

Comportamiento cualitativo de *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales, expuestas a mercurio

Qualitative behavior of *Pseudomonas* isolated from wastewater, exposed to mercury

Francisco Paternina-Mercado¹
Jessica Bedoya-Vélez²
Susana Ochoa-Agudelo³

¹Corporación Hospital San Juan de Dios Uniremington (Colombia).
Correo electrónico: franciscopaternina93@hotmail.com
orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0548-4318>

²Universidad de Antioquia (Colombia). Correo electrónico: jessica.bedoyav@udea.edu.co
orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3303-1842>

³Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (Colombia).
Correo electrónico: susana.ochoa@colmayor.edu.co
orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5369-7137>

Recibido: 16-12-2021 Aceptado: 13-05-2022

Cómo citar: Paternina-Mercado, Francisco; Bedoya-Vélez, Jessica; Ochoa-Agudelo, Susana (2022). Comportamiento cualitativo de *Pseudomonas* aisladas de aguas residuales, expuestas a mercurio. *Informador Técnico*, 86(2), 205-219 .
<https://doi.org/10.23850/22565035.4353>

Resumen

El mercurio es uno de los metales utilizados en la actividad minera, que magnifica su distribución y exposición tóxica, cuando se dispone como residuo en suelo y agua. El uso de microorganismos para remover metales en medios acuosos proporciona oportunidades para explorar su impacto. El objetivo de esta investigación es explorar la capacidad de tolerar mercurio, de aislamientos del género *Pseudomonas* spp., recuperadas de aguas residuales. Las aguas de la Ciénega de Ayapel (Córdoba) y del río Cauca, Cauca (Antioquia), fueron tomadas y analizadas microbiológicamente: siembra en agar Cetrimide e identificación bioquímica por Vitek (bioMérieux). Los aislamientos de *Pseudomonas* spp. se sembraron en medio BHI en concentraciones de sulfato de mercurio, por técnica de tubo (hasta 500 mg/L) y microplaca (hasta 75 mg/L), para identificar la tolerancia al metal. Como resultado se obtuvieron seis aislamientos de *Pseudomonas* spp. con capacidad para crecer, en concentraciones de 75 a 400 mg/L de sulfato de mercurio, que mostraron viabilidad, precipitación, pigmento y fluorescencia en el medio, como mecanismos de protección frente a la exposición al metal. En conclusión, se determinó que los aislamientos nativos de *Pseudomonas* con capacidad de tolerar diferentes concentraciones de mercurio podrían ser utilizados en procesos que acompañen la remoción de este metal, profundizando en el mecanismo de interacción, para que en futuras aplicaciones sea usado en lixiviados obtenidos de la actividad minera, antes de ser dispuestos en el río. Especies de *Pseudomonas* han sido mencionadas en diversos experimentos implicados en la remoción de mercurio y compuestos derivados.

Palabras clave: biorremediación ambiental; metales pesados; contaminantes del agua; microbiología del agua; microorganismos; *Pseudomonas*, mercurio, aguas residuales.

Abstract

Mercury is one of the metals used in mining, and when it is disposed of in the soil or water, its distribution and toxic exposure are magnified. The use of microorganisms to remove metals in water provides some opportunities to explore their impact. The objective of this research is to explore the ability to tolerate mercury, of isolates of *Pseudomonas* spp. gender, recovered from sewage. Water from the Ciénega de Ayapel (Córdoba) and the Cauca River, in Cauca (Antioquia), were taken and analyzed microbiologically: spread on the Cetrimide agar and biochemical identification by Vitek (bioMérieux). The *Pseudomonas* spp. isolates were exposed to mercuric sulfate concentrations supplementing BHI medium, using the tube technique (up to 500 mg/L) and microplate (up to 75 mg/L), to identify the tolerance to the metal. As a result, we obtained six *Pseudomonas* spp. isolates with the capacity to grow in concentrations between 75 and 400 mg/L of mercuric sulfate, showing viability, precipitation, pigmentation, and fluorescence in the medium as protection mechanisms against the metal. *Pseudomonas* species have been mentioned in several experiments related to the removal of mercury and derived compounds. In conclusion, it was determined that native isolates of *Pseudomonas* with the ability to tolerate different concentrations of mercury could be used in processes that accompany the removal of this metal, going deeper into the interaction mechanism with the metal so that it is applied in future leachates obtained from mining before being disposed of in the river.

Keywords: environmental bioremediation; heavy metals; water pollutants; water microbiology; microorganisms; *Pseudomonas*; mercury; sewage water.

1. Introducción

A nivel mundial, son múltiples las fuentes de contaminación que llegan a diferentes cuerpos de agua, tanto de tipo orgánica como inorgánica. Sin embargo, algunas de estas fuentes son consideradas de alto riesgo, debido a sus repercusiones y/o persistencia, y por la dificultad de su tratamiento (Beltrán-Pineda; Gómez-Rodríguez, 2016). Uno de estos contaminantes, que se puede encontrar como desecho inorgánico, y que llega a suelos y fuentes hídricas como material de residuo, es el mercurio, uno de los metales pesados no esenciales más contaminantes, que hoy es considerado con especial atención, desde las fuentes que lo generan hasta los ecosistemas que lo contienen y que de cierta manera propagan su persistencia dentro de la cadena trófica, poniendo en riesgo la salud humana, animal y ambiental (Briffa *et al.*, 2020). A nivel mundial se registran tasas de contaminación por este metal, derivadas de actividades con origen antropogénico, que, sin lugar a duda deterioran la vida de comunidades enteras (Londoño-Franco *et al.*, 2016).

Los principales países que registran altas tasas de contaminación por mercurio son Japón y Uruguay, principalmente en peces, y se reportan países como Tailandia y Japón, con altas tasas del metal en el ambiente (Global Mercury Hotspots, 2014). En Colombia, la principal causa de la contaminación por mercurio en suelos y cuerpos de agua radica en el uso intensivo de este metal en la extracción de oro, principalmente mediante minería artesanal e informal, entre otros (Gafner-Rojas, 2018; Martínez; Casallas, 2018; González, 2015). El último estudio realizado por la Organización de las Naciones Unidas, "Evaluación Mundial del Mercurio 2018", reporta el aumento de este contaminante en el medio ambiente (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2019). Esta contaminación trae consigo grandes daños a los recursos naturales, animales y a seres humanos e importantes problemas en salud pública.

El mercurio (Hg) se puede encontrar en el agua, el aire, los suelos e incluso alimentos. Sin embargo, una de las principales preocupaciones es su presencia en los cuerpos de agua, ya que puede cambiar de forma por metabolismo microbiano y convertirse en metilmercurio (CH_3Hg), siendo más tóxico y capaz de bioacumularse y biomagnificarse fácilmente en la cadena alimenticia humana, principalmente en el consumo de peces (Rosero; Rentería, 2019), y con esto, se favorece el incremento de casos de intoxicación, y se genera un gran riesgo para la

salud de la población aledaña a zonas contaminadas, con repercusiones en la salud, que afectan principalmente el sistema nervioso, que es el más sensible durante su frecuente exposición (Campo, 2017).

La exposición a altos niveles de mercurio metálico, inorgánico u orgánico puede dañar el cerebro y los riñones en forma permanente. También afecta el desarrollo del feto, incluso meses después de la exposición de la madre. Los principales síntomas que suelen presentarse son daño a los pulmones, náuseas, vómito, diarrea, aumento de la presión sanguínea o del pulso cardíaco, reacciones alérgicas en la piel e irritación de los ojos, temblores, cambios en la visión, audición y problemas de memoria (Rosero; Rentería, 2019). En Colombia, según datos del SIVIGILA, entre los años 2007-2017 se notificaron 2762 casos de intoxicación por mercurio. Antioquia presentó el mayor porcentaje de casos de intoxicación en el sistema, con un 30,8 % (852 casos) del total de casos reportados por el departamento (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015).

Para la mitigación del impacto causado por el uso de este metal en el ambiente, y minimizar los efectos que genera en la salud, se han empleado técnicas con principio fisicoquímico, tales como oxidación química, absorción por vapor o electrocinética, o a partir del principio térmico. Se podría utilizar la incineración o la pirólisis (Martínez; Casallas, 2018) para controlar su uso, la explotación o inclusive su magnificación, pero estas metodologías son costosas, o inclusive podrían llegar a generar un mayor impacto negativo que la misma contaminación inicial.

Por otro lado, se vienen alternando o complementando dichas actividades con metodologías de origen biológico, que prometen ser estrategias naturales con menor impacto ambiental, con buen rendimiento y de bajo costo por su alto impacto en la remoción de los contaminantes (Martínez; Casallas, 2018; Rosero; Rentería, 2019; Bourdineaud *et al.*, 2020; Torres *et al.*, 2019). Estas tecnologías, basadas en la biorremediación de suelos o aguas, se pueden fundamentar en la eliminación o neutralización de contaminantes tóxicos de los ecosistemas mediante el uso de microorganismos, o alguno de sus productos tales como enzimas o exopolisacáridos (Rosero; Rentería, 2019). Esta estrategia biológica depende de las propiedades catabólicas o mecanismos de acción del microorganismo o sus componentes, ya sea porque utilicen el contaminante para su crecimiento, parte de su desarrollo o puedan acumularlo para liberarlo o simplemente retenerlo (Li *et al.*, 2021; Marrero-Coto *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2016).

En la actualidad, los nichos ecológicos con ciertas características adversas, donde está presente el metal, condición particularmente importante para este caso, son de suma importancia para el estudio e identificación de los microorganismos con capacidad de sobrevivir en dichos ambientes, y de esta manera identificar cómo sobreviven, por lo que adquieren importancia los mecanismos de tolerancia y resistencia, donde este último es caracterizado por la presencia de genes específicos que confieren dicha capacidad, y para el caso de la resistencia al mercurio, el mecanismo de resistencia más ampliamente documentado se basa en la presencia de un grupo de genes organizados en un único operón, denominado “operón mer”, que permite la detoxificación enzimática del metal. La estructura del operón mer varía entre las distintas especies bacterianas, donde se encuentran dos tipos de operones: de espectro reducido (confieren resistencia al mercurio inorgánico) y de espectro amplio (confieren resistencia al mercurio inorgánico y orgánico) (Bourdineaud *et al.*, 2020; Marrero-Coto *et al.*, 2010; Rani *et al.*, 2021).

Por otro lado, existen más reportes que incluyen la precipitación de este metal con fosfatos, carbonatos y/o sulfuros, la exclusión física de los componentes electronegativos en membranas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS), sistemas de eflujo de metal dependientes de energía, y el secuestro intracelular con proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína, como lo reportan Beltrán-Pineda y Gómez-Rodríguez (2016) en su estudio.

El género *Pseudomonas* spp. ha demostrado ser capaz de crecer y desarrollarse en condiciones poco favorables. Esto se debe a la capacidad que tiene para metabolizar gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, y también cuenta con diversos mecanismos que le confieren una capacidad especial de resistencia

a moléculas tóxicas, incluyendo metales pesados. Existen gran variedad de investigaciones que dan cuenta de la capacidad de tolerancia y resistencia de este género bacteriano a metales pesados, la mayoría de los aislados estudiados son procedentes de lugares que presentan contaminación con dichos elementos tóxicos (Beltrán-Pineda; Gómez-Rodríguez, 2016).

Los antecedentes anteriormente descritos permitieron que este estudio se enfocara de manera exploratoria en la identificación in vitro de aislamientos de *Pseudomonas* spp., obtenidos de aguas ribereñas cercanas a explotación minera, con potencial para tolerar mercurio. Para lograr el objetivo, los aislados se expusieron a diferentes concentraciones del metal para analizar su comportamiento y, de esta manera, proyectar otros estudios para identificar los mecanismos de resistencia y definir si estos pudieran ser utilizados como parte de la aplicación para biorremediar aguas contaminadas con mercurio.

2. Metodología

2.1. Toma de muestras de aguas residuales y análisis de laboratorio

Se tomaron muestras de aguas de dos ríos aledaños a la explotación minera en Colombia: Ciénega de Ayapel (localizada en 8°18'36.9"N 75°07'58.6"W, departamento de Córdoba) y río Cauca, Cauca (localizado en 7°58'36.4"N 75°11'17.0"W, departamento de Antioquia). Estas fueron tomadas en recipientes estériles, y se trasladaron refrigeradas antes de 24 horas, para ser procesadas en los laboratorios de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, donde se realizó el análisis microbiológico. Adicionalmente, en el laboratorio de análisis fisicoquímicos y biológicos de la Universidad de Medellín, se realizaron los análisis de parámetro fisicoquímicos: presencia de Mercurio (Método EPA 7470 A, Agencia Estadounidense de protección Ambiental, 2015), DBO5 total (Método SM-5210 B, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales [Ideam], 2017; ASTM 888-12:2021, Método C) y DQO (Método SM-5220 D; Morales-Mejía *et al.*, 2021).

Cada muestra de agua se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y, a partir del *pellet*, se realizaron diluciones decimales consecutivas hasta 10⁻⁵ por duplicado. Cada dilución se sembró por la técnica de superficie en agar Cetrimide (Merck, EE. UU.), y se incubaron a 30 +/- 2 °C durante 24 a 48 horas. Posteriormente, se verificó el crecimiento y se seleccionaron colonias con diferentes morfologías para su purificación por la técnica de agotamiento en placa (agar Cetrimide, Merck, EE. UU.). Se realizó una identificación microscópica por tinción de Gram, se realizaron pruebas bioquímicas por la técnica semiautomatizada VITEK2 (bioMérieux), proceso que se complementó con prueba de catalasa y oxidasa (Merck, EE. UU.). Los aislados se conservaron en BHI (Merck, EE. UU.) con glicerol al 30 % para su posterior uso (Bedoya *et al.*, 2019).

2.2. Bioestimulación de aislamientos de *Pseudomonas* spp. en soluciones de mercurio

Este método se realizó con el fin de hacer una selección de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. con capacidad crecer en presencia de mercurio, basado en la metodología utilizada por Jiménez (2005). Las muestras se inocularon por duplicado en caldo BHI (Merck, EE. UU.), iniciando con una suspensión de microorganismo aproximadamente de 1,5 x 10⁸ células/ml usando un patrón McFarland 0,5. Las muestras se suplementaron con 25 mg/mL de sulfato de mercurio (HgSO₄) y se incubaron a 30 +/- 2 °C durante 24 a 48 horas con agitación a 150 rpm. Se realizó lectura de la densidad celular por turbidimetría medida por espectrofotometría (espectrofotómetro Mindray Microplate Reader MR-96 A) a una longitud de onda de 600 nm, y se confirmó viabilidad celular en agar Cetrimide (Merck, EE. UU.), al final de la exposición al metal (Bedoya *et al.*, 2019).

2.3. Determinación del nivel de tolerancia al mercurio

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de bioestimulación anteriormente descrito, se seleccionaron los aislamientos bacterianos y las concentraciones de mercurio, a las cuales serían expuestos. Cada uno de los aislamientos se expuso de manera individual en medio de cultivo BHI (Merck, EE. UU.) en tubo con 10 mL de medio, iniciando con una suspensión de microorganismo aproximadamente de $1,5 \times 10^8$ células/mL, usando un patrón McFarland 0,5. Las muestras se incubaron a 30 ± 2 °C durante 24 a 48 horas. Cada medio de cultivo se suplementó con diferentes concentraciones de solución de mercurio (sulfato de mercurio), correspondientes a 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. Posterior a una incubación de 24 y 48 horas, se reportó turbidez, viabilidad celular y cambios que se evidenciaran en el medio. Este ensayo permitió de manera preliminar, identificar las concentraciones en las cuales los aislamientos de *Pseudomonas* spp. podían continuar o no con su viabilidad celular.

Adicionalmente, el ensayo anterior se complementó con una prueba en microplaca, que permitió cuantificar la biomasa por densidad óptica, y determinar capacidad de crecimiento en el medio bajo la exposición a diferentes concentraciones de sulfato de mercurio, durante un tiempo determinado. Bajo las mismas condiciones previamente descritas, se llevó a cabo el ensayo de microplaca, para las concentraciones de 25, 50 y 75 mg/mL de sulfato de mercurio, leyendo absorbancias a una longitud de onda de 600 nm, a las 24, 48 y 144 horas (Bedoya *et al.*, 2019).

2.4. 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, incluyendo la técnica semiautomatizada VITEK2 (bioMérieux), soportada en el software interno, para obtener resultados de la probabilidad y un nivel de confianza descriptivo.

Para definir el nivel de tolerancia al mercurio en los aislamientos obtenidos, el estudio se abordó en dos momentos, un primero de tipo descriptivo, a partir del ensayo de bioestimulación de los aislamientos con mercurio, por la técnica de tubo, para determinar la viabilidad de estos en concentraciones de mercurio superiores a la inicial, identificada en la matriz de aislamiento. Posteriormente, para el ensayo de microplaca, se seleccionaron 3 concentraciones de exposición al mercurio — teniendo en cuenta el desarrollo de cada microorganismo en tres tiempos, definido como un diseño experimental de variaciones completamente aleatorizado —, incluyendo el aislamiento (Ay4, Ay5, Ca1, Ca3, Ca5, Ca6), la concentración de mercurio bajo tres niveles (25, 50 y 75 mg/L), y tres tiempos (24, 48 y 144 horas), donde se midió la absorbancia (DO 600 nm) para determinar la producción de biomasa, para un total de cincuenta y cuatro tratamientos. Los datos fueron estudiados a través de un análisis de varianza de una sola vía.

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 Minitab v.16.

3. Resultados

3.1. Muestras de aguas residuales y análisis de laboratorio

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas analizadas en las muestras de agua tomadas en los ríos de Ayapel y Caucaasia.

Tabla 1. Resultados del análisis fisicoquímico para muestras de aguas residuales de Ayapel y Caucaasia

	Ayapel (Ay)	Caucaasia (Ca)	LCM
pH	7	7	
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	<5	23,82	5 mg O ₂ /L
DQO (mg O ₂ /L)	19	42,48	10 mg O ₂ /L
Hg (mcg/L)	<1	2,9	1 ug/L

Nota. DBO₅: demanda bioquímica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno; Hg: mercurio; LCM: límite de cuantificación del método.

Fuente: elaboración propia.

Ambas muestras de agua presentaron un pH neutro, lo que indica un ambiente estable. Para los datos de DBO y DQO, si bien el agua recogida en el municipio de Ayapel mostró datos dentro del límite de detección para la DBO₅, en comparación con la muestra tomada en las aguas del río de Caucaasia, fue superior, lo que evidencia mayor demanda de oxígeno por contaminación orgánica. De igual manera, para el resultado obtenido en la DQO, la mayor demanda de oxígeno por contaminantes inorgánicos la registra el agua tomada del río de Caucaasia.

Adicionalmente, se resalta que, de acuerdo con los datos obtenidos, asociados a la presencia de mercurio, donde se identifica mayor concentración en la muestra de Caucaasia, se logró inferir que aguas abajo (corriente de agua que va desde Caucaasia hasta Ayapel), el río cuenta con una carga menos tóxica del metal, esto debido a la actividad minera que se lleva a cabo en el sector. Según la Resolución 631 de 2015, establecida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, las concentraciones de mercurio permitidas en los vertimientos puntuales de aguas residuales no domésticas deben ser menores a 0,002 mg/L. Estos datos se relacionan con lo ya publicado en varios estudios, donde se reporta la presencia de mercurio en zonas aledañas a la minería, lo que indica alta contaminación ambiental y exposición al medio ambiente, con efectos nocivos (Pinzón; Fajardo, 2018; Briffa *et al.*, 2020). Estudios como el de Vera (2017) reportan concentraciones de mercurio en aguas superficiales de 0,11 mg/L.

3.2. Aislamientos de *Pseudomonas* spp. y caracterización bioquímica

Un total de seis morfotipos fueron seleccionados a partir del crecimiento obtenido. Las colonias fueron compatibles con bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positiva. Por otro lado, al ser identificados por Vitek, se registraron seis resultados consecuentes con *Pseudomonas* spp. (ver Tabla 2).

Tabla 2. Identificación bioquímica de los aislados obtenidos en aguas residuales de Ayapel (Ay4 y Ay5) y de Caucasia (Ca1, Ca3, Ca5, Ca6)

Código	Especie identificada	Probabilidad identificación	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Catalasa	Oxidasa
Ay4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98 %	Colonias planas, transparente, de borde irregular.	Bacilo Gram negativo	Positiva	Positiva
Ay5	<i>Pseudomonas spp.</i>	50 %	Colonias planas, transparentes, de borde irregular.	Bacilo Gram negativo	Positiva	Positiva
Ca1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98 %	Colonias planas, de borde irregular, traslúcidas, con pigmento amarillo, mixoide.	Bacilo Gram negativo	Positiva	Positiva
Ca3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98 %	Colonias planas, de borde definido, traslúcida, con pigmento amarillo.	Bacilo Gram negativo	Positiva	Positiva
Ca5	<i>Pseudomonas fluorescens/ Pseudomonas putida</i>	51 %/49 %	Colonias convexas traslúcida con borde transparente.	Bacilo Gram negativo	Positiva	Positiva
Ca6	<i>Pseudomonas putida</i>	98 %	Colonia pequeña traslúcida opaca de borde definido.	Bacilo Gram negativo	Positiva	Positiva

Fuente: elaboración propia.

Se obtuvieron dos aislados de Ayapel (Ay4 y Ay5) y cuatro de la muestra de Caucasia (Ca1, Ca3, Ca5 y Ca6), incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* y otras dos sin buena resolución para definir especie (Ay5 y Ca5).

Se identificó mayor cantidad de aislamientos en la muestra de Caucasia, comparada con la de Ayapel, asociados a *Pseudomonas spp.*, que es el microorganismo de interés. Esta fue la que registró contaminación biológica e inorgánica, de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos. Por otro lado, este resultado se relaciona con la presencia de mercurio en la muestra del agua de Caucasia, y permite identificar de manera predictiva, que los aislamientos obtenidos de estas aguas posiblemente tendrían mayor capacidad de tolerar mercurio, esto asociado a una preadaptación a dicha condición. Para el caso de este estudio, la presencia de mercurio marca un punto de partida para relacionar la capacidad adquirida que presente la comunidad microbiana que allí habite, afirmaciones que también han sido trabajadas y demostradas por las investigaciones realizadas por Joshi *et al.* (2021) y Crowe *et al.* (2017), al detectar microorganismos con capacidad de tolerar mercurio en los aguas y océanos. Adicionalmente, Vera (2017) reporta la biorremediación microbiana como alternativa para la remoción de mercurio.

3.3. Bioestimulación de aislados de *Pseudomonas* spp. en soluciones de mercurio

Se tuvieron en cuenta los seis aislamientos para el ensayo de bioestimulación, con el fin de determinar su capacidad de crecer en presencia de Mercurio (Figura 1). Se analizaron las absorbancias obtenidas de cada microorganismo, incluyendo el control, durante el tiempo de exposición.

En la Figura 1 se observa el comportamiento de seis de los aislamientos de *Pseudomonas* spp. para adaptarse a la concentración de mercurio de 25 mg/L de sulfato de mercurio (HgSO_4) (Ca1, Ca3, Ca5, Ca6, Ay4 y Ay5). Así mismo, se puede evidenciar que los aislamientos CA5 y CA6 presentaron mejor adaptación al medio con el metal, ya que su comportamiento fue similar al control, el cual no fue expuesto. Ambos aislamientos corresponden a *Pseudomonas putida*, obtenidos de la muestra de Caucasia.

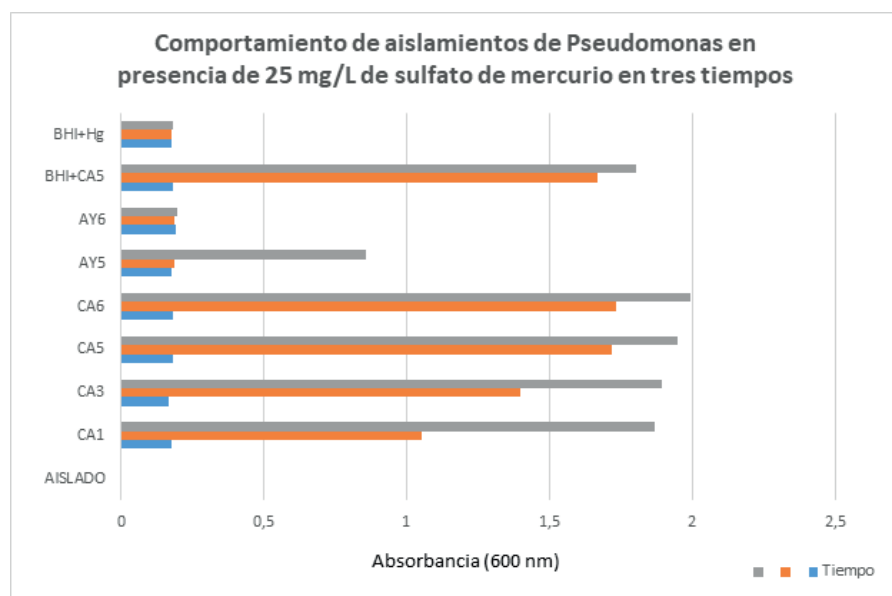


Figura 1. Comportamiento de la biomasa de aislamientos de *Pseudomonas* spp. en presencia de 25 mg/L de solución de mercurio
Fuente: elaboración propia.

3.4. Determinación del nivel de tolerancia al mercurio

Para el ensayo en tubo, con diferentes concentraciones de solución de sulfato de mercurio, correspondientes a 25, 50, 75 y 100 mg/L, en los aislados Ay5, Ay4, Ca1, Ca3, Ca5 y Ca6 se reportaron cambios cualitativos por turbidez y viabilidad celular, tanto en las 24 como en las 48 horas de incubación. Adicionalmente, se evidenció la precipitación de material como se muestra en la Figura 2A, desde la concentración de 50 mg/L en adelante, razón por la cual no se determinó la absorbancia y solo se contempló la viabilidad celular en medios selectivos. En la exposición de 500 mg/L, el aislamiento Ay5 presentó ausencia de turbidez, lo que indica la no viabilidad celular, a diferencia del resto de los aislamientos (ver Figura 2).

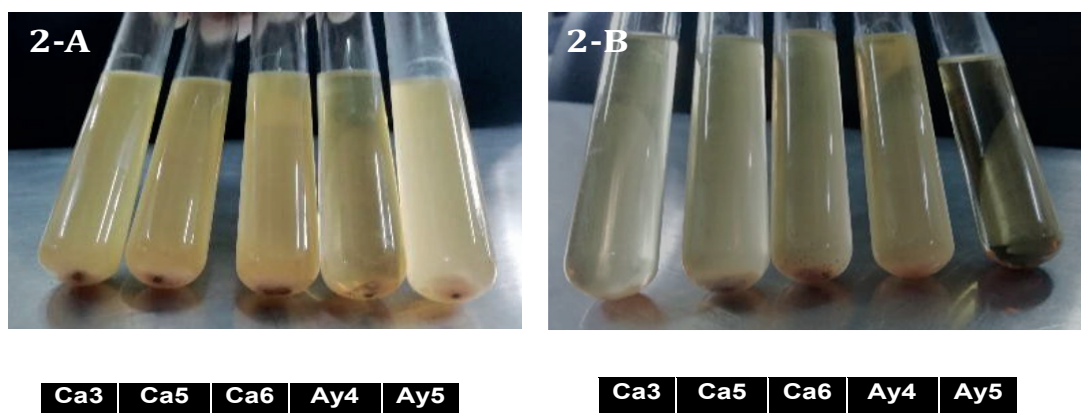


Figura 2. Prueba en tubo para determinar tolerancia a sulfato de mercurio

Nota. (A) concentración de 25 mg/mL y (B) 500 mg/mL. Se logra observar un precipitado tanto de biomasa como de partículas de color en la mayoría de los aislamientos, posterior a la exposición al metal.

Fuente: elaboración propia.

La tolerancia de estas bacterias a mercurio puede deberse al desarrollo de sistemas de resistencia, los cuales van a favorecer la supervivencia del microorganismo en un ambiente poco favorable (Dash; Das, 2012; Bourdineaud *et al.*, 2020). Uno de estos mecanismos, descrito por Marrero-Coto *et al.* (2010), es la presencia del operón mer, un gen de resistencia que codifica para una serie de enzimas. Como ya se mencionó anteriormente, existe una alta posibilidad de que estos aislamientos puedan portar este gen, ya que su capacidad para tolerar mercurio superó los 400 mg/L y para los microorganismos portadores, se reporta la capacidad de crecer en presencia de hasta 200 mg/L (Bourdineaud *et al.*, 2020).

La precipitación en los ensayos, posiblemente se relaciona con uno de los mecanismos reportados para la tolerancia microbiana a metales pesados, asociado a la capacidad mediada por el sistema de eflujo del metal, el secuestro intracelular con proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína y precipitación del metal con fosfatos, carbonatos y/o sulfuros a través del mecanismo de precipitación química extracelular (Beltrán-Pineda; Gómez-Rodríguez, 2016; Paul; Sinha, 2016). Los estudios citados recalcan la importancia de la presencia de genes de resistencia implicados en la remoción de metales pesados y la invitación a seguir evaluándolos en procesos biorremediación.

Por otro lado, y con el fin de minimizar los efectos del precipitado detectado en la prueba de tubo, se realizó el ensayo de microplaca para las concentraciones de 25, 50 y 75 mg/mL de sulfato de mercurio (concentraciones seleccionadas, que permitieron determinar biomasa celular medida por absorbancia, sin la interferencia del precipitado en la muestra), donde los aislamientos presentaron viabilidad, y se obtuvieron resultados de la absorbancia a las 24, 48 y 144 horas (ver Figura 3). En el análisis estadístico, se identificó una diferencia significativa en la producción de biomasa expuesta a diferentes concentraciones de mercurio, en las muestras tomadas en diferentes tiempos ($p < 0,05$). De esta manera, el análisis de medias permitió identificar que el aislado Ca1, fue el que más produjo biomasa durante 144 horas en una exposición a 50 mg/L de solución de mercurio, mientras que el aislado Ay5, durante las primeras 24 horas, fue el que más demoró en producir biomasa, independientemente de la concentración de mercurio a la que haya sido expuesta.

De estos resultados se podría inferir que el tiempo de exposición al metal puede influir en la capacidad para reproducirse, independientemente de la especie de *Pseudomonas* que se utilice, y que el aislamiento Ay5 exhibió menor capacidad tolerante a la exposición al metal en concentraciones superiores a 75 mg/L. Si bien en el ensayo de tubo, en la concentración de 500 mg/L de sulfato de mercurio, se inhibió su crecimiento, en el ensayo de microplaca, la exposición a 25, 50 y 75 mg/L mostró una disminución en la división celular durante las primeras 24 h.

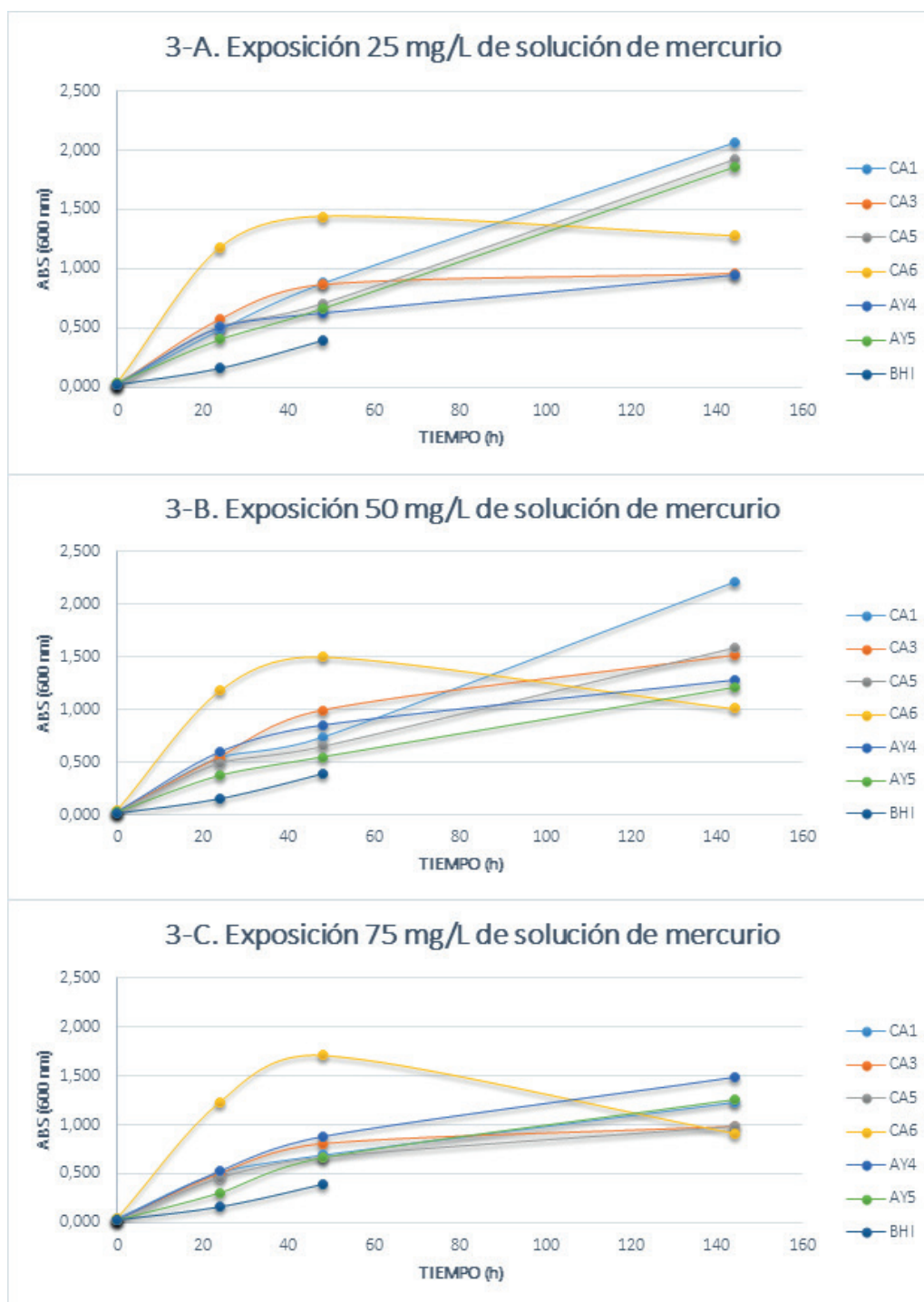


Figura 3. Comportamiento de la biomasa de aislamientos de *Pseudomonas* spp. en presencia de diferentes concentraciones de solución de mercurio, ensayo realizado en microplaca (A) 25 mg/L; (B) 50 mg/L; (C) 75 mg/L
Fuente: elaboración propia.

Adicionalmente, dentro de los rasgos fenotípicos registrados, se evidenció viabilidad celular posterior a las 144 horas de exposición de cada uno de los aislamientos y que en concentraciones 25 mg/L y 50 mg/L, los aislados Ca6 y Ay4 presentaron cambios en el fenotipo, asociados a su pigmentación y producción de fluorescencia. Solo el aislamiento Ca6 mantuvo este cambio en la exposición a concentraciones por encima de los 50mg/L de sulfato de mercurio (ver Figura 4).

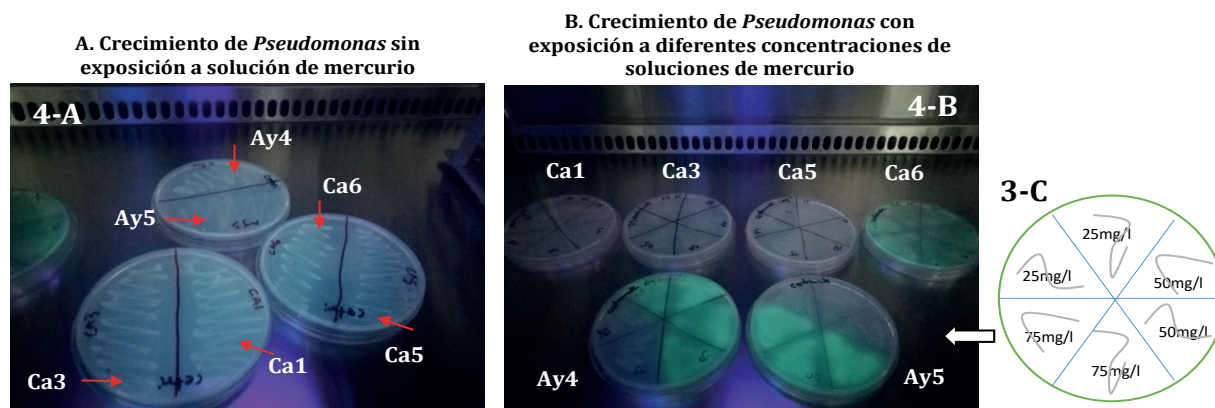


Figura 4. Muestra viabilidad de los cultivos de *Pseudomonas* spp. expuestos a diferentes concentraciones de una solución de sulfato de mercurio

Nota. 4-A. Aislamientos de *Pseudomonas* spp. sin exposición a sulfato de mercurio; 4-B. Seis aislamientos de *Pseudomonas* spp. expuestos a diferentes concentraciones sulfato de mercurio (por duplicado): 25, 50 y 75 mg/L, y la producción de fluorescencia de algunos aislados; 4-C. Distribución gráfica de la siembra de los aislados expuestos a diferentes concentraciones de sulfato de mercurio, para determinar su viabilidad y cambios fenotípicos.

Fuente: elaboración propia.

Otro de los mecanismos expuestos por los aislados, que permite inferir lo que el microorganismo expresó en su fenotipo al ser expuesto a altas concentraciones de mercurio, fue la producción de pigmento, fluorescencia y exopolisacáridos. Estas condiciones pueden estar relacionadas con la producción de metabolitos. En condiciones de estrés, microorganismos como *Pseudomonas* tienen la capacidad de modular como mecanismos de defensa (Ugurlu *et al.*, 2016). Algunos de estos han sido descritos por Chien *et al.* (2013) y Kalpana *et al.* (2018), quienes manifiestan que la producción de estos exopolisacáridos (EPS) confieren la capacidad de protección celular en ambientes hostiles, y que al secuestrar el metal en la superficie celular, retrasa el efecto tóxico del metal sobre la célula. Por otro lado, se encuentra la expresión de pigmentos para aislamientos de *Pseudomonas*, relacionados con pioverdinas, piocininas, entre otros, caracterizados como sideróforos por algunos autores (Visca *et al.*, 2007; El-Fouly *et al.*, 2014), quienes en sus estudios manifiestan que estos compuestos están directamente asociados con la capacidad de respuesta de estos microorganismos para modular algunas de sus funciones biológicas.

La producción de pioverdina se asocia a la producción de *biofilm* y producción de EPS y agregación celular, como ya se mencionó, lo que expresa condiciones de protección celular (Visca *et al.*, 2007). La piocianina se relaciona principalmente con la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno, lo que hace a este mecanismo atractivo para que este microorganismo actúe como biosensor al reaccionar como intercambiador iónico en ambientes con compuestos orgánicos (El-Fouly *et al.*, 2014).

4. Conclusiones

La identificación de especies del género *Pseudomonas*, en aguas residuales aledañas a zonas de explotación minera, denota una condición favorecida del nicho que permitió el reconocimiento de microorganismos con capacidad de sobrevivir en aguas contaminadas con mercurio. Adicionalmente, la exposición a diferentes concentraciones del metal evidenció un comportamiento de los microorganismos, asociado a que bajo condiciones de estrés,

algunos como *Pseudomonas* tienen la capacidad de modular la expresión fenotípica mediante mecanismos de defensa, especialmente asociado a la aparición de precipitados en el medio, producción de pigmentos, fluorescencia y exopolisacáridos, que en algunas especies, principalmente en *P. putida*, permitieron tolerar mayor cantidad de metal en el medio de cultivo.

De esta manera, este estudio permite identificar nichos ecológicos con alto potencial de aislar microorganismos con capacidad de tolerar altas concentraciones de mercurio. De esta manera, se propone que estos aislamientos puedan ser explorados en estudios posteriores desde su caracterización genética, hasta identificar el o los mecanismos de interacción del microorganismo con el metal, con la intención de proponer alternativas para el control del mercurio en aguas residuales o en lixiviados derivados de la actividad minera, y que antes de vertidos a las aguas, se logre minimizar la propagación de dicho contaminante y se manifieste un impacto ambiental positivo.

Agradecimientos

Agradecimientos a la Dirección de Investigación de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, al grupo de investigación BIOCENCIAS y al semillero SIFACS de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, y a todos los docentes del programa de Biotecnología que pudieron verse involucrados en el desarrollo de dicho estudio.

Referencias

- ASTM International. (2021). Standard Specification for Hubless Cast Iron Soil Pipe and Fittings for Sanitary and Storm Drain, Waste, and Vent Piping Applications (ASTM A888-21:2021). West Conshohocken, PA.
- Agencia Estadounidense de Protección Ambiental (2015). *Método EPA 7470 A. Mercury in liquid waste (Manual cold-vapor technique)*. Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-07/documents/epa-7470a.pdf>
- Bedoya, Jessica; Castaño, Gustavo; Ochoa, Susana (2019). Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 135-143. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146>
- Beltrán-Pineda, Mayra; Gómez-Rodríguez, Alida (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Bourdineaud, Jean-Paul; Durn, Goran; Režun, Bojan; Manceau, Alain; Hrenović, Jasna (2020). The chemical species of mercury accumulated by *Pseudomonas Idrijaensis*, a bacterium from a rock of the Idrija mercury mine, Slovenia. *Chemosphere*, 248, 126002. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126002>
- Briffa, Jessica; Sinagra, Emmanuel; Blundell, Renald (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>

- Campo, Alfonso (2017). 100 logros INS en 100 años de historia. *Informe Quincenal Epidemiológico Nacional*, 22(3), 49-64.
- Chien, Chih-Ching; Lin, Bo-Chou; Wu, Chun-Hsien (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>
- Crowe, William; Allsopp, Philip; Watson, Gene; Magee, Pamela; Strain, Sean; Armstrong, David; Ball, Elizabeth; McSorley, Emeir (2017). Mercury as an environmental stimulus in the development of autoimmunity - A systematic review. *Autoimmunity Reviews*, 16(1), 72-80.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.020>
- Dash, Hirak; Das, Surajit (2012). Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 207-213.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>
- El-Fouly, Mohie; Sharaf, Abdel; Shahin, Azza; El-Bialy, Heba; Omara, Ahmed (2014). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36-48.
<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.10.007>
- Gafner-Rojas, Claudia (2018). La contaminación hídrica por mercurio y su manejo en el derecho colombiano. En M. García (Ed.), *Tratado de derecho de aguas. Tomo I: derecho de aguas colombiano para el siglo XXI* (pp. 495-526). Universidad Externado de Colombia.
- Global Mercury Hotspots (2014). *The Global Fish and Community Mercury Monitoring Project*. Recuperado de https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/7435/-Global_Mercury_Hotspots-2014Global_Mercury_Hotspots_2014.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- González, Laura (2015). *Diagnóstico de la contaminación por mercurio debido a la actividad minera de oro en el Canal del Dique (departamento de Bolívar) y la Costa Caribe colombiana*. Recuperado de <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2923/2015lauragonzalez2.pdf?sequence=42>
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (2017). *Determinación de DBO por cinco días. Incubación y electrometría*. Recuperado de <http://sgi.ideam.gov.co/documents/412030/97658415/M-S-LC-I025+INSTRUCTIVO+DE+ENSAYO+DETERMINACI%C3%93N+DE+DEMANDA+BIOQU%C3%8DMICA.pdf/83b1f3aa-cfab-417b-b6d7-b576fec54e61?version=1.0>
- Jiménez, Angélica (2005). *Interacción del mercurio con los componentes de las aguas residuales*. Manizales [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.
- Joshi, Gajendra; Meena, Balakrishnan; Verma, Pankaj; Nayak, Jibanand; Vinithkumar, Nambali; Dharani, Gopal (2021). Deep-sea mercury resistant bacteria from the Central Indian Ocean: A potential candidate for mercury bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 169, 112549.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112549>

- Kalpana, Ramaraju; Angelaalincy, Maria; Viswanath, Kamatchirajan; Vasantha, Vairathevar; Ashokkumar, Balasubramaniam; Ganesh, Venkatachalam; Varalakshmi, Perumal (2018). Exopolysaccharide from *Bacillus cereus* VK1: enhancement, characterization and its potential application in heavy metal removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 327-334.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.043>
- Li, Runwei; Qi, Lin; Ibeanusi, Victor; Badisa, Veera; Brooks, Scott; Chen, Gang (2021). Reduction and bacterial adsorption of dissolved mercuric ion by indigenous bacteria at the Oak Ridge Reservation site. *Chemosphere*, 280, 130629.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130629>
- Marrero-Coto, Jeannette; Díaz-Valdivia, Arelys; Coto-Pérez, Orquídea (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 41(1), 67-78.
- Martínez, José; Casallas, Miguel (2018). *Contaminación y remediación de suelos en Colombia aplicación a la minería de oro*. Universidad EAN.
<https://doi.org/10.21158/9789587565836>
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2015). *Resolución 631. Sobre vertimientos y límites máximos permitidos en alcantarillado y aguas superficiales*. Recuperado de
<http://www.emserchia.gov.co/PDF/Resolucion631.pdf>
- Ministerio de Salud y Protección Social (2015). *Evaluación de riesgos en inocuidad de alimentos*. Recuperado de
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/concepto-consumo-pe-leon-ueria.pdf>
- Morales-Mejía, Julio; Vargas-Martínez, María; Medina, Javier (2021). Método SM-5220 D. La demanda química de oxígeno con el procedimiento APHA/AWWA/WEF 5220 D para rango alto adaptado a microescala. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 12(1), 113-132.
- Londoño-Franco, Luis; Londoño-Muñoz, Paula; Muñoz-García, Fabian (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotechnología en el sector agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- Paul, Dipak; Sinha, Sankar (2016). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river. *Annals of Agrarian Sciences*, 15(1), 130-136.
<https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.10.001>
- Pinzón, Claudia; Fajardo, Carlos (2018). Impacto del mercurio en los ecosistemas colombianos y las técnicas aplicables para su biorremediación. *Working Papers ECAPMA*, 1.
<https://doi.org/10.22490/ECAPMA.2774>
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2019). *Informe de antecedentes técnicos para la Evaluación global del mercurio, 2018. Global Mercury Partnership*. Recuperado de
<https://www.planetgold.org/es/technical-background-report-global-mercury-assessment-2018>

- Rani, Lata; Lal Srivastav, Arun; Kaushal, Jyotsna (2021). Bioremediation: an effective approach of mercury removal from the aqueous solutions. *Chemosphere*, 280, 130654.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130654>
- Rosero, Doris; Rentería, María (2019). Estudios sobre la biorremediación en Colombia. *Hechos Microbiológicos*, 10(1-2), 39-48.
<https://doi.org/10.17533/udea.hm.v10n1a05>
- Torres, María; Vitola, Deimer; Pérez, Alexander (2019). Biorremediación de mercurio y níquel por bacterias endófitas de macrófitas acuáticas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 36-44.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.79975>
- Ugurlu, Aylin; Yagci, Aysegul; Ulusoy, Seyhan; Aksu, Burak; Bosgelmez-Tinaz, Gulgun (2016). Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 698-701.
<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.008>
- Vera, Jaime (2017). *Remoción de mercurio en aguas contaminadas mediante microorganismos tolerantes, una aproximación a la biorremediación microbiana* [Tesis de pregrado]. Universidad Santo Tomás.
- Visca, Paolo; Imperi, Francesco; Lamont, Iain (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22-30.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
- Yin, Kun; Lv, Min; Wang, Qiaoning; Wu, Yixuan; Liao, Chunyang; Zhang, Weiwei; Chen, Lingxin (2016). Simultaneous bioremediation and biodetection of mercury ion through surface display of carboxylesterase E2 from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Water Research*, 103, 383-390.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.053>