

## BACTERIAS RIZOSFÉRICAS CON POTENCIALIDADES FISIOLÓGICAS PARA ELIMINAR MATERIA ORGÁNICA DE AGUAS RESIDUALES

Irina SALGADO-BERNAL<sup>1\*</sup>, Carmen DURÁN-DOMÍNGUEZ<sup>2</sup>, Mario CRUZ-ARIAS<sup>1</sup>,  
María Elena CARBALLO-VALDÉS<sup>1</sup> y Armando MARTÍNEZ-SARDIÑAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Biología. Departamento de Microbiología y Virología, Universidad de La Habana. Calle 25 No. 455 entre J e I, Vedado. Código Postal 10400. Ciudad de La Habana, Cuba. irina@fbio.uh.cu

<sup>2</sup> Facultad de Química. Conjunto E. Universidad Nacional Autónoma de México. Paseo de la Investigación Científica, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán. 04510 México D.F.

(Recibido junio 2010, aceptado octubre 2011)

Palabras clave: bacterias rizosféricas, materia orgánica efluente, tratamiento de aguas

### RESUMEN

La contaminación de las aguas constituye actualmente un grave problema ambiental y dentro de los contaminantes de interés se encuentra la materia orgánica efluente (MOEf), que está compuesta por elementos complejos y heterogéneos, entre ellos carbohidratos, proteínas y ácidos grasos. Debido a las ventajas que ofrece la utilización de agentes biológicos para la eliminación de estos contaminantes, en el trabajo se caracterizan las potencialidades de 58 cepas bacterianas, obtenidas de la rizosfera de plantas hidrófitas de *Typha dominguensis*, para la remoción de materia orgánica, con el fin de ser utilizadas posteriormente como herramientas en el tratamiento de aguas residuales. Se realizaron ensayos de asimilación de cinco carbohidratos, incluyendo monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; ensayos de hidrólisis de dos proteínas e hidrólisis de un compuesto lipídico. Con 13 cepas seleccionadas se determinó la remoción de DQO de un agua residual sintética compleja, de forma individual y en consorcios bacterianos. Veintiún cepas (36 % de las cepas aisladas) mostraron respuestas satisfactorias para asimilar diferentes fuentes de carbono e hidrolizar proteínas y lípidos. De ellas 13 aislados seleccionados mostraron niveles de remoción de DQO por encima de 50 % frente a un efluente complejo en un tiempo de sólo 72 horas, resultado que se comportó de manera semejante al emplear consorcios conformados por estas cepas. Los resultados permiten concluir que las cepas estudiadas podrían ser utilizadas potencialmente para su posterior incorporación en un sistema de tratamiento de aguas y contribuir a la remediación de efluentes.

Key words: rhizospheric bacteria, effluent organic matter, water treatment

### ABSTRACT

The contamination of waters constitutes a serious environmental problem at the moment and within the interest polluting agents is effluent organic matter (EfOM), composed by complex and heterogenous elements, among them carbohydrates, proteins and fatty acids. Due to advantages that offers the use of biological agents for the elimination of these pollutants, in present work we characterized the potentialities of 58 bacterial strains, obtained from rhizosphere of hydrophytes (*Typha dominguensis*), for the

removal of organic matter, with the purpose of being used later like tools in residual water treatment. Assimilation tests were performed with five carbohydrates, including monosaccharides, disaccharides and polysaccharides, hydrolysis tests for two proteins and hydrolysis of a lipidic compound. COD reduction was determined with 13 selected strains of a complex synthetic wastewater, individually and with bacterial consortia. 21 strains (36 % of isolates) showed satisfactory results to assimilate different carbon sources and hydrolyze proteins and lipids. Of these, 13 selected isolates showed COD removal levels above 50 % from a complex effluent in 72 hours, this result behaved similarly with the use of consortia formed by these strains. The results show that the studied strains could potentially be used for subsequent incorporation into a water treatment system and contribute to the remediation of effluents.

---

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de las aguas constituye actualmente un grave problema ambiental en el contexto global como consecuencia de la industrialización, globalización, crecimiento poblacional y urbanización (UN-Water 2006), además debido a que los residuales son vertidos directamente a los ecosistemas acuáticos sin tratar o con tratamientos deficientes. Las aguas residuales municipales están compuestas de materia orgánica, nutrientes (fundamentalmente nitrógeno y fósforo), cantidades traza de compuestos orgánicos recalcitrantes y metales (Bitton 2005). Dentro de estos contaminantes reviste gran interés la eliminación de la materia orgánica efluente (MOEf), que está compuesta por elementos complejos y heterogéneos. Entre ellos se encuentran carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, entre otros (Jarusutthirak *et al.* 2002). Es una combinación de la materia orgánica natural (MON), productos microbianos solubles (PMS) y sustancias químicas perjudiciales (Shon y Vigneswaran 2006). Las sustancias orgánicas encontradas en un agua doméstica típica consisten en 40-60 % proteínas, 25-50 % carbohidratos y 10-30 % lípidos (Cammarota y Freire 2006, Xia *et al.* 2007).

Los tratamientos fisicoquímicos permiten la remoción parcial de la carga orgánica, pero el costo de los reactivos que se utilizan es alto y la remoción de la demanda química de oxígeno es pobre, por tanto, es deseable el empleo de otros procesos como los biológicos (Vidal *et al.* 2000). Actualmente se ha puesto gran énfasis en la biotecnología ambiental y el desarrollo sostenible, en particular las técnicas biológicas pueden ser eficazmente aplicadas en la remediación de aguas contaminadas por contaminantes orgánicos (Wolfe *et al.* 1996, Gentry *et al.*, 2004). La estrategia de las tecnologías de biorremediación es el uso de diferentes vías metabólicas y el incremento de los procesos de degradación autóctonos para eliminar o al menos reducir las

sustancias contaminantes indeseables. Debido a que casi todos los productos naturales y gran número de compuestos sintéticos son degradados por las bacterias, independientemente de su peso molecular o complejidad estructural, estos microorganismos se han convertido en un factor clave en la biorremediación (Wagner y Loy, 2002, Fabiano *et al.* 2003, Bitton 2005) y desempeñan un papel importante en los sistemas como las plantas de tratamiento de aguas (Llagas y Gómez 2006).

El material orgánico biodegradable es oxidado bioquímicamente por bacterias heterotróficas bajo condiciones aerobias, resultando en la producción de dióxido de carbono, agua, amonio y nueva biomasa (Madigan *et al.* 2003). Además de asimilar estos compuestos directamente, las bacterias pueden actuar sobre ellos hidrolizándolos, como paso previo a su incorporación. La hidrólisis microbiana es un proceso a través del cual las macromoléculas son hidrolizadas a oligómeros y monómeros por la actividad microbiana antes de ser posteriormente degradadas, como por ejemplo aminoácidos, péptidos, monosacáridos y largas cadenas de ácidos grasos. La hidrólisis microbiana, por tanto, es el paso esencial en la degradación de la materia orgánica en las plantas de tratamiento de aguas (Dueholm *et al.* 2001, Morgenroth *et al.* 2002). Esta hidrólisis es realizada por exoenzimas excretadas por microorganismos hidrolizantes (Gessesse *et al.* 2003). Las enzimas hidrolíticas son primeramente encontradas asociadas con las superficies celulares, donde la hidrólisis y la liberación de las macromoléculas degradadas parcialmente son repetidas hasta que los fragmentos hidrolíticos son suficientemente pequeños como para ser asimilados por los microorganismos (Shon y Vigneswaran 2006).

Para la selección de microorganismos que puedan potencialmente influir sobre la disminución de la materia orgánica de los efluentes es importante estudiar la capacidad asimilativa de diferentes car-

bohidratos (Shon y Vigneswaran 2006), incluyendo monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, la capacidad para producir proteasas (organismos hidrolizantes de proteínas) (Xia *et al.* 2007) y la producción de lipasas (Gupta *et al.* 2004). Además estudiar las potencialidades para la disminución de la DQO a partir de agua residual contaminada, ya sea en forma individual o en consorcios microbianos.

Los microorganismos rizosféricos, en particular, tienen una importante contribución en la degradación y remoción de contaminantes (Chaudhry *et al.* 2005); han sido reportadas numerosas bacterias aisladas de la rizosfera de plantas por sus capacidades degradativas (Atterby *et al.* 2002). Esto sugiere que la introducción de este grupo de microorganismos, con características fisiológicas para la degradación de varios contaminantes podrían incrementar la remediación en un sistema de tratamiento determinado (Tabacchioni *et al.* 2002).

Teniendo en cuenta estos antecedentes en este trabajo se caracterizan las potencialidades de 58 cepas bacterianas rizosféricas para la remoción de materia orgánica, con el fin de ser utilizadas posteriormente como herramientas en el tratamiento de aguas residuales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de bacterias rizosféricas

Se aislaron bacterias provenientes de la rizosfera de plantas hidrófitas de la especie *Typha domingensis*. Estas plantas se seleccionaron de tres humedales naturales cercanos entre sí, pertenecientes a la cuenca hidrográfica Almendares-Vento, Ciudad de La Habana, Cuba, con la siguiente ubicación: Humedal 1- Lat. 23° 02.323' Long. 82° 24.002', Humedal 2- Lat. 23° 02.863' Long. 82° 23.443', Humedal 3- Lat. 23° 03.318' Long. 82° 24.014'.

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 30 minutos. Se dejaron sedimentar las partículas de suelo y con la suspensión se prepararon diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Se hicieron 3 réplicas en placa de cada dilución en agar nutriente y se incubó a 30 °C (temperatura del lugar de muestreo) por 48 horas. Se seleccionaron las colonias con características visibles diferentes de cada muestra y se conservaron en agar nutriente, plano inclinado, a 4 °C. Los aislados fueron caracterizados teniendo en cuenta su morfología y respuesta fisiológica a la tinción de Gram, usando

el método diferencial de tinción de Gram (Prescott 2002) y la observación en el microscopio óptico (objetivo 100).

### Asimilación de materia orgánica

Las cepas se sembraron por estría y por duplicado en un medio sólido para evaluar la asimilación de carbono ("Carbon Assimilation Medium-CAM") (Atlas y Parks 1993). Los carbohidratos utilizados fueron los monosacáridos glucosa, manosa y xilosa, el disacárido lactosa y el polisacárido almidón. Para la selección de estos compuestos se tuvo en cuenta que el porcentaje de monosacáridos en MOEf sigue el siguiente orden: glucosa > manosa > xilosa (Shon y Vigneswaran 2006) y que la lactosa y el almidón son compuestos encontrados con frecuencia en los efluentes.

La composición del CAM (por litro) fue: solución de agar 500 mL, medio mineral basal 500 mL; pH  $6.5 \pm 0.1$ , 25 °C. Medio Mineral Basal (composición por 500 mL): Carbohidrato 10 g, NaCl 5 g,  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g. La solución de agar se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121 °C y el medio mineral basal se esterilizó por filtración.

Los inóculos de partida fueron cultivos en caldo nutriente (CN) de 24 horas de crecimiento. La lectura se realizó mediante la observación o no de crecimiento en presencia de cada carbohidrato.

### Producción de proteasas

Se evaluó la capacidad para la hidrólisis de dos proteínas: caseína y gelatina, teniendo en cuenta las pruebas reportadas por Vidal *et al.* (2002) y Xia *et al.* (2007) para evaluar la actividad proteolítica.

#### Hidrólisis de la caseína

La capacidad para hidrolizar la caseína se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Prescott (2002). Para ello las cepas bacterianas se sembraron en un medio con caseína que constó de dos fracciones: 1. TSA (20 g en 250 mL de agua destilada), 2. Leche descremada (10 g en 250 mL de agua destilada).

Cada fracción se esterilizó por separado. La solución de caseína se esterilizó a 115 °C durante 30 minutos. Luego se dejaron enfriar hasta 45 °C, se mezcló y se repartió el medio en cajas de Petri.

Las cepas se sembraron mediante una estría central gruesa y se incubaron durante 5 días a 30 °C. La lectura de la prueba se realizó observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, cuando la bacteria es capaz de hidrolizar la caseína.

### *Hidrólisis de la gelatina*

La hidrólisis de la gelatina se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Prescott (2002). El medio utilizado fue agar nutritivo con 0.4 % de gelatina; pH 7.2. Se esterilizó en autoclave 20 minutos a 115 °C. Las cepas se inocularon realizando una estría en el medio de cultivo y se incubó a la temperatura óptima de 2 a 14 días.

El revelado de la prueba se realizó con una solución de cloruro mercúrico: cloruro de mercurio 15 g, ácido clorhídrico concentrado 20 mL, agua destilada 100 mL. Las placas se inundaron con 8 a 10 mL del reactivo. La gelatina no hidrolizada formó con el reactivo un precipitado blanco opaco y la gelatina hidrolizada apareció como una zona clara, alrededor de la estría.

### **Producción de lipasas**

Se evaluó utilizando un compuesto de Tween, ya que las lipasas son generalmente producidas en carbono lipídico como aceites, ácidos grasos, glicerol o Tweens (Gupta *et al.* 2004).

### *Hidrólisis del Tween 80*

Se empleó el medio Agar - Tween (Prescott 2002): peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, cloruro de calcio 0.1 g, agua destilada 1L, Tween 80 (mono-oleato de polietilén sorbitan, éster del ácido oléico) 10 mL, agar 15 g, pH final 7.0-7.4.

Las placas se inocularon sembrando con una estría y se incubó a temperatura óptima durante 1 a 7 días. Cuando el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween 80 aparece en el medio de cultivo un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano debido a la combinación del Ca<sup>2+</sup> y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. Cuando la bacteria no presenta la capacidad para hidrolizar el Tween no se observa precipitado.

### **Remoción de DQO de agua residual sintética**

Estos ensayos se realizaron con 13 cepas seleccionadas (TAN221, TAN229, TAN118, TAN119, TAN316, TAN1111, TAN1113, TAN1115, TAN219, TAN117, TAN216, TAN3110, TAN217) y con los siguientes consorcios: G+ (TAN117, TAN119, TAN316, TAN229), G- (TAN1111, TAN118), C1S (TAN117, TAN1111, TAN118, TAN229) y C12S (TAN117, TAN1111, TAN118, TAN229, TAN119, TAN316).

### *Composición de agua residual*

Se preparó agua residual sintética compleja con una demanda química de oxígeno, DQO, de 500 mg/L, contenido de nitrógeno, N, de 30 mg/L y un contenido de fósforo, P, de 6 mg/L, para lograr el agua residual de tipo sanitario de contaminación

promedio, según la literatura (Metcalf and Eddy 1991). Ver **cuadro I**.

**CUADRO I.** COMPOSICIÓN DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA COMPLEJA

Compuesto	Concentración (mg/L)
Peptona	250
Sacarosa	60
Almidón	140
Lípidos (Aceite de Soya)	50
Sulfato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	30
Fosfato de sodio tribásico (Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O)	6

### *Enfrentamiento de cepas al agua residual sintética*

Se realizó el crecimiento bacteriano, de las cepas individuales, en medio de cultivo CN a 30 °C, 100 r min<sup>-1</sup>, por 24 horas, se filtró la cantidad de cultivo deseada para el enfrentamiento con equipo Millipore (0.2 µm), se lavó el filtro y se inoculó en el agua residual sintética compleja a un pH 7, temperatura de 30 °C y 72 horas de contacto. En el caso del ensayo con las cepas individuales se inocularon en cada filtro de manera independiente y para el ensayo de consorcios se inocularon las diferentes cepas correspondientes sobre el mismo filtro. En todos los casos la inoculación fue de 1 % (V/V) de cada cultivo bacteriano en el agua residual sintética.

### *Determinación de DQO*

Antes de realizar el ensayo se centrifugó el agua residual con biomasa a 10000 r min<sup>-1</sup> durante 10 minutos, para separar la biomasa del sobrenadante y se filtró cada solución con un equipo Millipore.

La DQO se determinó por el método colorimétrico de reflujo cerrado (APHA-AWWA-WPCF 1992).

### *Análisis estadísticos*

Se utilizó el paquete estadístico Statistic 6.1; para comprobar la normalidad y la homogeneidad de la varianza de las muestras se realizaron las pruebas de Kolmogorov- Smirnov y Bartlett, respectivamente. Luego se realizó ANOVA de clasificación simple; las medias se compararon utilizando la prueba de Student Newman Keuls paramétrica (SNK) (p = 0.05).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Aislamiento de bacterias rizosféricas**

Se obtuvieron 58 aislados bacterianos pro-

venientes de la rizosfera de las plantas de *Typha domingensis*. De ellos el 74 % mostró morfología bacilar, el 14 % morfología cocobacilar y el 12 % cocoide. Además, el 66 % presentó respuesta positiva a la tinción de Gram y el 34 % respuesta negativa a la prueba. Los resultados muestran que la composición de las bacterias encontradas en cuanto a morfología y respuesta a la tinción de Gram es variada, lo cual extiende las posibilidades de encontrar bacterias con diferentes características fisiológicas, bioquímicas y metabólicas. Estos resultados coinciden con lo esperado, teniendo en cuenta que en la rizosfera se encuentra mayor densidad de población y variedad de microorganismos que en el resto del suelo, debido a la liberación de grandes cantidades de materia orgánica en forma de exudados, lisados y mucílagos por parte de las raíces (Dakora y Phillips 2002).

En diferentes artículos se ha reportado mayor representación de bacterias G<sup>-</sup> que G<sup>+</sup>, así como mayor representación de bacterias con morfología bacilar en los aislamientos realizados a partir de la rizosfera de plantas (Halda 2003, Halda 2004, Hallberg y Johnson 2005). Estos datos coinciden con los resultados mostrados en cuanto a la prevalencia de morfología bacilar en los aislados obtenidos, lo que podría ser explicado por la gran influencia de bacterias (ya sea G<sup>+</sup> ó G<sup>-</sup>) con este tipo de morfología, la cual presentan una gran variedad de géneros bacterianos, en las interacciones que se establecen entre la planta y los microorganismos en la zona rizosférica. No obstante se encontró diferencia en la distribución de la respuesta a la tinción de Gram, lo cual puede ser consecuencia de que la composición de la comunidad microbiana rizosférica está primariamente determinada por las especies de plantas junto con los factores ambientales (Muratova *et al.* 2003) presentes en el suelo, por lo que en todos los estudios de aislamientos no se obtendrán obligatoriamente iguales resultados.

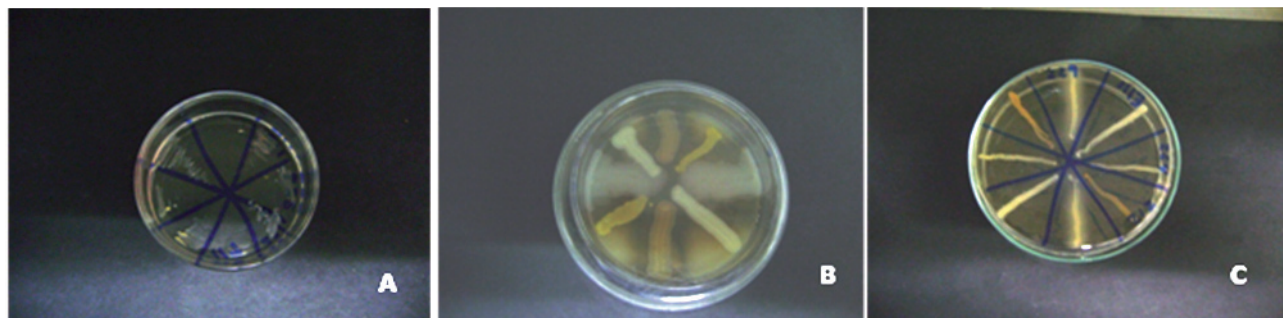
### Asimilación de carbohidratos por las cepas rizosféricas

El porcentaje de cepas con capacidad para asimilar los diferentes carbohidratos estudiados varió en dependencia del compuesto en cuestión. El 95 % de las cepas creció en presencia de glucosa como fuente de carbono, el 64 % en manosa, el 62 % en xilosa, el 64 % en lactosa y el 81 % en almidón. En la **figura 1** se observa cómo se detectó el crecimiento.

El mayor porcentaje obtenido con la glucosa puede ser debido a que este monosacárido es una fuente de carbono utilizada por un amplio número de bacterias, por presentar enzimas constitutivas para su utilización, a diferencia de lo que ocurre para otros carbohidratos, cuando sólo en presencia de estos se induce en la célula la síntesis de las enzimas involucradas en su catabolismo (Madigan *et al.* 2003).

Los porcentajes obtenidos, en todos los casos, estuvieron por encima de 50, lo cual indica que gran parte de las cepas estudiadas presentaron versatilidad en la utilización de fuentes de carbono para su crecimiento y por tanto para la eliminación de estos compuestos del medio en que se encuentren presentes. Esta observación es aún más notable teniendo en cuenta la variedad de carbohidratos estudiados, monosacáridos (glucosa, manosa y xilosa), disacáridos (lactosa) y polisacáridos (almidón). Los carbohidratos constituyen aproximadamente el 40 % de la composición orgánica del agua residual (Jarusutthirak *et al.* 2002), por lo que es importante la obtención de cepas con capacidad variada para la utilización de estos compuestos.

A partir de un análisis combinado de los resultados del comportamiento de cada cepa frente a los cinco carbohidratos estudiados se obtuvo que el 41 % de las cepas mostró asimilación de los cinco carbohidratos estudiados y el 76 % asimiló al menos tres de los carbohidratos ensayados. Este último valor corrobora que de las 58 cepas la



**Fig. 1.** Muestra de la variedad de acciones de los aislados sobre los compuestos estudiados: (A) Asimilación de carbohidratos, se observa crecimiento en caso de asimilación del compuesto; (B) Hidrólisis de caseína, aparición de halo transparente alrededor del crecimiento en caso de hidrólisis; (C) Hidrólisis de lípidos, precipitado alrededor del crecimiento bacteriano en caso de hidrólisis

mayoría presentó capacidad para la utilización de diferentes compuestos como fuente de carbono, lo que coincide con algunos reportes realizados de bacterias rizosféricas aisladas de diferentes especies vegetales (Muratova *et al.* 2003), pero es un resultado que destaca entre los trabajos de este tipo realizados, pues las cepas obtenidas presentan gran variedad de respuestas.

Los resultados 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 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 70 fuentes contaminantes de diferentes tipos vierten sus aguas residuales a este río, por lo que se estima la existencia de altos niveles de contaminación (Lima *et al.* 2005). Estos niveles de contaminación pueden haber influido en que las bacterias desarrolladas en esa zona presenten características para adaptarse a la utilización de una amplia gama de carbohidratos y que a su vez presenten potencialidades para la utilización de sus capacidades degradadoras en la biorremediación. En el caso de estudios con microorganismos rizosféricos los factores como la planta específica a partir del cual son obtenidos y los factores ambientales existentes en el sitio de aislamiento, a largo plazo, son los que promueven la eficiencia de aplicación futura de un microorganismo en la remediación (El Fantroussi y Agathos 2005).

Además, los resultados se encuentran relacionados también con la diversidad encontrada en la caracterización morfológica y en la respuesta fisiológica a la tinción diferencial de Gram, la diversidad de características encontradas puede ser reflejo de la variedad de géneros y especies que pueden estar presentes, lo cual podría influir en los diferentes comportamientos frente a los compuestos ensayados.

#### **Actividad multienzimática (producción de proteasas y lipasas) por las cepas rizosféricas**

Gran número de los aislados bacterianos estudiados hidrolizaron los diferentes compuestos ensayados: 47 % hidrolizó la caseína, 36 % hidrolizó la gelatina y el 38 % hidrolizó el Tween 80. En la **figura 1** se observan los resultados positivos debido a que no todas las bacterias presentan la capacidad para hidrolizar proteínas y lípidos, por lo que las bacterias que lo realizan resultan atractivas para

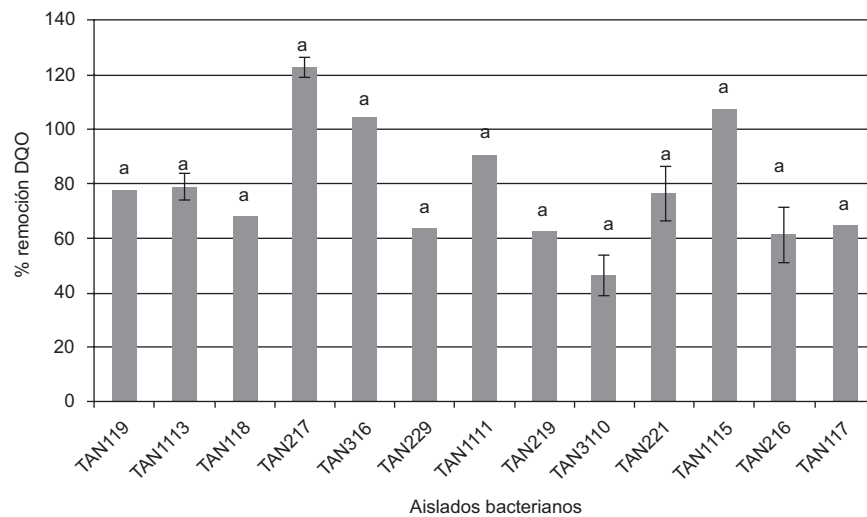
su utilización en el posible tratamiento de estos compuestos, que en ocasiones resultan, difíciles de eliminar de las aguas. Además, ya que las proteínas constituyen el 50 % de la composición del agua residual típica y las grasas y aceites el 10 % (Jarusutthirak *et al.* 2002), se hace más importante aún contar con microorganismos que eliminen estos contaminantes.

El **cuadro II** muestra el análisis realizado con respecto a la actividad multienzimática presentada por las cepas, utilizando como indicadores la capacidad de hidrólisis de más de un compuesto. Los porcentajes obtenidos no son altos numéricamente, pero teniendo en cuenta que estas actividades enzimáticas no son encontradas en todos los microorganismos constituyen resultados interesantes para la selección de cepas con capacidades biorremediantes.

**CUADRO II. ACTIVIDAD MULTIENZIMÁTICA DE LAS 58 CEPAS BACTERIANAS**

Párametros	% cepas
Caseína + Gelatina	17
Caseína + Tween 80	24
Gelatina + Tween 80	16
Caseína + Gelatina + Tween 80	9

De los 58 aislados estudiados los que presentaron mejores resultados en las pruebas realizadas fueron TAN221 y TAN229, pues ambos fueron los únicos que presentaron asimilación de los cinco carbohidratos ensayados y actividad multienzimática frente a caseína, gelatina y Tween 80. Además de estos dos, otros también podrían ser utilizados como agentes biorremediantes: TAN118, TAN119, TAN316, TAN317, TAN1111, TAN1113, TAN1115, TAN127, TAN214, TAN219, TAN315, que presentaron asimilación de los cinco carbohidratos e hidrólisis de dos compuestos; TAN117 y TAN216, que presentaron asimilación de al menos tres o cuatro carbohidratos y tres enzimas y TAN116, TAN3110, TAN321, TAN213, TAN215, TAN217, que presentaron asimilación de tres o cuatro carbohidratos y dos enzimas. De estas 21 cepas, se seleccionaron 13 (TAN221, TAN229, TAN118, TAN119, TAN316, TAN1111, TAN1113, TAN1115, TAN219, TAN117, TAN216, TAN3110, TAN217) para ser estudiadas con respecto al enfrentamiento directo al agua residual sintética, teniendo en cuenta que además de presentar características fisiológicas para eliminar materia orgánica también mostraron respuestas positivas frente a otros experimentos relacionados con la contaminación, realizados en otros estudios.



**Fig. 2.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) de la remoción de DQO del agua residual sintética por aislados independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre muestras.)

### Remoción de DQO de agua residual sintética por aislados bacterianos independientes

En la **figura 2** se observan los resultados del enfrentamiento de los aislados, de manera independiente, al agua residual sintética. Los 13 aislados bacterianos mostraron remoción de DQO, observándose que no existió diferencia significativa desde el punto de vista estadístico entre los porcentajes de remoción. Hay que destacar que el 92.31 % de las cepas presentaron niveles de remoción por encima del 50 %, lo cual es un resultado importante teniendo en cuenta que se empleó agua residual con características de agua residual media, por lo que la DQO inicial fue elevada. La cepa que mayor remoción presentó fue TAN 217 con 122.81 %.

Existen reportes de gran número de bacterias que pueden realizar la remoción de materia orgánica de un agua contaminada, debido a que muchas de ellas emplean como fuente de carbono y energía para su crecimiento a estos compuestos. Los resultados de este trabajo resaltan teniendo en cuenta que se trabajó con un agua compleja que presentó como fuente de materia orgánica una variedad de compuestos que no pueden ser todos utilizados por todas las bacterias y aún así se observó una acción positiva en la disminución de la DQO en el efluente tratado. Teniendo en cuenta los valores de remoción, las 13 cepas podrían potencialmente ser empleadas como agentes para la eliminación de materia orgánica de residuales domésticos complejos, de forma rápida, teniendo en cuenta que la interacción de las biomasas bacterianas con el agua residual fue de 72 horas.

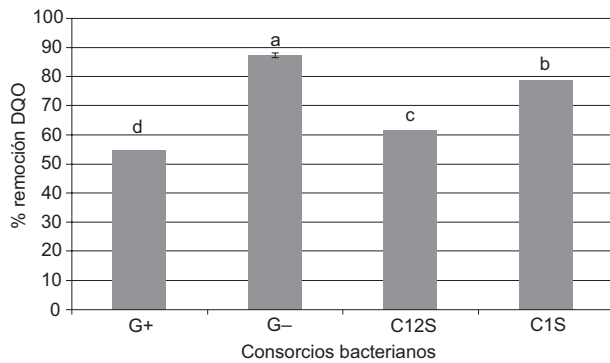
Los resultados obtenidos son algunos similares y

otros superiores, de manera general, a los niveles de remoción de DQO que se encuentran reportados en la literatura, ya sea empleando microorganismos para la remoción u otro tipo de sistemas de tratamiento. Por ejemplo, Pessoa *et al.* (2008) obtuvieron 75 % de remoción de DQO a través de humedales artificiales, en 10 días de tratamiento, Palacios (2006) 90 % de remoción con un tratamiento de tipo convencional, Bolaños *et al.* (2008) reportaron remociones de aproximadamente 85 %, Castro *et al.* (2008) reportaron niveles entre 62.4 y 89.8 % empleando cepas bacterianas diversas y Moreno *et al.* (2010) informaron la remoción de 85 % con cianobacterias y un consorcio microbiano.

A pesar de las similitudes hay que acentuar que en el caso de este experimento la interacción de las biomasas con el agua residual fue un tiempo más corto que el de la mayoría de los trabajos que se encuentran reportados, por lo que estos aislados autóctonos además de llevar a cabo la remoción de materia orgánica, pueden realizar el proceso en un tiempo relativamente corto. Estas características tan favorables pueden justificarse teniendo en cuenta la procedencia de las cepas, las cuales se obtuvieron, como se mencionó anteriormente, de sitios contaminados, lo que puede predisponer la presencia de potencialidades metabólicas diversas e incrementadas en ellas.

### Remoción de DQO de agua residual sintética por consorcios bacterianos

Los resultados de los porcentajes de remoción de los cuatro consorcios conformados se muestran en la **figura 3**. Como se observa el porcentaje de remoción



**Fig. 3.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) de la remoción de DQO del agua residual sintética por los consorcios bacterianos conformados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre muestras.)

más elevado lo mostró el consorcio de bacterias G-, con diferencias significativas con el resto de las muestras. El orden de remoción de los consorcios fue: G- > C1S > C12S > G+. Este resultado demostró que el número de cepas que conforma el consorcio no determina la mayor efectividad, pues el consorcio G-, que fue el que mejor remoción presentó, es el que incluye menor cantidad de cepas en su conformación, con sólo dos representantes. El mayor o menor nivel de remoción depende en primera instancia de las características de cada especie bacteriana y de las potencialidades para realizar el proceso en cuestión; además de las interacciones que sean capaces de establecer las cepas, que conformen el consorcio, entre sí y su interacción con los factores abióticos en el medio (Carballo *et al.* 2003).

Cuando se realiza un análisis de la remoción de cada consorcio y las cepas individuales por las que cada consorcio está conformado (**Cuadro III**), se observa que los consorcios en algunas ocasiones resultan más efectivos que cada cepa de manera individual, pero no en todos los casos. No hay un resultado homogéneo en cuanto a este aspecto, lo que sugiere que un mejor resultado depende de la interacción específica de cada una de las cepas que conforme el consorcio, la que a veces favorece más a un microorganismo que a otros. Existen cepas bacterianas que de manera individual, como se observó, pueden efectuar la remoción de los contaminantes con altos niveles de eficiencia. Hay que destacar que en todos los resultados siempre se observaron diferencias significativas comparando el consorcio con las cepas individuales, ya sea en los casos en que la cepa de manera individual removió más materia orgánica o que el consorcio presentó la mayor eliminación. Este es un indicador de que existe gran variación (significativa) cuando se trabaja con una

**CUADRO III.** COMPARACIÓN DE REMOCIÓN DE CONSORCIOS CON LAS CEPAS INDEPENDIENTES QUE CONFORMAN CADA CONSORCIO

Muestra	% remoción	Diferencias significativas*
G+	54.39	e
TAN117	64.73	c
TAN119	77.61	b
TAN316	103.81	a
TAN229	63.81	d
G-	87.27	b
TAN1111	90.96	a
TAN118	68.25	c
C1S	78.52	b
TAN117	64.73	d
TAN1111	90.96	a
TAN118	68.2	c
TAN229	63.81	e
C12S	61.49	g
TAN117	64.73	e
TAN1111	90.96	b
TAN118	68.25	d
TAN229	63.81	f
TAN119	77.61	c
TAN316	103.81	a

\* Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre muestras

cepa individual y cuando se une la acción de más de una cepa.

Los resultados reportados con respecto a las diferencias entre la remoción de consorcios y cepas simples no aparecen siempre de la misma manera. Existen estudios que son bastante coincidentes con el presente trabajo, en los que no se observan diferencias significativas entre los consorcios y las cepas individuales. Sin embargo, otros plantean que la unión de los microorganismos permite que los grupos bacterianos puedan combinar y complementar sus funciones metabólicas para llevar a cabo un proceso específico, por lo que obtienen mejor remoción con un consorcio (Castro *et al.* 2008).

Aunque la degradación de los contaminantes en la naturaleza es a menudo el resultado de la actividad de un consorcio microbiano más que de un simple microorganismo, el potencial degradador de un consorcio depende de las potencialidades que presenten los microorganismos de manera individual en su interacción con determinados contaminantes (Muratova *et al.* 2003), por esta razón contar con aislados autóctonos con capacidad para eliminar materia orgánica es una vía para su utilización



futura. Un método usado para la biorremediación es el bioaumentación de un área o de un sistema de tratamiento determinado, que consiste en la adición de nutrientes y microorganismos al sitio contaminado (Adebowale 2004), alternativa en la que los aislados obtenidos podrían constituir herramientas provechosas.

## CONCLUSIONES

El aislamiento de bacterias rizosféricas de plantas hidrófitas de *Typha dominguensis*, seleccionadas de humedales naturales, permite contar con 58 aislados bacterianos autóctonos con gran versatilidad en su interacción con materia orgánica contaminante de aguas como carbohidratos, proteínas y lípidos. Entre estos destacan 13 cepas que pudieran ser empleadas de manera independiente o en consorcios bacterianos para la disminución de DQO de agua residuales domésticas, mediante su incorporación en sistemas de tratamiento de aguas; resultados que tributan a la suma de esfuerzos que se realiza actualmente en la búsqueda de tecnologías más limpias para el tratamiento de aguas, así como a la conservación de este recurso. Por supuesto, estas cepas postulan como candidatos potenciales siempre que se garantice su no patogenicidad sobre los organismos vivos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por International Foundation for Science, Estocolmo, Suecia, a través de la beca W/4860-1 otorgada a la M. en C. Irina Salgado Bernal. Se agradece la colaboración de la especialista en botánica Ramona Oviedo, del Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Cuba, por su contribución en la metodología de selección de plantas hidrófitas y al personal de los laboratorios 301 al 303, de la Facultad de Química, Conjunto En de la UNAM, por las facilidades para la realización de parte del trabajo experimental.

## REFERENCIAS

- Adebowale A. (2004). Bioremediation of arsenic, chromium, lead and mercury. U.S. Environmental Protection Agency. Office of solid waste and emergency response. Technology Innovation Office. Washington, EUA. [en línea]. [http://clu.in.org/download/studentpapers/bio\\_of\\_metals\\_paper.pdf](http://clu.in.org/download/studentpapers/bio_of_metals_paper.pdf) 11/10/2011.
- APHA-AWWA-WPCF (1992). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. 17a ed. Ediciones Díaz de Santos, Madrid. España. 1816 pp.
- Atlas R.M y Parks L.C. (1993), Handbook of microbiological media. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Atterby H., Smith N., Chaudhry Q. y Stead D. (2002). Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments. Pesticide Outlook. February, 9-13.
- Bitton G. (2005) Wastewater Microbiology. 3a ed. Wiley. New York.
- Bolaños S.V., Casas J.C. y Aguirre N.J. (2008). Análisis comparativo de la remoción de un sustrato orgánico. Gestión y Ambiente 11, 39-48.
- Cammarota M.C. y Freire D.M. (2006). A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. Bioresour. Technol. 97, 2195-2210.
- Carballo M.E., Piñón A., Martínez A., Martínez J., Díaz C. y Jiménez R. (2003). Tamizaje de cepas bacterianas para la remoción de metales pesados (cobre y cadmio). Revista Contribución a la educación y la protección ambiental Vol. 4. (CD).
- Castro F.L., Fernández N.M. y Chávez M. J. (2008). Diminution of the COD in formation waters using bacterial stocks. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. 31, 256-265.
- Chaudhry Q., Blom-Zandstra M., Gupta S. y Joner E.J. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. 12, 34-48.
- Dakora F.D. y Phillips D.A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant Soil. 245, 35-47.
- Dueholm T.E., Andreasen K.H. y Nielsen P.H. (2001). Transformation of lipids in activated sludge. Water Sci. Technol. 43, 165-172.
- El Fantroussi S. y Agathos S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. Curr. Opin. Microbiol. 8, 268-275.
- Fabiano M., Marrale D. y Mistic C. (2003). Bacteria and organic matter dynamics during a bioremediation treatment of organic-rich harbour sediments. Mar. Pollut. Bull. 46, 1164-1173.
- Gentry T.J., Rensing C. y Pepper I.L. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 34, 447-494.
- Gessesse A., Dueholm T., Petersen S.B., Nielsen P.H. (2003). Lipase and protease extraction from activated sludge. Water Res. 37, 3652-3657.
- Gupta R., Gupta N. y Rath P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 763-781.

- Halda L. (2003). Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Can. J. Microbiol.* 49, 781-787.
- Halda L. (2004). Incidence of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumonia* and *Enterobacter* species in freshwater wetlands. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 445-450.
- Hallberg K.B. y Johnson D.B. (2005). Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *Sci. Total Environ.* 338, 53-66.
- Jarusutthirak C., Amyb G. y Croué J.P. (2002). Fouling characteristics of wastewater effluent organic matter (EfOM) isolates on NF and UF membranes. *Desalination.* 145, 247-255.
- Lima L., Olivares S., Columbie I., De la Rosa D. y Gil R. (2005). Niveles de plomo, zinc, cadmio y cobre en el Río Almendares, Ciudad Habana, Cuba. *Rev.Int. Contam.Ambie.* 21, 115-124.
- Llagas W.A. y Gómez E.G. (2006). Diseño de humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales en la UNMSM. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG.* 15, 85-96.
- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos.* 10a ed. Prentice Hall. New Jersey. 1011pp.
- Metcalf and Eddy, 1991. *Wastewater Engineering. Treatment, disposal, reuse, third ed.* Mc Graw-Hill International Editions.
- Moreno M., Naranjo B. y Koch A. (2010). Evaluación de dos métodos para la reducción de nitrógeno, fósforo y dco de aguas residuales, mediante un cultivo axénico de cianobacterias y un consorcio microbiano, inmovilizados y en suspensión. *Rev. Ciencia.* 13, 55-61.
- Morgenroth E., Kommedal R. y Harremoes P. (2002). Processes and modeling of hydrolysis of particulate organic matter in aerobic wastewater treatment – a review. *Water Sci. Technol.* 45, 25-40.
- Muratova A., Hübner Th., Tischer S., Turkovskaya O., Möder M. y Kusch P. (2003). Plant – Rhizosphere – Microflora association during phytoremediation of PAH – contaminated soil. *Int. J. Phytoremediat.* 5, 137-151.
- Palacios C. (2006). Tratamiento de aguas residuales domésticas en la estación científica Pedro Vicente Maldonado, Antártida- Verano Austral 2003- 2004. *Revista Tecnológica ESPOL.* 19, 185-190.
- Pessoa A. K., Tauk S. M., Naves R. y De Franceschi D. (2008). Performance of the constructed wetland system for the treatment of water from the Corumbataí river. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51, 1279-1286.
- Prescott H. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology.* Fifth ed. The McGraw-Hill Companies, 466 p.
- Shon H.K. y Vigneswaran S. (2006). Effluent Organic Matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 36, 327-374.
- Tabacchioni S., Bevivino A., Dalmastrì C. y Chiarini L. (2002). *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. *Ann. Microbiol.* 52, 103-117.
- UN-Water (United Nations World Water Assessment Programme) (2006). *United Nations World Water Development Report: Water, a Shared Responsibility.* World Water Development Report Editors.
- Vidal G., Carvalho A., Mendez R. y Lema J. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technol.* 74, 231-239.
- Wagner M. y Loy A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218-227.
- Wolfé D.A., Krahn M.M., Casillas E., Sol S., Thompson T.A., Lunz J. y Scott K.J. (1996). Toxicity of intertidal and subtidal sediments contaminated by the Exxon Valdez spill. *Proceedings Symposium Exxon Valdez Oil Spill,* 121-139 pp.
- Xia Y., Kong Y. y Nielsen P.H. (2007). In situ detection of protein-hydrolysing microorganisms in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 156-165.