



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL SUELO RESISTENTES AL ARSÉNICO COMO CANDIDATAS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

Identification of arsenic resistant soil bacteria for biorremediation process

Carolina Huertas¹, Nathalia Guevara Campo¹

RESUMEN

La investigación se realizó en un suelo clasificado como Pachic Melanudands, localizado en el municipio de Facatativá. El objetivo del trabajo fue medir la acumulación de As del suelo en estudio, e identificar bacterias resistentes al arsénico, mediante pruebas *in vitro*, e conocer cual especie es la apropiada para ser candidata a procesos de biorremediación. La toma de muestras se realizó a través de un muestreo sistémico, se recolectaron seis muestras en tres puntos, a dos profundidades para la fase de pruebas microbiológicas, y diez submuestras aleatorias para el análisis de suelo y de metales pesados. Se determinó en el suelo la concentración As, posteriormente se realizó el aislamiento de las bacterias, a partir de la siembra en dos diluciones seriadas de suelo (10^{-5} y 10^{-6}), y se cuantificó la carga bacteriana del mismo; consecutivamente se purificaron 11 aislamientos, identificados mediante pruebas bioquímicas siguiendo la metodología de Bergey's. De estos aislamientos se descartaron 5, por pertenecer al género *Neisseria* y a la familia *Enterobacteriaceae*, que se caracterizan por ser patógenas para los humanos. Se verificó la resistencia *in vitro* al Arsénico a las 6 cepas promisorias restantes, (*Bacillus Pasteurii*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Bacillus. sphaericus*, *Sporobolomyce sp.*), a través de las pruebas de difusión en agar enriquecido con 29, 25, 19 y 15 ppm de As, se encontraron 3 géneros candidatos para procesos de biorremediación de Arsénico en el suelo (*Bacillus Pasteurii*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus. Sphaericus*), los cuales fueron crioconservados en el banco de cepas del Tecnoparque Sena Nodo Bogotá.

ABSTRACT

The soil Pachic Melanudands, from Facatativa, Colombia, was selected for investigation. The objective of the work was to measure the As concentration in soil and to identify bacteria resistant to arsenic by *in vitro* test, as well as know the appropriate species to be used for bioremediation process. Samples were obtained through systematic procedures; six samples were collected in three points, at two depths for microbiological proofs; also ten aleatory subsamples for soil and heavy metal analysis. Arsenic concentration in soil was determined; then bacteria isolation was done by planting into, two soil serial dilutions (10^{-5} and 10^{-6}) bacteria load in soil was measured; 11 isolates were consecutively purified and identified by means of biochemical test from de Bergey's. Five of those isolates were discarded as owing to gender *Neisseria* and family *Enterobacteriaceae*, known as being pathogens for humans.

In vitro resistance to arsenic of the six promising stock was verified, ((*Bacillus Pasteurii*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Bacillus. sphaericus*, *Sporobolomyce sp.*); also through diffusion proofs in agar enriched with 29, 25, 19 y 15 ppm As, three genus candidate for bioremediation processes of in soil wear (*Bacillus Pasteurii*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus. Sphaericus*), in the Stokes bank at the Tecnoparque SENA, nodo Bogotá.

¹ Facultad de agronomía,
Universidad de Cundinamarca,
Facatativa.
dichahuna@gmail.com

Palabras clave:

Biorremediación, bacterias,
cepas, arsénico

Key words:

Bioremediation, bacteria,
strains, arsenic

Rec.: 09.08.2016

Acep.: 13.09.2016

INTRODUCCIÓN

No existen reportes sobre estudios de bacterias resistentes al Arsénico asociadas en suelos, como candidatas en procesos de biorremediación de este metal pesado, que en su mayoría proviene de la aplicación indiscriminada de productos agrícolas cuyo efecto residual, disminuye la capacidad de crecimiento de las plantas cultivadas en suelos con alta presencia del mismo.

De acuerdo a la revisión de los plaguicidas utilizados por los agricultores en la zona y la residualidad de los mismos, se encontró que el Captan® es aplicado cada tercer día dejando un excedente de Hg y As. En relación al reporte emitido por el laboratorio Químia LTDA®, se establece que las concentraciones de Cd y Hg no representan niveles de contaminación para los cultivos (Según la Norma Danesa, 2000 y Wachope, 1983), por ello, se optó por realizar el estudio con el As cuya concentración se considera significativa.

El suelo es la materia prima de la producción agrícola y cuenta con una inmensa diversidad microbiana de gran importancia en procesos biológicos, químicos y físicos de dicho recurso. La implementación de prácticas agrícolas inadecuadas como el uso de plaguicidas no controlados influye negativamente en la calidad del suelo, debido a la residualidad de muchos de sus componentes, uno de ellos el arsénico, que afecta principalmente la zona radicular de las plantas impidiendo la absorción de nutrientes y *agua*. Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo del trabajo fue medir la acumulación de As del suelo en estudio, e identificar bacterias resistentes al arsénico, mediante pruebas *in vitro*, como también conocer cual especie es la apropiada para ser candidata a procesos de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en un suelo clasificado como Pachic Melanudands, localizado en el municipio de Facatativá, en la vereda Los Manzano, a una altitud de 2.590 m.s.n.m.; el clima es frío húmedo con temperatura promedio de 13.4°C y una precipitación de 643.9 mm anual.

El suelo clasificado como Pachic Melanudands, presenta un horizonte Ap de 28cm de profundidad,

de textura franca, estructura granular fina, alta porosidad con predominio de mesoporos, altos contenidos de MO, pH de 5.1 y reacción fuerte al NaF. Luego se encuentra el horizonte A1 28 - 40 cm de profundidad, de color negro, textura F; estructura en bloques subangulares medios que rompen a granular; alta porosidad con predominio de mesoporos, límite nítido; pH 5.8; hay reacción al NaF. Posteriormente Horizonte A2 40 - 60 cm de profundidad, de color en húmedo negro (10YR 3/3); textura AF; estructura en bloques medios que rompen a granular; alta porosidad con predominio de mesoporos, presencia de raíces finas y medias (40%), actividad media de mesoorganismos; pH 6.0; hay reacción al NaF. Horizonte A3 60-112X, Color en húmedo negro (10YR2/1); textura franco limosa; estructura de bloques subangulares medios, muchos poros finos intrapedales y macroporos de forma tubular dejados por las raíces en los espacios interpedales, consistencia en húmedo friable, en mojado no pegajosa y no plástica; frecuentes raíces medias y gruesas, vivas y muertas, de distribución normal; baja actividad de mesoorganismos; reacción ligera al fluoruro de sodio; pH 5.5

La toma de muestras se realizó a través de un muestreo sistémico se colectaron seis muestras, en tres puntos, a dos profundidades (A1, A2, B1, B2, C1, C2) para la fase de pruebas microbiológicas, y diez submuestras aleatorias para el análisis de suelo y de metales pesados.

Se determinó la presencia de As en el suelo de estudio por el método de absorción atómica con horno de grafito y absorción atómica con generador de vapor frío. Para el aislamiento de cepas provenientes del suelo se utilizó agua peptona con Tween 80 sembrando en agar nutritivo, con diluciones 10^{-5} y 10^{-6} por duplicado, encubando a 30°C por 48 horas. Para determinar la carga bacteriana del suelo y viabilidad, se utilizó la siguiente fórmula a partir del recuento en placa:

Cálculo de las ufc/g o ml: $FDD = 1 / FD$; siendo FDD factor decimal de dilución y FD factor de dilución.

De los resultados obtenidos en el aislamiento se propagaron individualmente las bacterias encontradas hasta obtener los respectivos cultivos puros, posteriormente en la identificación se vincularon

parámetros macroscópicos como superficie (Sup), forma (For), borde (Bor) y color (Col) del cultivo en placa y parámetros microscópicos como Tinción de Gram (Gram) y morfología microscópica (Morf). Luego de tener la clasificación primaria (Gram negativo, Gram Positivo- Cocos, Bacilos), se empleó la metodología de Bergey's, en donde a través de las pruebas bioquímicas de identificación tardía como: Test de anaerobiosis (Ana), Hidrolisis de almidón (HAlmid), Catalasa (Cata), Reducción de nitratos (Nit), Test de oxidación (Ox), Fermentación de lactosa (FLac), XDL Agar (XDL), Hektoen Enteric Agar (Hektoen), Simons Citrate Agar (Simons), Eosin Methilene Blue Agar (Esosin), Fermentación de Glucosa (FGlu), Agar Pseudo F (PseudoF) y Requerimiento de Na (NaR), se realizó la determinación mínima de género para descartar posibles microorganismos patógenos.

Para determinar la resistencia al As, se establecieron cinco tratamientos y un testigo absoluto (tabla 1), para realizar las pruebas de resistencia de las bacterias al Arsénico, en relación a la concentración del elemento presente en el suelo de estudio, con dos tiempos de lectura diferente a los ocho y quince días después de la siembra.

Para la crioconservación de cepas resistentes al As a través de la ultra-congelación, se empleó la metodología de la crio-preservación de microorganismos con glicerol, el cual se toma 1ml de caldo nutritivo, más 1ml de glicerol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de metales pesados en el suelo de estudio

De acuerdo a la revisión de los plaguicidas utilizados por los agricultores en la zona y la

residualidad de los mismos, se encontró que los plaguicidas derivados del ácido phtalamídico (Dicarboximida), son aplicados cada tercer día dejando un excedente de Hg y As en el suelo, por otra parte, estudios reportan la presencia de Cd en el río Botello, fuente de riego de los sistemas agrícolas de la zona. En relación al reporte emitido por el laboratorio Químia LTDA®, se establece que las concentraciones de Cd y Hg no representan niveles de contaminación para los cultivos (Según la Norma Danesa, 2000 y Wachope, 1983), por ello, se optó por realizar el estudio con el As cuya concentración se considera significativa.

Aislamiento de cepas provenientes de muestras y cuantificación de la carga bacteriana del suelo

Se codificaron los puntos de muestreo A, B y C y los numerales 1 y 2 para identificar las profundidades, donde 1: (00-15 cm) y 2 (15-30 cm). De acuerdo con esto, los resultados obtenidos fueron los reportados en la (Figura 1).

En la cuantificación de la carga bacteriana del suelo, no se observó variación significativa en los sitios A y C, correspondientes en la ubicación del lote al centro del cultivo y límites con la carretera respectivamente, sin embargo en el sitio B, la viabilidad expresada en UFC es mayor con respecto a los sitios anteriores, por lo que la carga bacteriana es mayor en esta área que colinda con un tramo del río botello.

Purificación de colonias e identificación mediante pruebas bioquímicas de las bacterias recuperadas y aisladas

De acuerdo a la diferenciación macroscópica de las colonias encontradas en los recuentos en placa, se aislaron 11 colonias, que se identificaron mediante características microscópicas y pruebas

Tabla 1. Descripción de tratamientos de resistencia de bacterias al Arsénico.

Tratamiento	Especificación
Testigo	AN -3
T1	29 ppm Ar
T2	25 ppm Ar
T3	19 ppm Ar
T4	15 ppm Ar

Fuente. Guevara & Huertas, 2016.

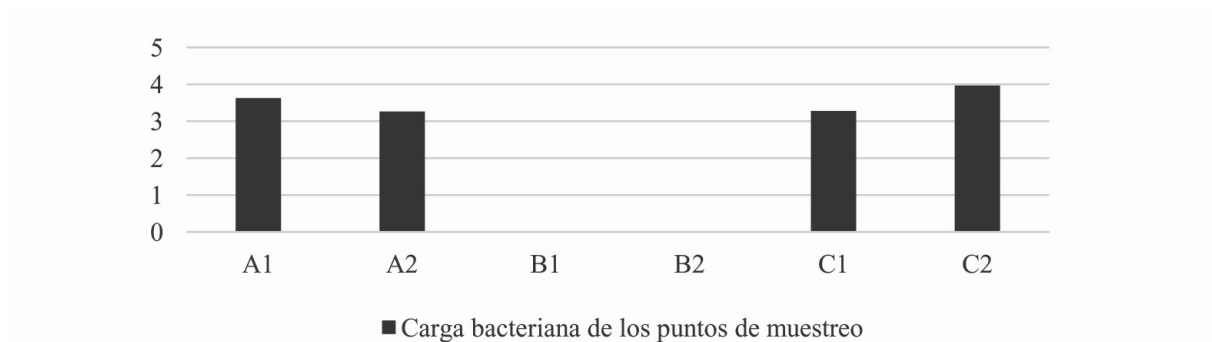


Figura 1. Carga bacteriana del suelo con respecto a los puntos de muestreo.

bioquímicas, de las cuales el 45,45% de los géneros aislados pertenecen al grupo de las Proteobacterias, se considera que el origen de dicha contaminación está relacionado con factores como la ausencia de un perímetro de protección de la explotación pecuaria en la zona y el manejo inadecuado de las aguas residuales de la población, contribuyendo al incremento de coliformes fecales en la fuente hídrica, utilizada como riego para el cultivo cuyo vertedero final el suelo en estudio. El 54,55% de las cepas restantes se consideraron promisorias para las pruebas de resistencia *in vitro* ya que éstos gé-

neros (*Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Sporobolomyce* sp.) no son consideradas patógenas.

Pruebas de resistencia al Arsénico de difusión en agar

Se reportan los datos en dos tiempos diferentes, a los ocho días (Figura 2) y a los quince días (Figura 3) después de la siembra de difusión en agar enriquecido con las concentraciones de Arsénico establecidas.

En cuanto a la prueba de resistencia *in vitro* de las cepas promisorias, se observó actividad resis-

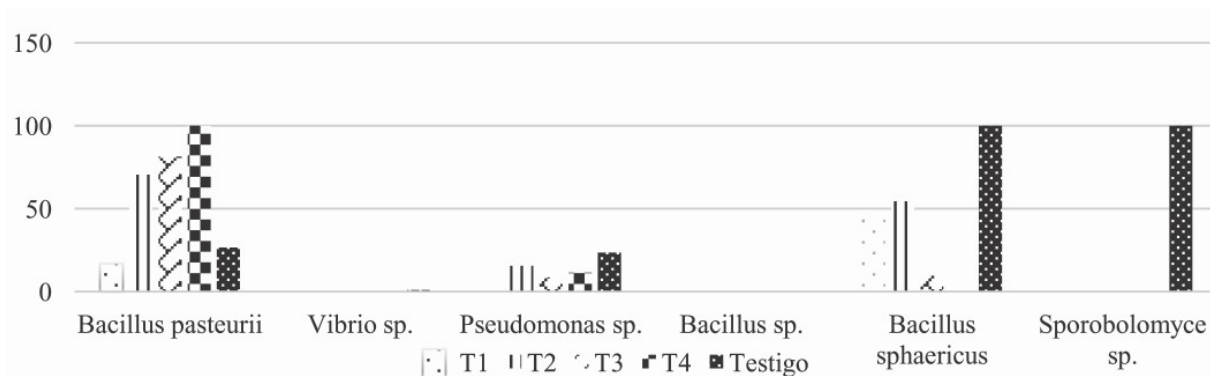


Figura 2. Prueba de resistencia al Arsénico de difusión en agar. Fuente: Guevara & Huertas, 2017.

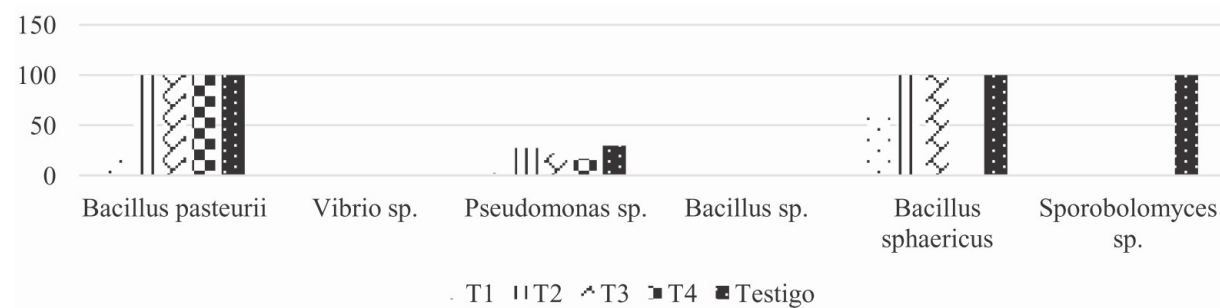


Figura 3. Prueba de resistencia al Arsénico de difusión en agar. Fuente: Guevara & Huertas, 2017.

tente en las bacterias *Bacillus pasteurii*, *Bacillus sphaericus* y *Pseudomonas* spp., presentando mayor viabilidad *Bacillus pasteurii*, creciendo en todos los tratamientos propuestos, sin embargo, se observa una disminución en el desarrollo del tratamiento 1, caracterizado por ser el de la concentración mayor (29 ppm As).

Teniendo en cuenta lo anterior, se establece que la característica principal de resistencia es la presencia de proteínas metalotioneínas y metaloreguladoras en el caso de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. respectivamente. Estas proteínas facilitan la absorción y transformación de los metales pesados, ya sea a compuestos solubles en agua o volátiles, de acuerdo con esto se determina el método más apropiado para biorremediar el suelo contaminado. Es necesario estudiar en detalle la dinámica bacteria-arsénico, mediante la construcción de los modelos de isotermas evaluando la cantidad absorbida del metal en condiciones específicas de presión, temperatura y concentración (Beltrán *et al.*, 2016 y García *et al.*, 2005). Gracias al mecanismo de bioacumulación o unión a metales descrito anteriormente, se ha desarrollado la tecnología de la biosorción, esta utiliza biomasa microbiana

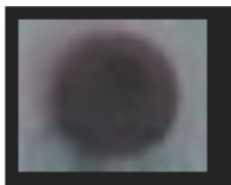
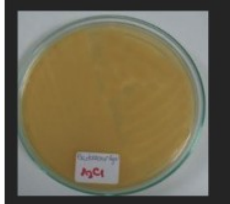
activa o inactiva para secuestrar metales mediante su unión a la superficie celular (Nessner y Esposito, 2010). El proceso ocurre por diversos mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico y cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir con el proceso (Cañizares, 2000).

Sporobolomyce spp., creció solo en el testigo absoluto, y el crecimiento en los demás tratamientos se vió afectado por la presencia del metal. *Vibrio* sp., y *Bacillus* sp., no presentaron actividad de crecimiento en ningún tratamiento debido a su exigencia nutricional, además de verse afectados por las concentraciones de As.

- *Pseudomonas* spp.



Tabla 2 Ruta metabólica *Pseudomonas* spp.

<i>Pseudomonas</i> spp. (A2C1)	
	<i>Test de oxidación</i>
	Positivo: → Formación de compuesto coloreado (azul-violeta) llamado indofenol.
	<i>Fermentación de glucosa</i>
	Negativo: → Ausencia de crecimiento bacteriano en medio de cultivo selectivo.
	<i>Agar Pseudo F</i>
	Positivo: → Positivo: observación de fluoresceína (pigmento color amarillo-verdoso alrededor de las colonias y/o en el medio de cultivo).

Fuente. Guevara & Huertas, 2016

- *Bacillus pasteurii*.

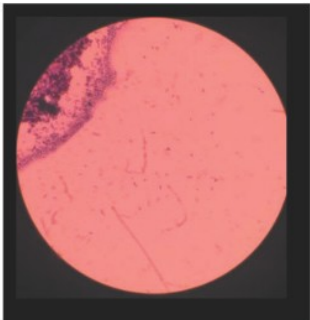
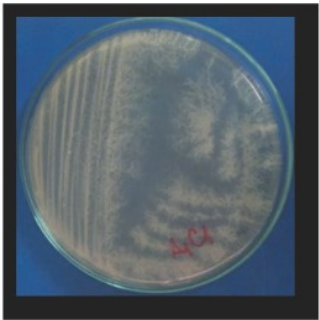
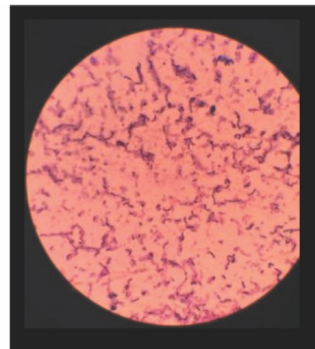
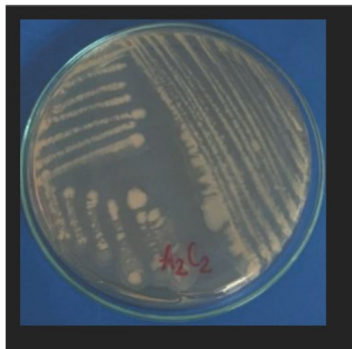
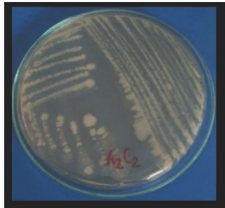
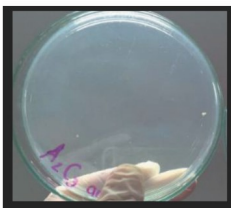
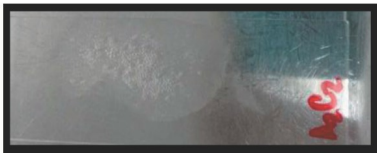


Tabla 3. Ruta metabólica *Bacillus pasteurii*.

<i>Bacillus pasteurii</i> (A1C1)	
	<i>Test de anaerobiosis</i>
	Negativo: → Ausencia bacteriana (-)
	<i>Hidrolisis de almidón</i>
	Negativo: → Ausencia bacteriana (-)
	<i>Catalasa</i>
	Positivo: Desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno.
	<i>Reducción de nitritos</i>
	Positivo: Siembra+ incubación+ Reactivos A y B. → Revelación de nitritos en el medio (color rojizo).

Fuente. Guevara & Huertas, 2016.

- *Bacillus sphaericus*.Tabla 4. Ruta metabólica *Bacillus sphaericus*.

<i>Bacillus sphaericus</i> (A2C2)	
 	<i>Test de anaerobiosis</i>
	Negativo: → Ausencia de crecimiento bacteriano (+)
	<i>Hidrolisis de almidón</i>
	Negativo: → Ausencia de colonias bacterianas
	<i>Catalasa</i>
	Positivo: Desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno.
	<i>Reducción de nitritos</i>
	Negativo: Siembra+ incubación+ Reactivos A y B. → Revelación de nitritos en el medio (Sin variación).

Fuente: Guevara & Huertas, 2016.

Crioconservación de cepas resistentes al Arsénico como candidatas en procesos de biorremediación

Se crioconservaron las tres cepas que reportaron resistencia de crecimiento en agar enriquecido con las concentraciones de arsénico estudiadas. (*Bacillus pasteurii*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus sphaericus*), las cuales se introdujeron en el banco de cepas del laboratorio de biotecnología y nanotecnología del Tecnoparque Sena nodo Bogotá.

Aunque a veces los compuestos derivados del ácido phtalamídico (Dicarboximida) no se aplica directamente al suelo, es el eventual sumidero de una manera u otra. La posibilidad de que este fungicida pueda tener un efecto adverso sobre la microflora del suelo podría ser de considerable importancia debido a que ellos tienen una gran influencia en el crecimiento de las plantas (Martínez *et. al* 1997). En esta investigación se evidenció la capacidad resistente de algunos géneros bacterianos presentes en suelos contaminados con éste metal.

CONCLUSIONES

Se logró determinar la bioacumulación de Arsénico en una concentración de 19,0 miligramos por kilogramo de suelo. Dicha cantidad se debe tener en cuenta pues representa una alerta para el crecimiento de las plantas cultivadas. Es importante esta determinación para mejorar las prácticas agrícolas que causan la acumulación de este metal en el suelo.

La carga bacteriana del suelo en los distintos puntos de muestreo es de 3,33 UFC x10¹¹/ g de suelo en el punto A, UFC incontables en el punto B, y 3,62 UFC x10¹¹/ g de suelo, en el punto C. De acuerdo con esto se puede determinar que el punto B en las profundidades 1 y 2 presenta mayor carga bacteriana, y con esto mayor viabilidad.

El 46% de los géneros identificados pertenecen al grupo de las Proteobacterias causante de importantes enfermedades para el ser humano, por este motivo fueron descartadas para los procesos de biorremediación.

El 54% de los géneros aislados pertenecen a bacterias consideradas benéficas para los ecosistemas, donde se resalta el género *Pseudomonas* spp. y las

especies *B. sphaericus* y *B. pasteurii*, que demuestran resistencia in vitro al Arsénico y por ende se consideran como candidatas para procesos de biorremediación de suelos contaminados con dicho metal.

La presente investigación es un estudio preliminar, es por ello que, las cepas consideradas resistentes fueron crioconservadas en condiciones puras y genéticamente estables, para posteriormente realizar su respectiva formulación y pruebas de eficiencia en campo.

Dichas pruebas deben ser realizadas en el mismo tipo de suelo, puesto que, al cambiar propiedades fisicoquímicas, clima y humedad, el comportamiento del As puede ser diferente, lo mismo que el tipo de bacterias.

RECOMENDACIONES

La contaminación provoca, por lo general, una perturbación del suelo la cual se traduce en una pérdida de calidad y aptitud para cualquier tipo de uso agrícola. La protección del suelo es de interés en todo el mundo, en Colombia la inexistencia de un marco normativo sobre el tema es precario.

Es importante poner en conocimiento del agricultor el uso de fungicidas como el Captan, el cual puede por una parte afectar sus cultivos, también por el efecto que causa a la biota del suelo debido a la residualidad y bioacumulación de estos productos.

Se recomienda dar continuidad a la presente investigación, debido a que la información brindada anteriormente, es fundamental para llevar a campo soluciones que permitan mejorar los procesos agrícolas de la actualidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de forma muy especial a María Ángela Pinzón Pinto nuestra directora, por su dedicación y guía constante; a Ahudrey Leal Quintero líder de investigación del Tecnoparque SENA Nodo Bogotá, por el apoyo y los conocimientos impartidos.

REFERENCIAS

BELTRAN, M., GOMEZ, A., 2016. Biorremediación de metales pesados cadmio (cd), cromo (cr) y mercurio

- (hg) mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. Universidad Militar Nueva Granada.
- CANIZARES R. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev Lat Microb*, 42:131-143.
- MACFADDIN, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
- MARTINEZ, V., SALMERÓN, B., RODELAS, C., POZO, J., GONZÁLEZ-LÓPEZ. 1997. Effects of the fungicide captan on some functional groups of soils microflora. *Applied Soil Ecology* 7. España. Pp 245-255. Disponible en: <http://hera.ugr.es/doi/1499608X.pdf>.
- NESSNER V, ESPOSITO E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soil polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*, 28:61-89. Legislación sobre metales pesados en suelos, lodos y sustratos. On line. Disponible en: http://www.kudam.com/documentos/SUELOS_METALES_PESADOS.pdf.
- PINZÓN A. 2012. Edafología. Ed. Cargrafics. Bogotá. 199 pag. Bogotá, Colombia
- STANIER, R., INGRAHAM, J., WHEELIS, M., PAINTER, P., 1996. Microbiología: Segunda Edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. Pag. 545-546.
- WAUCHOPE, R.D. 1983. "Uptake, translocation and phytotoxicity of arsenic in plants". pp 348-374. In: *Arsenic: Industrial, Biomedical, Environmental Perspectives* (Lederer y Fensterheim (ed.)). Arsenic Symposium, Gaithersburg, Maryland. Van Nostrand Reinhold Company. New York, N.Y.
- WOOLSON, E.A. 1972. "Effects of fertiliser materials and combinations on the phytotoxicity, availability and content of arsenic in corn". *J. Sci. Fd. Agric.* 23: 1477-81.
- WOOLSON, E.A. 1973a. "Arsenic phytotoxicity and uptake in six vegetable crops". *Weeds Sci.* 21: 524-7.