

### Evaluación de la capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) y Plomo (II) mediante el uso de biomasa bacteriana muerta en soluciones acuosas

*Cadmium (II) and Lead (II) bioadsorption ability by using dead bacterial biomass in aqueous solutions*

Cinthya Elena Ballardo De la Cruz, Fernando Abilio Merino Rafael  
y Susana Mónica Gutiérrez Moreno\*

*Universidad Nacional Mayor de San Marcos*

#### RESUMEN

Nuestro país exporta anualmente grandes cantidades de productos minero-metalúrgicos, ello causa perturbación en los ecosistemas siendo afectados principalmente los recursos hídricos. Ante este problema, el proceso biotecnológico de bioadsorción representa una alternativa de remediación de ambientes naturales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de bioadsorción de Cd (II) y Pb (II) de la biomasa bacteriana muerta de la cepa silvestre *Serratia marcescens* M8A-2T. Esta cepa alcanzó valores de resistencia con CMI de hasta 16 000 mg/L y de 800 mg/L para Pb (II) y Cd (II) respectivamente, usando el método de cilindro en placa. En soluciones monometálicas, se determinó una eficiencia de bioadsorción máxima de 99.89% y 61.32% para los metales Cd (II) y Pb (II) respectivamente, a pH 9 y tiempos entre 15 y 120 minutos. Con estos resultados, es posible afirmar que la biomasa bacteriana puede ser empleada a futuro en procesos biotecnológicos de remediación de ambientes contaminados con metales pesados.

**PALABRAS CLAVE:** Bioadsorción, cadmio, plomo, biomasa muerta.

#### ABSTRACT

Annually our country exports higher quantities of metals and metallurgical products, that cause disturbance in ecosystems being mainly affected water resources. To solve this problem, biosorption process represents a promising alternative to remediate natural environments. The aim of this work was based on the evaluation of biosorption ability to Cd (II) and Pb (II) of the *Serratia marcescens* M8A-2T dead bacterial biomass. This strain reached maximum values of 16 000 mg / L and above 800 mg / L for CMI to Pb (II) and Cd (II) respectively, using plate cylinder method. Furthermore, in monometallic solutions were determined maximum biosorption efficiency of 99.89% and 61.32% for the metals Cd (II) and Pb (II) respectively at pH 9 and times of interaction between 15 and 120 minutes. These results let us conclude that the bacterial biomass can be used in remediation processes of environments contaminated by heavy metals.

**KEYWORDS:** Biosorption, Cadmium, Lead, Bacterial dead biomass.

*Recibido: 24/2/14*

*Aceptado: 5/5/15*

\* Laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana. Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

## Introducción

Los metales pesados son elementos con densidad igual o superior a  $5 \text{ g.mL}^{-1}$  y cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos térreos (Atkinson 1998). Los más importantes son: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Zinc (Zn). Los metales pesados ingresan al ambiente acuático principalmente por descargas directas de fuentes industriales, la industria minera es una de las más importantes (Gómez et al. 2004).

La contaminación del agua, aire y suelo por metales pesados es uno de los problemas ambientales más severos y complicados de resolver. Las fuentes más comunes de contaminación por dichos metales son los procesos de refinación del petróleo, las plantas generadoras de energía, los procesos metalúrgicos (Acosta et al. 2007), los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales e indirectamente por los contaminantes que entran a los suministros de agua de los suelos y de los sistemas de aguas subterráneas (Tarangini 2009). La minería es la más trascendente de ellas (Gómez et al. 2004).

Dentro de los problemas ambientales, la contaminación de los recursos hídricos es la más afectada debido a la facilidad con que se dispersan los iones de metales pesados presentes en aguas superficiales y subterráneas (Cunningham y Philp 2000). Los contaminantes pueden alcanzar concentraciones elevadas debido a su recalcitrancia y persistencia en los cuerpos de agua (Cañizares 2000) afectando la flora y la fauna y por ende la cadena trófica de un ecosistema.

A partir de la revolución industrial, la producción de metales pesados aumenta en forma exponencial. Estos se convierten en un tema actual tanto en el campo ambiental como en el de salud pública. Los daños que

causan son tan severos y en ocasiones tan ausentes de síntomas, que las autoridades ambientales y de salud pública ponen especial atención en minimizar la exposición de la población (Martín 2008).

En el hombre, los metales pesados pueden producir ulceraciones en la piel, irritaciones gastrointestinales, promover la aparición de cáncer y otras enfermedades degenerativas e inducir mutaciones genéticas, afectando así su descendencia (Mejía 2006). Por ende la contaminación por metales pesados, no sólo es de importancia económica y ambiental sino también de salud pública (Das et al. 2008).

Frente a esta situación, muchos métodos están siendo usados para remover los iones metálicos de aguas residuales, entre ellos los procesos químicos y físicos, los cuales son muy costosos y poco efectivos especialmente cuando se trata de bajas concentraciones en efluentes (Leung et al. 2001). Además de la excesiva producción de lodos, lo cual aumenta el costo por el tratamiento adicional que se les debe brindar a estos (Das et al. 2008; Ahalya et al. 2003). Durante las últimas décadas, se están desarrollando nuevas tecnologías para contrarrestar este problema. Estos procesos biotecnológicos son una buena alternativa para el tratamiento de efluentes o ambientes acuáticos contaminados con metales tóxicos, sobre todo cuando son a partir de soluciones diluidas ya que tiene el potencial para hacerlo mejor y a menos costo. Dentro de estos procesos destacan: la bioadsorción, la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados. Siendo el primero, una atractiva alternativa ya que ofrece un tratamiento a bajo costo y de alta eficiencia, además puede involucrarse en fenómenos fisicoquímicos y biológicos (Cañizares 2000).

El proceso de bioadsorción puede ser definido como la captación de metales que lleva a cabo un material biológico (vivo o muerto), a través de mecanismos fisicoquímicos

o metabólicos (Ahalya et al. 2003). Este utiliza organismos vivos como algas, levaduras, hongos y bacterias, los cuales han probado tener potencial como biosorbentes metálicos (Volesky y Holan 1995). El proceso involucra una fase sólida (sorbente, usualmente un material biológico) y una fase líquida (solvente) que contiene especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido (Alluri et al. 2007).

Por otro lado, la pared celular consiste de una variedad de polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales tienen muchos grupos de unión a metales como los grupos carboxilos, sulfatos, fosfatos y amino (Tarangini 2009). Dentro de ellos, se pueden identificar dos tipos de grupos funcionales: los débilmente reactivos como lípidos o glucanos (en los cuales los grupos hidroxilos son los reactivos) y los fuertemente reactivos como ácidos carboxílicos, aminoácidos y proteínas (Guibal et al. 1995). La bioadsorción está basada en la adsorción de los iones en la superficie de la célula. Es un proceso pasivo netamente físico-químico que puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática (Reyes et al. 2006). Presenta un equilibrio dinámico de reversibilidad de adsorción-desorción. Los iones metálicos unidos en la superficie pueden ser eluidos por otros iones, agentes quelantes o ácidos y puede ser llevado a cabo mediante biomasa viva, muerta o inmovilizada. El uso de la biomasa muerta o productos derivados de ella elimina el problema de la toxicidad, no solo de la provocada por metales disueltos, sino también por condiciones adversas de operación, además del componente económico de mantenimiento incluyendo el suplemento de nutrientes. Sin embargo, las células vivas pue-

den presentar una variedad más amplia de mecanismos para la acumulación de metales (Cañizares 2000).

Por otro lado, en nuestro país, los productos mineros metálicos constituyen el 57.13% del total de las exportaciones nacionales (Ministerio de Energía y Minas 2012), lo que significa que el Perú depende económicamente de las divisas generadas por la industria minera, por ello es necesario la búsqueda de nuevas metodologías que en conjunto con tecnologías convencionales permitan reducir el grave impacto ecológico provocada por la actividad minera. Más aun, cuando el gobierno a partir del 2013 está exigiendo que los efluentes provenientes de las industrias, se encuentren dentro de los valores máximos permisibles para metales pesados y otros (Resolución de Consejo Directivo N° 044-2012-SUNASS-CD).

Por esta razón, a través del presente trabajo, se busca evaluar la capacidad de bioadsorción de la biomasa muerta de la cepa M8A-2T frente a cadmio y plomo, así como establecer algunos parámetros que ayuden a la optimización del proceso de remoción de cadmio y plomo y puedan ser aplicables en un futuro cercano a mayor escala. A su vez, debemos recalcar que actualmente en nuestro país son muy pocas las referencias acerca de la biorremediación de efluentes contaminados con metales pesados usando biomasa muerta de microorganismos, lo que hace relevante este trabajo de investigación.

## **Materiales y métodos**

### **1. Material**

- Una cepa bacteriana silvestre con alta tolerancia a los metales Cd(II) y Pb(II) codificada como M8A-2T que pertenece al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana.

- Una cepa referencial *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Solución acuosa de metal de Cd bajo la forma de sulfato de cadmio
- Solución acuosa de metal de Pb bajo la forma de nitrato de plomo

## 2. Métodos

### 2.1 Determinación de pureza y viabilidad de la cepa de trabajo

La cepa fue aislada de una muestra de relave minero, proveniente de la Sociedad Minera Condestable (Mala, Perú) y fue mantenida en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, ha demostrado ser resistente a metales pesados como Plomo y Cadmio, ésta se reactivó en Caldo Tripticasa Soya incubándose a 25°C hasta obtener una turbidez comparable a la escala 0.5 de Mc Farland. Luego se sembró por estriado en placas con Agar Tripticasa Soya (pH 7.2 ± 0.2) las que se incubaron a 25°C por 24 horas. Seguidamente se hizo la caracterización morfológica y cultural de las colonias además de tinción Gram para confirmar la pureza de la cepa.

### 2.2 Identificación de la cepa bacteriana

La identificación presuntiva de la cepa bacteriana M8A-2T se realizó de acuerdo a las características morfológicas y culturales de las colonias, características microscópicas, así como por pruebas bioquímicas, entre ellas tenemos: la actividad de la citocromo oxidasa, reducción de nitratos y utilización de hidratos de carbono. Para la identificación confirmativa se utilizó el sistema de identificación API 20E.

### 2.3 Determinación de resistencia de la cepa a cadmio y plomo por el método de difusión en agar

Se procedió a realizar la prueba de resistencia a cadmio y plomo por el método de ci-

lindro en placa (Madigan et al. 2003) sobre agar Mueller Hinton. Para ello se preparó una suspensión de la cepa M8A-2T en 4 mL de Caldo Tripticasa Soya y se incubó a 25°C, hasta alcanzar una turbidez compatible con la escala 0.5 de Mc Farland. Luego, se realizó la siembra con hisopo en tres planos sobre el agar. A cada pocillo se agregó 20 µL de concentraciones crecientes de Cd (II) entre 50 a 800 ppm y Pb (II) entre 50 a 32, 000 ppm, empleando como control positivo, mercurio y como control negativo agua destilada. Estas placas se incubaron a 25°C por 48 horas, pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento y se comparó con los halos de la cepa control de sensibilidad *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

### 2.4 Obtención de biomasa bacteriana muerta como bioadsorbente

La cepa se reactivó en 2,5 mL de caldo Tripticasa Soya a 25°C, hasta alcanzar un crecimiento compatible con la escala 0.5 de Mc Farland. Este se inoculó en un matraz de 100 mL, conteniendo 25 mL de caldo Tripticasa Soya y se incubó a temperatura ambiente por 24 horas en agitación a 120 rpm. Luego se transvasó a un matraz de 500 mL, conteniendo 270 mL de caldo nutritivo y se incubó a temperatura ambiente por 12 horas en agitación a 120 rpm. Luego se vertió el contenido de este matraz a un fermentador de 3L con 2.7 L de caldo Tripticasa Soya, el cual tiene aireación incorporada y se incubó a temperatura ambiente por 24 horas. Las bacterias se sometieron a 121°C por 30 min para la obtención de biomasa bacteriana muerta (Vásquez 2005). El cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 25 min. El precipitado se lavó dos veces con agua destilada para quitar iones u otros residuos del medio a 5000 rpm por 25 min (Leung et al. 2001). El *pellet* final se depositó en un crisol previamente pesado y se secó en horno a una temperatura de 60°C durante 3-5 horas,

hasta que se obtuvo un peso constante. La biomasa se recuperó cuidadosamente con un pincel para pesarlo y utilizarlo posteriormente (Vásquez 2005).

### 2.5 Preparación del bioadsorbente

En cada uno de los experimentos de los procesos de bioadsorción se usó la relación 1mg de biomasa bacteriana muerta (biosorbente) por 1mL de solución con metales pesados (Vásquez 2005). Se pesaron 50mg de biomasa muerta (en peso seco) en una balanza analítica modelo BC Orma, para cada uno de los experimentos y se colocaron en matraces con 50 mL de disolución de metales.

### 2.6 Preparación de la solución de los metales

Se preparó una solución madre de Cadmio de 400 mg.L<sup>-1</sup> con sulfato de Cadmio (3CdSO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O) y otra solución madre de Plomo de 400 mg.L<sup>-1</sup> con nitrato de plomo (Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) en agua destilada. Se ajustó el pH de la disolución a analizar según sea el caso con NaOH y/o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N antes de la adición de la biomasa muerta (Acosta 2007). A partir de ellas se prepararon las soluciones con la concentración de 50 ppm para cada metal.

### 2.6 Efecto del pH sobre la bioadsorción

Se prepararon soluciones con un pH de 3, 5, 7, 9 y 11; las cuales tenían una concentración de 50 ppm para cada solución metálica de Cd y Pb, todas a temperatura ambiente. A estas soluciones se agregó los 50 mg de bioadsorbente y se dejaron en agitación a 120 rpm a temperatura ambiente. Luego de 60 minutos, se colocaron en tubos centrifuga de 50 mL e inmediatamente se centrifugaron a 5000 rpm por 25 min.

### 2.7 Determinación del tiempo óptimo de bioadsorción

Las soluciones de cadmio y plomo de 50 ppm y cada una con un pH de 3, se recolectaron en intervalos de 0, 15, 30, 60 y 120 min

en agitación a 120 rpm, a temperatura ambiente. Inmediatamente se colocaron en tubos centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 5000 ppm por 25 min. El sobrenadante se recuperó con una pipeta y se filtró con una membrana de policarbonato de 0.45 mm (Yan y Viraraghavan 2003). Luego se recolectó en frascos de plástico a 4°C para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, para medir la concentración de Cd y Pb residual. El experimento se realizó por triplicado.

### 2.8 Efecto de las concentraciones iniciales de Cd y Pb sobre la bioadsorción

Se prepararon soluciones de 100, 200 y 400 ppm de ambas soluciones a pH 3 y se mantuvieron en agitación a 120 rpm por 120 min a temperatura ambiente. Luego se colocaron en tubos centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 5000 ppm por 25 min. El sobrenadante se recuperó con una pipeta y se filtró con una membrana de policarbonato de 0.45 mm (Yan y Viraraghavan 2003). Luego se recolectó en frascos de plástico a 4°C para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, para medir la concentración de Cd y Pb residual. El experimento se realizó por triplicado.

### 2.9 Medición de la concentración de metales pesados

Para la cuantificación de la concentración de metales pesados de cada uno de los sobrenadantes obtenidos se filtró sobre una membrana de policarbonato de 0.45 mm (Yan y Viraraghavan 2003) y se guardó en frascos de plástico para su posterior análisis con el método de espectroscopía de absorción atómica por flama (Gómez 2004), usando un equipo modelo Shimadzu AA - 6800 (sensibilidad de 2 ppm), de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El experimento se realizó por triplicado y la cuantificación se halló calculando el porcen-

taje de remoción por medio de la siguiente fórmula (Monge et al. 2008):

$$\%R = (C_o - C_f) / C_o \times 100\%$$

Dónde:

C<sub>o</sub>= Concentración inicial del soluto en mg/L.

C<sub>f</sub>= Concentración final del soluto en mg/L.

### 2.10 Análisis estadísticos

Todos los ensayos de determinación de la bioadsorción se realizaron por triplicado, por lo cual los resultados fueron analizados usando el software estadístico SPSS v17.0 con la finalidad de determinar si existe diferencias significativas entre los valores de los resultados obtenidos.

## Resultados

### 1. Identificación de la cepa silvestre

Atendiendo las características morfológicas (Gram (-) y forma bacilar no esporulada) y culturales de la colonia (colonias medianas, convexas, de forma circular, mucoide, con bordes redondeados); así como por pruebas bioquímicas, mediante el sistema de identificación API 20E para bacterias Gram negativas, la cepa bacteriana fue identificada con el Index API 20E como *Serratia marcescens* con excelente identificación (perfil 5317721). Al nombre se le adicionó la codificación de la cepa quedando como *Serratia marcescens* M8A-2T.

### 2. Determinación de los niveles de resistencia a Cd y Pb

Luego de incubar la cepa a 25°C por 48 horas, la resistencia a los metales mencionados se determinó midiendo los halos de inhibición de crecimiento y se compararon con la cepa control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. En la tabla 1 y figura 1 puede observarse que

la cepa resiste concentraciones de plomo de hasta 16000 ppm y 800 ppm de cadmio, sin formar halos de inhibición de crecimiento (0 mm) lo cual es una diferencia notable respecto a la cepa control.

### 3. Efecto del pH sobre la bioadsorción de Cd y Pb

Los mayores porcentajes de bioadsorción se alcanzaron a pH 9 obteniéndose un 91.57% de remoción de cadmio y un 74.04% de remoción de plomo como podemos observar en la tabla 2. Este último muestra que a pH 7 la remoción es de 73.64% lo que sugiere que no existe una variación significativa entre valores de pH de 7 y 9 para el caso de plomo, mientras que para el cadmio sí. Al analizar estadísticamente los datos se comprobó la normalidad de la distribución de los datos obtenidos con la prueba de Shapiro-Wilk. La prueba de Levene demostró la homogeneidad de las varianzas ya que el valor está por encima de  $p < 0.05$ . Al observarse un nivel de significancia por debajo del valor asumido ( $p < 0.05$ ) se confirmó que existen diferencias significativas entre los niveles de remoción de cadmio frente los diferentes valores de pH ensayados. Debido a ello, se requiere determinar en qué casos se presentan estas diferencias, por lo cual se empleó la prueba de Scheffé; con la cual se confirmó que no hay diferencias significativas en los porcentajes de remoción obtenidos a pH 7 y pH 11, tampoco existe diferencia significativa en lo obtenido a pH 9 y pH 11.

Los resultados de las pruebas para la evaluación de la capacidad de bioadsorción de plomo en solución acuosa demuestran que existen variaciones significativas en el pH de la solución del metal con la capacidad de remoción por parte de la cepa silvestre. Respecto al plomo se siguió el mismo análisis estadístico que para cadmio, pero la prueba de Scheffé, nos demostró que la capacidad de remoción

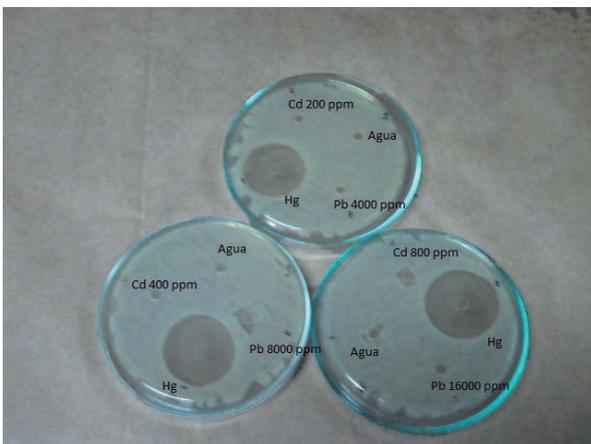
TABLA 1  
MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN EN MM PARA Cd (II) Y Pb (II) LUEGO DE LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN

METAL	CONCENTRACIÓN (ppm)	HALO INHIBICIÓN (mm)	
		Cepa control <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Cepa silvestre <i>Serratia marcescens</i> M8A-2T
Plomo	4000	0	0
	8000	0	0
	16000	11	0
	32000	14	12
Cadmio	200	0	0
	400	0	0
	800	10	0

TABLA 2  
PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS METALES PESADOS PRODUCIDOS POR *Serratia marcescens* M8A-2T, FRENTE A VARIACIONES DEL PH EN SOLUCIONES ACUOSAS

Metal Pesado (50 ppm)	pH de la solución				
	3	5	7	9	11
Plomo	37.14 %	60.57 %	73.64 %	74.04 %	42.45 %
Cadmio	2.25 %	24.06 %	79.92 %	91.57 %	86.12 %

Tiempo de contacto de la biomasa con el metal: 1 hora; biomasa bacteriana: 1 mg/ml



**Figura 1.** Prueba de resistencia de la cepa a diferentes concentraciones de Cd y Pb en agar *Trypticase soya*. Placas sembradas con la cepa M8A-2T y concentraciones de Cd a 800 ppm y Pb a 32 000 ppm con los controles positivo (Hg) y negativo (agua destilada).

entre pH 5 y pH 11 no tiene diferencia significativa así como la obtenida entre pH 7 y pH 9. Para los demás casos sí se presentaron diferencias significativas.

#### 4. Determinación del tiempo óptimo de bioadsorción de Cd y Pb

En la tabla 3, se observa que el mayor porcentaje de remoción de Cd (II) se obtuvo entre los 60 y 120 minutos, los valores de bioadsorción fueron de 53.65% y 54.78%, respectivamente; mientras que para Pb (II) la remoción se obtiene desde los primeros 15 minutos de interacción y se mantiene constante hasta los 120 minutos.

Analizando estadísticamente los resultados se observan variaciones significativas, mostrando diferentes valores en el porcentaje de bioadsorción respecto a los tiempos de enfrentamiento. Al obtener en todos los casos valores por encima del  $p < 0.05$ , se verificó la normalidad de la distribución de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. La prueba de Levene demostró la homogeneidad de las varianzas ya que el valor está por encima de  $p < 0.05$ . En la prueba de Scheffé, se entiende que los datos superiores a  $p < 0.05$  no presentan diferencias significativas con respecto a la

TABLA 3  
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONTACTO EN LA CAPACIDAD DE BIOADSORCIÓN DE LA BIOMASA MUERTA DE *Serratia marcescens* M8A-2T EN SOLUCIONES DE 50 PPM DE CADMIO Y PLOMO

Metal Pesado (*)	Tiempo (minutos)			
	15	30	60	120
Plomo	71.73%	72.07%	75.40%	76.92%
Cadmio	6.95%	7.64%	53.65%	54.78%

(\*) Solución metálica de 50 ppm, pH 9 y biomasa bacteriana de 1 mg/ml

TABLA 4  
EFECTO DE LAS VARIACIONES DE LAS CONCENTRACIONES INICIALES DE SOLUCIONES DE CADMIO Y PLOMO EN EL PORCENTAJE DE BIOADSORCIÓN DE LA BIOMASA MUERTA DE *Serratia marcescens* M8A-2T

Metal Pesado(**)	Concentración del metal (ppm)		
	100	200	400
Plomo	61.32%	59.71%	35.41%
Cadmio	97.50%	99.14%	99.89%

(\*\*) pH de las soluciones 9 y biomasa bacteriana de 1 mg/ml a una hora de contacto de la biomasa con el metal.

bioadsorción de cadmio, entonces se demostró que no es lo mismo enfrentar la cepa con el metal durante 15 minutos, que 60 o 120 minutos; pero que se obtiene el mismo resultado si se enfrenta 15 o 30 minutos y que entre 60 y 120 minutos también obtendríamos el mismo resultado.

Los resultados de las pruebas para la evaluación de la capacidad de bioadsorción de plomo en solución acuosa demuestran que existen variaciones significativas de los diferentes tiempos de enfrentamiento ocasionando diferentes valores en el porcentaje de bioadsorción. Utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, la cual demostró la homogeneidad de las varianzas ya que el valor está por encima de  $p < 0.05$ . Con este valor se pudo evidenciar que no existen diferencias significativas entre los niveles de remoción de plomo frente los diferentes tiempos ensayados.

### 5. Efecto de las concentraciones de Cd y Pb sobre la bioadsorción.

La tabla 4 nos muestra los resultados obtenidos luego de una hora de interacción entre la biomasa muerta y la solución metálica de Cd

(II) a pH 9, se observó que a una concentración de 400 mg/L, *Serratia marcescens* M8A-2T fue una cepa con gran capacidad bioadsorbente, teniendo las mejores respuestas de remoción del metal, se obtuvo hasta un 99.89% de captación. En tanto que para Pb a 100 mg/L se obtuvo un 61.32% y fue decreciendo según se iba aumentando la concentración del metal.

Los resultados de las pruebas para la evaluación de la capacidad de bioadsorción de cadmio demuestran que existen variaciones significativas en el uso de las diferentes concentraciones por parte de la cepa silvestre en la capacidad de remoción. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk, de Levene y la de Scheffé; que nos demostró que solo hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos cuando se usó 100 ppm y 400 ppm de cadmio.

Los resultados de las pruebas para la evaluación de la capacidad de bioadsorción de plomo demuestran que existen variaciones significativas en el uso de las diferentes concentraciones de metal empleadas. Al observarse un nivel de significancia por debajo del valor asumido ( $p < 0.05$ ) se confirma que existen diferencias significativas entre los niveles de remoción de plomo frente a las diferentes

concentraciones del metal ensayadas. Para determinar en qué casos se presentan estas diferencias, se empleó la prueba de Scheffé, la cual demostró que solo entre 100 y 200 ppm no hay diferencia significativa.

## Discusión

En la actualidad, son muy pocas las investigaciones que reportan a *Serratia marcescens* en los procesos de bioadsorción. Uno de ellos es el reportado por Kurek *et al.* (1982), donde se obtuvo un 76.20% en la remoción de Cd (II) en un medio líquido usando biomasa muerta de la misma especie. Sin embargo, en este estudio *Serratia marcescens* M8A-2T ha demostrado ser una bacteria con alta capacidad de remoción de metales, alcanzando valores de 91.57% en eficiencia de bioadsorción de Cd (II) y 74.04% en el caso de Pb (II) en soluciones monometálicas. La mayoría de los estudios hechos por Wang y Chen (2009), Rivera *et al.* (2003) y Vásquez (2005), dentro del grupo de las Gram negativas reportan a especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes sp.* y diferentes especies de *Bacillus* entre las Gram positivas como reportaron Da Costa y Pereira (2001). Por ello se tomó como referencia especies bacterianas del mismo grupo.

### 1. Determinación de los niveles de resistencia a Cd y Pb de *Serratia marcescens* M8A-2T

Respecto a los niveles de resistencia presentados por la cepa silvestre, esta demostró ser resistente a concentraciones entre los 4 000 mg/L y los 32 000 mg/L para el caso de plomo y de 200 mg/L hasta los 800 mg/L de concentración para cadmio (Tabla 1), esto debido a que esta cepa ha sido aislada de un relave minero, ello indica que esta bacteria es altamente resistente a metales tóxicos, de acuerdo con Malik (2004) y Sahar *et al.* (2012) quienes señalan

que los microorganismos que son aislados de ambientes contaminados son más resistentes a los que son aislados de ambientes naturales, ya que desarrollan varios mecanismos de resistencia. Esta característica encontrada la hace calificar como una potencial alternativa en los procesos de biorremediación.

Por otra parte, existe un reducido número de referencias de *Serratia marcescens* en pruebas de CMI. Sahar (2012) presentó valores de 1000 mg/mL de Pb (II) luego de 48 horas de incubación. A su vez, Cristani *et al.* (2012) reportan valores de CMI 0.025 y 0.100 mg/mL para Pb y Cd, respectivamente, luego de 18 horas de incubación. Para ambos casos, los valores reportados son inferiores a los obtenidos en este estudio.

Dentro del grupo de las Gram negativas, se encontró valores reportados de CMI mayores a 500 mg/L de Cd (II) y mayores a 1000 mg/L Pb (II) para la especie *Pseudomonas fluorescens*. Otra especie reportada por Lu *et al.* (2006) es *Enterobacter sp.* J1, la cual presenta valores de CMI superiores de 300 mg/L de Cd (II) y 1500 mg/L de Pb (II). Comparando los valores de tolerancia para Pb (II) se puede observar que los presentados en este estudio son considerablemente mayores a los obtenidos por los otros autores. En el caso de Cd (II) la concentración máxima evaluada fue de 800 mg/L; sin embargo, la cepa *Serratia marcescens* M8A-2T demostró tener un mayor rango de resistencia.

Cristani *et al.* (2012) reportaron la influencia de la absorción del metal sobre la biosíntesis del pigmento producido por *Serratia marcescens*. En presencia del metal, la producción del pigmento decrece considerablemente después de los 10 minutos de interacción hasta aproximadamente los 70 minutos que se produce su inhibición. A su vez, Sahar *et al.* (2012) mencionan que la producción del pigmento por *Serratia marcescens* se ve inhibida en presencia de hierro. En el caso de la cepa silvestre de este estudio, se observó la inhibición total de la biosíntesis del pigmento "prodigiosina".

## 2. Efecto del pH sobre la bioadsorción de Cd (II) y Plomo (II)

Monge et al. (2008), Vásquez (2005) y Friis y Myers (1986) reportan que la variación de pH afecta considerablemente el proceso de bioadsorción y es considerado uno de los parámetros más influyentes del proceso ya que afecta la solubilidad de los metales o la activación de los grupos funcionales en la biomasa. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con Wang y Chen (2009) para los valores de pH, en el cual se reportó que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* CW-96-1 fue capaz de remover un 99% de Cd (II) siendo su valor óptimo de pH valores entre 8 y 9. Leung et al. (2001) reportan que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* removió Pb (II) a pH óptimos entre 5 y 7. A su vez, Cristani et al. (2012) reportó para la remoción de Pb (II) donde el pH óptimo, para la misma especie, fue de 9, a temperatura de 37°C reporta que a pH menores de 4.5 la cepa se inhibe lo cual también se ve reflejado en este estudio en el cual se obtiene bajos porcentajes de remoción a pH 3. Leung et al. (2001) reporta que cuando el pH disminuye, la superficie de la célula bacteriana tiende a estar cargada positivamente y los polímeros presentes en ésta, se encuentran protonados, produciendo así una reducción en la atracción entre la biomasa y los cationes metálicos ya que estos últimos tienen que competir con los protones por los sitios de unión. En contraste, a pH más altos se facilitan la inmovilización de los metales, ya que la superficie de la pared celular se encuentra cargada negativamente según Chang et al. (1997); Yan y Viraraghavan (2003) y Acosta et al. (2007). Por otro lado, Lu et al. (2006), señalaron pH óptimos de adsorción de Cd (II) y de Pb (II) de 6 y 5, respectivamente. Estudios realizados por Chang et al. (1997) señalan que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PU 21 no fue capaz de biosorber Cd, Cu y Pb a un pH por debajo de 3. Sin embargo, otros autores reportan lo contrario, así Ilhan et al. (2004)

reportan que utilizaron a *Staphylococcus saprophyticus* para la remoción de los iones Cr, Pb y Cu alcanzando un 70% de biosorción de Pb (II) a un valor óptimo de pH de 4.5.

## 3. Determinación del tiempo de la bioadsorción de Cd (II) y Plomo (II)

En relación con el tiempo de incubación sobre la bioadsorción de Cd (II) por la biomasa muerta de la cepa *Serratia marcescens* M8A-2T se encontró que la mayor bioadsorción de cadmio ocurre entre los 60 y 120 minutos (tabla 4) dando un porcentaje de remoción de 54%, mientras que durante los primeros minutos no hay una bioadsorción significativa. Para este caso, Sala (2002) resalta que el tiempo de equilibrio de este proceso no está sólo en función de los sitios disponibles, sino también del tipo, tamaño, forma y estado físico de la biomasa (activo o inerte) así como del metal implicado en el proceso de bioadsorción.

Por otro lado, para el caso de remoción de Pb (II) se mantiene casi constante durante el tiempo de interacción desde los 15 hasta los 120 minutos alcanzando un valor promedio de 74%. Sin embargo, Ilhan et al. (2004) reportan la remoción en tiempos menores como un 70% de biosorción para la remoción de Pb en los primeros 15 minutos utilizando la cepa *Staphylococcus saprophyticus*. A su vez, Chang et al. (1997) demuestran que a los 5 minutos del proceso de biosorción se removió el 90% de Cd y Pb con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, Vásquez (2005) observa que el porcentaje de remoción de Cd y Pb se dio a los 5 minutos de iniciado el proceso.

Para ambos casos los tiempos reportados en el presente estudio pueden sugerir que la biomasa bacteriana usa un mecanismo de absorción pasiva, el cual consiste en la adsorción física o intercambio iónico en la pared celular, considerándosele un estado que se produce inmediatamente ya que es independiente de la energía (Goyal et al. 2003). Esto también es

respaldado por Atkinson et al. (1998) quienes mencionan que la cinética de adsorción en la superficie bacteriana presenta un equilibrio rápido siendo en promedio de 5 – 30 min.

#### 4. Efecto de las concentraciones de Cd (II) y Plomo (II) sobre la bioadsorción

Para el caso del Cd (II) se puede evidenciar que los porcentajes de remoción son cercanos al 100% para las 3 concentraciones ensayadas lo que demuestra que la biomasa bacteriana puede seguir aun captando iones cadmio, es decir concentraciones mayores. Por otro lado, para Pb (II) la capacidad de bioadsorción de la biomasa disminuyó en la medida que se incrementó la concentración del metal, lo cual se ve evidenciado en las pruebas estadísticas realizadas presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre 200 y 400 ppm, lo que sugeriría que entre 100 y 200 ppm estaría el punto de saturación de la biomasa bacteriana. Ello indicaría que la biomasa muerta podría presentar menor cantidad de ligandos o sitios de unión para Pb (II) frente a Cd (II). Otra posible explicación de este comportamiento está relacionado con la concentración de la biomasa donde concentraciones de biomasa altas tienden a aglomerarse y disminuye el área de contacto y por ende la disponibilidad de los sitios de unión con el metal. Para este trabajo se ha utilizado 50 mg de biomasa, por lo que debería evaluarse a concentraciones menores y observar si es influyente en este resultado.

Cristani et al. (2012) han reportado valores de remoción a concentraciones de 25 mg/L para Pb (II) y 100 mg/L de Cd (II), siendo inferiores a las encontradas en este trabajo. Kurek et al. (1982) reportan valores de bioadsorción de Cd (II) de 10 mg/L e indican una mayor remoción por parte de células muertas luego de 18 horas de incubación frente al cultivo inicial. Por el contrario, Sahar et al. (2012) han reportado 55% de remoción a concentraciones de 1000 µg / mL para el caso de Pb (II).

## 5. Conclusiones

La biomasa seca y muerta de *Serratia marcescens* M8A-2T, empleada como biosorbente a 1 mg/ml, es eficiente en la remoción de plomo y cadmio y puede emplearse en procesos de biorremediación a nivel de laboratorio, a pH 9 durante 15 minutos para remover plomo y 60 minutos para remover cadmio.

## Referencias bibliográficas

- ACOSTA, I. et al. (2007). Bioadsorción de Cadmio (II) en solución acuosa por biomasa fúngica. *Información Tecnológica*, 18(1); pp. 9-14.
- AHALYA, N. et al. (2003). Biosorption of heavy metals. En: Res. J. Chem. *Environ*, 7(4).
- ALLURI, H.K. et al. (2007). Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *Afr. J. Biotechnol*, 6(25); pp. 2924-2931.
- ATKINSON, B. et al. (1998). Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA*. 24(2); pp.129-36.
- CAÑIZARES, Rosa (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42; pp.131-143.
- CHANG, J. et al. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa*. *Wat. Res.* 31; pp.1651-1658.
- CRISTANI M. et al. (2012). Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). *Environ. Sci. Pollut. Res.* (19); pp. 161-168.
- CUNNINGHAM, C.y PHILP, J. (2000). Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination And Reclamation*, 8(4). doi:10.2462/09670513.575
- DA COSTA, A. y PEREIRA, F. (2001) *Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by Bacillus sp., Bacillus cereus, Bacillus sphaericus and Bacillus subtilis*. En: *Brazilian Journal of Microbiology*. 32; pp. 1-5.

- DAS, N. *et al.* (2008). Biosorption of heavy metals – An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(April); pp.159-169.
- FRIIS, N. y MYERS, P. (1986). Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(1); pp. 21-28.
- GUIBAL, E. *et al.* (1992). Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption by fungal biomass and materials of biological origin. *Environmental Science and Technology*. (29); pp. 2496-2503.
- GÓMEZ, A. *et al.* (2004). Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999. *Rev. Int., Contam. Ambient.* 20(1); pp. 5-12.
- IHAN, S. (2004). Removal of Chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. (2): 50-57.
- KUREK E. (1982). Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. *Applied and Environmental Microbiology*. 43(5); pp. 1011-1015.
- LEUNG, W.C. *et al.* (2001). Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 22(6):72-5.
- LU, W. *et al.* (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials* B134.80-86.
- MADIGAN, M.T. *et al.* (2003). *Biology of microorganisms*. Illinois: Prentice Hall, Southern Illinois University Carbondale.
- MALIK, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* (30); pp.261-278.
- MARTÍN, A. (2008). *Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados*. Tesis para la obtención de Grado Académico de doctor. Universidad de Granada.
- MEJÍA, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1(1); pp. 77-99.
- MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS (2012). *Boletín Mensual de Minería, MEM*. Lima, Perú. Disponible en internet: <<http://www.minem.gob.pe/publicacion.php?idSector=1&idPublicacion=277>>
- MONGE, O. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (Clinoptilolita). *Rev. Int. Contam. Ambient.* 24(3); pp.107-115.
- REYES, T. *et al.* (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*, 9; pp. 59-64.
- RIVERA, J. *et al.* (2003). Bioadsorption of Pb(II), Cd(II) and Cr(VI) on activated carbon from aqueous solutions. *Carbon*, 41; pp. 323-330.
- SAHAR A. (2012). The resistance of locally isolated *Serratia marcescens* to heavy metals chlorides and optimization of some environmental factors. *Journal of Environmental Occupational Science*. 1(1); pp. 37-42.
- SALA E. *et al.* (2002). Biosorption of chromium (III) by *Sargasum* sp. Biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 45 (2).
- TARANGINI, K. *et al.* (2009). Biosorption of heavy metals using individual and mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. Department of Chemical Engineering National Institute of Technology, India.
- VÁSQUEZ, V. (2005). *Biosorción de metales pesados en solución acuosa mediante uso de biomasa bacteriana muerta*. Tesis Licenciatura en biología. Universidad de las Américas, Puebla. 49-53.
- VOLESKY, B. y HOLAN, Z.R. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11(3); pp. 235-50.
- WANG, J. & CHEN, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2); pp.195-226.
- YAN, G. & VIRARAGHAVAN, T. (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*. 37(18); pp. 4486-4496.