

REMEDIACIÓN EFICIENTE: IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS RESISTENTES A METALES PESADOS

Dayub Sofia

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL-CONICET).

Director: Manzo, Ricardo Martín

Codirectora: Lovato, María Eugenia.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Medio Ambiente, Estrategias biorremediación, suelos

INTRODUCCIÓN

En nuestros tiempos modernos, la creciente industrialización ha agravado la problemática de la contaminación ambiental, impulsando la búsqueda de soluciones innovadoras para contrarrestar sus efectos negativos. Entre los principales contaminantes se encuentran los metales pesados, como el plomo (Pb), cromo (Cr) y arsénico (As), los cuales representan una seria amenaza para el medio ambiente debido a sus efectos nocivos a largo plazo en suelos, agua y ecosistemas. Lamentablemente, son escasas las tecnologías aplicadas para la remoción eficiente de los metales pesados. Por esta razón, es crucial explorar nuevas alternativas en el campo de la biorremediación, aprovechando el potencial de los microorganismos para enfrentar este desafío ambiental. Las actinobacterias emergen como un grupo de bacterias que desempeñan un papel ecológico fundamental al ser capaces de metabolizar compuestos orgánicos complejos y lidiar con la remoción de contaminantes como los metales pesados (Álvarez et al., 2017), lo que las convierte en candidatas prometedoras para la biorremediación de suelos contaminados.

El objetivo de la presente investigación fue aislar microorganismos, en particular actinobacterias, a partir de un lodo derivado del tratamiento de lixiviados en la planta de higiene urbana de la ciudad de Santa Fe. Nuestro enfoque se centró inicialmente en la caracterización fisicoquímica de dicho lodo para entender su composición y los metales pesados de relevancia.

TÍTULO DEL PROYECTO: "Evaluación de estrategias biológicas de remediación para el tratamiento y disposición de contaminantes persistentes presentes en lodos activados del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe"

INSTRUMENTO: Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica PICT-2020-SERIEA-I-GRF Nro. 00780

AÑO DE CONVOCATORIA: 2020

Director: Ricardo M. Manzo

A continuación, nos enfocaremos en la obtención de actinobacterias resistentes al Cr, Pb y As, con el propósito de diseñar estrategias efectivas de biorremediación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente el lodo de lixiviados.
- Realizar estudios microbiológicos sobre dicho sistema.
- Aislar microorganismos del lodo de lixiviados
- Seleccionar aquellos microorganismos resistentes a metales pesados de interés.

METODOLOGÍA

Caracterización fisicoquímica

Para determinar la composición fisicoquímica del lodo, se llevaron adelante diversas técnicas analíticas para obtener los siguientes parámetros de interés: Nitrógeno total Kjeldahl, carbono total, inorgánico y orgánico, DBO y DQO, pH, conductividad eléctrica, textura por el método de Bouyoucos, cationes de interés por espectrofotometría de absorción atómica de llama, aniones de interés por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de conductividad y concentración de ácidos húmicos y fúlvicos (Baird RB, et al, 2017).

Recuento de Microorganismos

Para determinar la diversidad microbiológica del lodo, se procedió a realizar un recuento de microorganismos, pesando 10 gr del lodo de lixiviados y diluidos en 90 ml de agua de peptona, utilizando medios específicos para bacterias totales, hongos y actinobacterias. Los medios seleccionados para este fin fueron: Plate Count agar (PCA), medio extracto de malta (MEA), International *Streptomyces* Project-2 Medium (ISP-2), empleando la técnica de diluciones sucesivas en tubos, conteniendo agua de peptona como diluyente.

Aislamiento de Actinobacterias

Para el aislamiento de actinobacterias, se realizó un ensayo que involucró la selección y el diseño de 9 medios de cultivo diferentes. Los medios de cultivo que se analizaron fueron: medio ácidos húmicos-vitaminas (HVA), ácidos húmicos sin vitaminas (HVAS), agar avena (AA), agar caseína almidón (ACA), agar extracto de levadura (EL), Czapeck (CZP), International *Streptomyces* Project-2 Medium (ISP-2), medio tryptone soya (TSB) y medio



extracto de malta (MEA). Excepto por el TSB, a los medios de cultivos se les agregó los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico, cicloheximida y kanamicina. Se realizó una siembra en superficie, utilizando 0,1 ml de muestra, y se cultivó por 10 días a 25 °C. (Pelaz Guerra, G. 2014). Pasados los 10 días, se seleccionaron colonias de interés por sus características macroscópicas, aislando a cada una por separado en sus medios de cultivo correspondientes.

Ensayo microbiológico de tolerancia a metales pesados

Se realizaron 3 ensayos independientes donde se utilizó cada metal: cromo (Cr) como Cr⁺⁶ utilizando K₂Cr₂O₇, plomo (Pb) como Pb⁺² usando Pb(NO₃)₂ y arsénico (As) como As⁺⁵ utilizando AsO₄K₃ por separado. Se cultivó a las cepas aisladas en los medios de cultivos correspondientes añadiendo una cantidad específica de las soluciones de cada metal para lograr una concentración final de 5mM en cada placa. Se incubaron las placas a 25°C y se realizó el seguimiento del diámetro de las colonias a los 14 días como parámetro de crecimiento (Polti, et al. 2006). Después, se realizó un análisis estadístico del porcentaje de crecimiento de cada cepa en comparación con su control. Se consideraron positivos aquellos valores que superaron el cuartil 2 de cada prueba.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De la caracterización fisicoquímica (Tabla 1), se observó que en el lodo el carbono orgánico es principalmente debido al ácido húmico lo que corresponde su textura franco limosa; presenta una alta conductividad, relacionada a la elevada concentración de aniones presentes en el mismo, los cuales provendrían de las sales utilizadas para el tratamiento del lixiviado. Por último presenta elevadas concentraciones de los metales pesados Cr, Pb y As.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del lodo de lixiviados

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
pH ^a	5,55	SO ₄ ²⁻ ^b (mg/kg)	8230
Conductividad ^a (mS/cm)	2,37	Ácidos Húmicos (mg/L)	274350
TOC ^b (mg/L)	1094	Ácidos Fúlvicos (mg/L)	34505
IC ^b (mg/L)	50,4	DQO ^b (mg/L)	5337
TC ^b (mg/L)	1145	DBO ^b (mg/L)	314
NTK (g N/g)	2,661	Textura	franco-limosa



Cl ^{-b} (mg/kg)	5201	Cr (mg/kg) ^c	102.60
NO ₃ ^{-b} (mg/kg)	261	Pb (mg/kg) ^c	51,21
PO ₄ ^{-b} (mg/kg)	469	As (mg/kg) ^c	7,17

Determinados a partir de: a Solución 20 % m/v; b Solución 2% m/v. C: Abrile, 2023

Del recuento inicial se obtuvo una cantidad de en 1×10^5 UFC/ml en PCA, una cantidad de $1,4 \times 10^6$ UFC/ml en MEA y en 4×10^7 UFC/ml ISP-2.

De la prueba de medios de cultivos, los que mejor se adaptan a los requerimientos nutricionales de los microorganismos son el medio CZP, ya que su alto contenido de azúcares es adecuada para lograr el crecimiento de microorganismos adaptados a bajas actividades acuosas, el medio HVAS, por último el medio ACA. Se lograron aislar un total de 42 cepas del lodo con características macroscópicas y microscópicas distintas.

De los ensayos con metales pesados pudieron obtenerse 9 cepas resistentes a Cr, 10 resistentes a Pb y 9 resistentes a As. Se pudo determinar que 4 cepas son resistentes tanto para Pb como Cr y 6 son resistentes para As y Pb. Sólo una cepa mostró ser resistente a los tres metales.

Cabe resaltar que la mayoría de los microorganismos que probaron ser resistentes, provienen del medio HVAS, el cual presenta características similares al lodo, esto indicaría que los microorganismos lograron desarrollarse en la matriz del lodo generando tolerancia a los metales pesados que presenta.

BIBLIOGRAFÍA

Abrile, M. Aplicación de una Tecnología Sustentable para la Biopurificación y Aprovechamiento de Nutrientes de Efluentes de Alto Impacto Ambiental. 2023

Alvarez, A, Saez, JM, Davila Costa, JS, Colin, VL, Fuentes, MS, Cuozzo, SA, Benimeli, CS, Polti, MA, Amoroso, MJ. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. 2017.

Baird RB, Eaton AD, Rice EW (eds.). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd. Water Environment Federation, APHA, American Water Works Association. 2017.

Pelaz Guerra, G. Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost. 2014

Polti, MA, Amoroso, MJ, Abate, CM. Chromium(VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. 2006

