macroscópica	Colonias circulares, convexas, brillantes, de borde continuo.	Colonias irregulares, brillantes, de borde ondulado.	Colonias circulares, convexas, brillantes, de borde continuo, con pigmento.	Colonias circulares, convexas, brillantes, de borde continuo.
				
Pruebas bioquímicas complementarias				
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-

Bioestimulación de aislados de *Pseudomonas* spp. en una solución de plomo

Los aislados de *Pseudomonas* spp. mostraron la capacidad para tolerar plomo en concentraciones de 500 mg/L. El análisis de varianza de una sola vía mostró que el tipo de aislamiento no posee ningún efecto sobre la absorbancia medida (tabla 2). Adicionalmente, el R^2 del modelo lineal ajustado, en general mostró que el factor tipo de aislado, solo explica el 45% de la variación observada en la absorbancia. Esto indica que los aislamientos presentaron mecanismos para tolerar concentraciones relativamente altas de plomo con respecto a la concentración medida en el agua residual inicial, reportada como contenido de plomo de 0.53 mg/L, de donde estos microorganismos fueron aislados previamente.

Tabla 2. Análisis de varianza entre aislados de *Pseudomonas* spp. expuestos a una concentración de 500 mg/L de $Pb(NO_3)_2$ en ensayo de bioestimulación.

Aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	Método inicial de enriquecimiento
	500 mg/L de $Pb(NO_3)_2$
P 01	0.14+/- 0.02 ^a
P 02	0.11+/- 0.02 ^a
P 05	0.17+/- 0.001 ^a
P 06	0.14+/- 0.001 ^a
Valor de p	0.163

Determinación del nivel de tolerancia al Plomo

La prueba de difusión en disco, utilizada como prueba tamiz, mostró que los cuatro aislados de *Pseudomonas* spp. fueron capaces de crecer alrededor de los discos con las concentraciones de solución de $Pb(NO_3)_2$ a 500 y 2000 mg/L (figura 1). No se observó ningún tipo de halo de inhibición, por lo cual se puede contemplar la hipótesis que todos los aislados de *Pseudomonas* spp. pueden tolerar la presencia de concentraciones por encima de los 500 mg/L, incluyendo concentraciones hasta los 2000 mg/L. Este resultado permitió verificar que las concentraciones seleccionadas para la prueba de CMI, son pertinentes para identificar el nivel de tolerancia de los aislados y el efecto que puede presentar en presencia del plomo en concentraciones superiores a 500 mg/L.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Plomo: Los resultados de la CMI, confirmaron la tolerancia a altas concentraciones de plomo de los cuatro aislados, debido a que se obtuvo recuperación de la biomasa viable

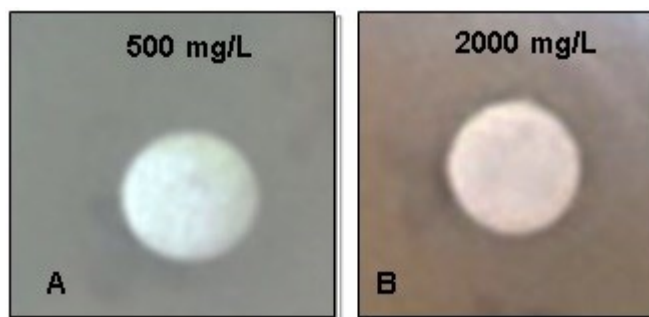


Figura 1. Prueba de difusión en disco para aislados de *Pseudomonas* spp. (Aislado P01). A) Evaluación del crecimiento bajo concentración de 500mg/L de solución de $Pb(NO_3)_2$ B) Evaluación del crecimiento bajo concentración de 2000mg/L de solución de $Pb(NO_3)_2$. Tiempo de incubación durante 24 horas a 35° C.

hasta en la concentración más alta (2500 mg/L de $Pb(NO_3)_2$). Esto podría suponer que los aislados pueden soportar concentraciones mayores de plomo.

Teniendo en cuenta que en el análisis de varianza entre los aislados expuestos a la concentración de 500 mg/L de $Pb(NO_3)_2$, no se presentó diferencias estadísticamente significativas, los aislados se tomaron como replicas para el análisis estadístico de las diferentes concentraciones de $Pb(NO_3)_2$ establecidas previamente para el ensayo de CMI (tabla 3). De esta manera, el análisis de varianza mostró que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de plomo a las cuales se expusieron los aislados ($p=0.057$); sin embargo, mediante la prueba de Tukey se pudo evidenciar una diferencia significativa al aumentar la concentración de plomo de 500 mg/L a 2000 mg/L ($p=0,03$) (figura 2).

En la figura Gráfico de perfiles de medidas globales (figura 2), se identifica una tendencia del aumento de las absorbancias asociada a las concentraciones mayores de plomo, principalmente por tolerancia al medio con dicho elemento por parte de la mayoría de los aislados de *Pseudomonas* spp.

A partir de los resultados experimentales y la revisión de literatura se pueden asociar algunos mecanismos bajo los cuales *Pseudomonas* spp. puede actuar en presencia de metales pesados.

Entre los mecanismos reportados en la literatura de tolerancia a plomo, empleados por los microorganismos, se destacan para el género *Pseudomonas* spp. bioacumulación intracelular (a través de metalotioneinas), biosorción en superficie celular y bioprecipitación (Naik & Dubey, 2013).

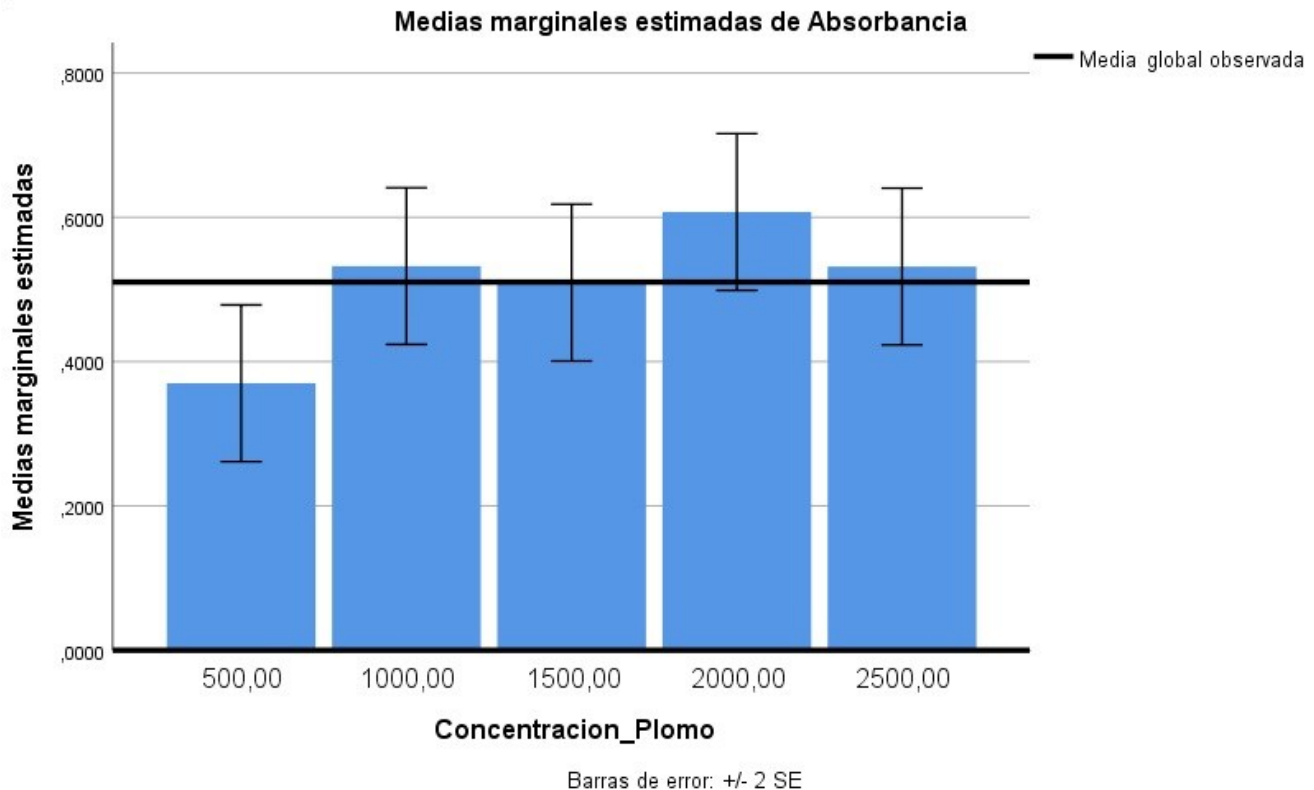


Figura 2. Gráfico de Perfil para medidas globales de absorbancia en diferentes concentraciones de plomo (500 mg/L, 1000 mg/L, 1500 mg/L, 2000 mg/L y 2500 mg/L) independiente del aislado de *Pseudomonas* spp.

Algunos estudios han reportado la enzima ureasa en la precipitación de metales pesados. En el proceso de hidrólisis de la urea se producen amonio e iones de hidróxido, los cuales aumentan el pH en el agua, lo que a su vez puede desplazar el equilibrio del bicarbonato, resultando en la formación de iones de carbonato, este cambio puede entonces precipitar los iones de metales pesados en aguas residuales o el suelo (Li *et al.*, 2013). Un estudio realizado con bacterias ureolíticas aisladas de suelo de minas de metales demostró mediante microscopía electrónica de barrido, precipitación de cristales de $PbCO_3$ (Kang *et al.*, 2015). Lo anterior prueba que la actividad de la ureasa facilita la precipitación del plomo, sin embargo, en la literatura revisada no se encontró informes de *Pseudomonas* spp. relacionados con la actividad de esta enzima y su uso como mecanismo de tolerancia a metales. De esta manera, aunque en el estudio complementario de pruebas bioquímicas se verificó la actividad de la enzima por la prueba de urea, todos los aislados presentaron prueba de urea negativa.

Otro posible mecanismo desarrollado por los asilamientos de *Pseudomonas* spp. estudiado, y que ha sido bien documentado en la literatura, es la biosorción o bioadsorción. La biosorción hace referencia a la captación

pasiva de iones metálicos a través de diferentes mecanismos físico-químicos o metabólicos, llevados a cabo por células vivas o muertas y/o sus componentes (Abdel & El 2014; Ballardo de la Cruz *et al.*, 2015). Este mecanismo fue reportado por Gabr *et al.*, 2008, en su investigación sobre la biosorción de plomo y níquel por células vivas y no vivas de *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6A, demostraron mediante análisis por espectrofotometría Infrarroja (IR) que la captación máxima de adsorción de plomo (calculada mediante la ecuación de Langmuir) de células secadas por calor y células liofilizadas fue de 123 y 93 mg/g respectivamente y la bioacumulada por células vivas fue de 79 mg/g (Gabr *et al.*, 2008). No obstante, no se puede descartar la probabilidad que a los aislados ante la presencia del metal se les haya inducido la producción de proteínas de unión a metales, conocidas como metalotioneínas, las cuales permiten que se dé la bioacumulación de metales tóxicos dentro de la bacteria. Las metalotioneínas son un tipo de proteínas que poseen una significativa cantidad de residuos de cisteína (Cys), lo cual les confiere la capacidad para unirse a iones metálicos (Capdevila *et al.*, 2012). Diversos estudios enfocados a conocer mejor este mecanismo han probado la existencia de genes específicos que codifican estas proteínas. Se han reportado varias cepas bacterianas

Tabla 3. Análisis de varianza entre las absorbancias medidas en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* expuestas a diferentes concentraciones de plomo.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)					
Concentraciones de solución de plomo	500 mg/L	1000 mg/L	1500 mg/L	2000 mg/L	2500 mg/L
Aislados de <i>Pseudomonas</i> spp.	0.37+/- 0.13 ^a	0.53+/- 0.14 ^{ab}	0.51+/- 0.15 ^{ab}	0.61+/- 0.17 ^b	0.53+/- 0.17 ^{ab}

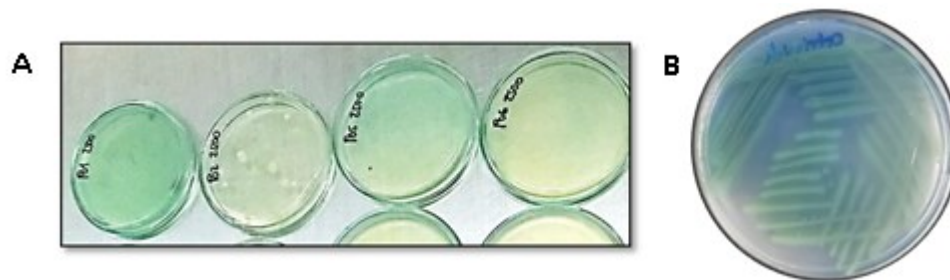


Figura 3. Prueba de viabilidad y obtención de aislados puros **A)** Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* para verificación de viabilidad posterior a 10 días de incubación con una concentración de solución de plomo a 2500mg/L, donde se evidencia la producción de pigmento en los aislados P01, P05 y P06. **B)** Pigmento característico del aislado P05 aislado inicialmente del agua residual.

que poseen estos genes, entre las que se incluyen *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, ambas reportadas con el gen *bmtA* (Naik *et al.*, 2012). Cabe señalar que la biosíntesis de estas proteínas puede ser inducida en respuesta a la presencia de metales como Cd, Pb, Zn, y Cu (Naik & Dubey, 2013).

Existe evidencia de que *Pseudomonas* spp. utilizan mecanismos de biosorción y bioacumulación (mediante metalotioneínas), como estrategia para tolerar altas concentraciones de Plomo, por lo que se proponen como posible explicación a la tolerancia de los aislados P01, P02, P05 y P06 obtenidos en este estudio y los cuales demostraron tener la capacidad de crecer en un medio que contenía hasta 2500 mg/L de Plomo.

El recuento en placa de los aislados en el tiempo final de incubación, demostró que los microorganismos continuaron viables cultivables, con recuentos por encima de 300 UFC/mL. Se pudo apreciar además que hubo producción de pigmento en los aislamientos P01 y P06, cuando inicialmente solo fue característico del aislado P05 al momento de aislarlo del agua residual (figura 3). Luego de realizar los ensayos y exponerlos a las diferentes concentraciones de plomo, los aislados P01, P06 y nuevamente P05 evidenciaron producción de pigmento en el medio, adicionalmente todos los aislados incluyen-

do P02 presentaron formación de un contenido mucoso suspendido en el medio, aparentemente asociados a la formación de biopelículas (no se muestran datos). Esto se debe a que entre la amplia variedad de mecanismos de resistencia y detoxificación que poseen las bacterias del género *Pseudomonas* spp., se encuentran también la formación de biopelículas o biofilm y la producción de sustancias poliméricas extracelulares. Los exopolisacáridos (EPS) juegan un papel clave en la unión inicial de las células a diferentes sustratos, en la unión célula a célula (agregación celular) y por ende en la formación del biofilm y este finalmente les confiere protección a las células contra la desecación y constituye un mecanismo de resistencia contra materiales nocivos exógenos, entre los que se incluyen metales pesados (Chien *et al.*, 2013; Naik & Dubey 2013). Todo esto sugiere que la bioacumulación de metales pesados por medio de exopolisacáridos producidos por *Pseudomonas* spp., es uno de los mecanismos importantes que contribuyen a los rasgos de resistencia y tolerancia a metales pesados por estas bacterias (Chien *et al.*, 2013).

Por otro lado, la producción de pigmentos también puede jugar un papel importante en la tolerancia al plomo por los aislados. Se ha informado que bajo condiciones de estrés por la presencia de altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, se puede inducir

la producción de pigmentos al medio en respuesta a estos elementos tóxico (Naik & Dubey 2013). Esto se debe a que los sideróforos presentes en los pigmentos, pueden formar complejos estables con los metales como el Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ y Cu²⁺, lo cual influye en la movilidad del metal en el medio y por lo tanto se considera una estrategia importante de la célula para secuestrar el metal tóxico y sobrevivir sin que su presencia afecte su crecimiento (Naik & Dubey, 2011, 2013).

CONCLUSIONES

Los aislados identificados como *Pseudomonas aeruginosa* (P01, P02, P05 y P06) tienen la capacidad para tolerar altas concentraciones de plomo (2500 mg/L) sin que su crecimiento sea inhibido. Se recomienda hacer bioensayos adicionales de concentración mínima inhibitoria para estimar la concentración mínima soportada por los aislados. La aplicación de estudios demostrativos sobre los mecanismos utilizados por estos microorganismos, son necesarios en el desarrollo de procesos que permitan impulsar nuevas tecnologías de biorremediación de aguas contaminadas con metales como el plomo, en ambientes naturales con la finalidad de impactar el efecto tóxico sobre los ecosistemas.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, al grupo BIOCENCIAS de la Facultad de Ciencias de la Salud, al laboratorio LACMA.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel Ghani, N. T., & El Chaghaby, G. A. (2014). Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: A review of recent studies. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 3 (1), 24–42. https://doi.org/10.1007/978-3-540-87781-3_47.

Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>.

APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.

Ballardo de la Cruz, C. E., Merino Rafael, F. A., & Gutiérrez Moreno, S. M. (2015). Evaluación de la capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) y Plomo (II) mediante el uso de biomasa bacteriana muerta en soluciones acuosas. *Theorema UNMSM*, 2(2), 95–106.

Barakat, M. A. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(4), 361–377. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.07.019>.

Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, O., & Atrian, S. (2012). State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1–2), 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.006>.

Chien, C. C., Lin, B. C., & Wu, C. H. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.014>.

Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., & Wood, W. (2007). Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(2), 145–227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.03.015>.

Gabr, R. M., Hassan, S. H. A., & Shoreit, A. A. M. (2008). Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62 (2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.008>.

Garza González, M. T. (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb (II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Universidad de la Habana.

Jarosławiecka, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Lead resistance in micro-organisms. *Microbiology (United Kingdom)*, 160, 12–25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.070284-0>

Kang, C.-H., Kwon, Y.-J., & So, J.-S. (2016). Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecological Engineering*, 89, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.023>

Kang, C. H., Oh, S. J., Shin, Y., Han, S. H., Nam, I. H., & So, J. S. (2015). Bioremediation of lead by ureolytic

- bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. *Ecological Engineering*, 74, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.10.009>.
- Li, M., Cheng, X., & Guo, H. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.016>
- Majumder, S., Gupta, S., Raghuvanshi, S., Gupta, S., & Majumder, S. (2014). Removal of Dissolved Metals by Bioremediation. In S. K. Sharma (Ed.), *Heavy Metals in Water: Presence, Removal and Safety* (pp. 44–56). Cambridge: The Royal Society of Chemistry. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=BF_YBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA44&dq=bioremediation+wastewater+advantage&ots=Bw0F43Ydyo&sig=QwwGx45CNzQ4AwUdYleoOpZvM#v=onepage&q=bioremediation+wastewater+advantage&f=false.
- Mancera Rodríguez, N. J., & Álvarez León, R. (2006). Current State of Knowledge of the Concentration of Mercury and Other Heavy Metals in Fresh Water Fish in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 21. <https://doi.org/doi.org/toc/1900-1649/11/0>.
- Mani, D., & Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: An overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3), 843–872. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0299-8>.
- Morales Fonseca, D., Ruiz Tovar, K., Martínez Salgado, M. M., Soto Guzmán, A. B., Falcony Guajardo, C., Rodríguez Vázquez, R., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2010). Desarrollo de un bioadsorbente laminar con *Phanerochaete chrysosporium* hipertolerante al cadmio, al níquel y al plomo para el tratamiento de aguas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.02.002>.
- Muñoz, A. J., Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K., & Espínola, F. (2012). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal*, 210, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.007>.
- Naik, M. M., & Dubey, S. K. (2011). Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain 4EA. *Current Microbiology*, 62(2), 409–414. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9722-2>.
- Naik, M. M., & Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039>.
- Naik, M. M., Pandey, A., & Dubey, S. K. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.015>.
- OMS. (2014). Centro de prensa: Intoxicación por plomo y salud. Retrieved October 14, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>
- Oves, M., Saghir, M., & Qari, H. A. (2017). Ensifer adhaerens for heavy metal bioaccumulation, biosorption, and phosphate solubilization under metal stress condition. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 80, 540–552. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.026>.
- Xu, X., Liao, W., Lin, Y., Dai, Y., Shi, Z., & Huo, X. (2018). Blood concentrations of lead, cadmium, mercury and their association with biomarkers of DNA oxidative damage in preschool children living in an e-waste recycling area. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(4), 1481–1494. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-9997-3>.