

Innovaciencia 2014; 2 (1): 53 - 58

ENSAYOS PRELIMINARES IN VITRO DE BIOSORCIÓN DE CADMIO POR CEPAS FÚNGICAS NATIVAS DE SUELOS CONTAMINADOS

PRELIMINARY TESTS IN VITRO OF BIOSORPTION CADMIUM BY NATIVE FUNGAL STRAINS OF CONTAMINATED SOIL

Beatriz Elena Guerra ¹, Adriana Ximena Sandoval Meza ²,
Luigi Sebastián Manrique González ³, Sandra Patricia Barrera Rangel ⁴

Cómo citar este resumen: Guerra Sierra B. E., Sandoval-Meza A., Manrique Gonzáles, L. S., Barrera Rangel S. P. Ensayos preliminares in vitro de biosorción de Cadmio por cepas fúngicas nativas de suelos contaminados. Innovaciencia facultad cienc. exactas fis. naturales. 2014; 2 (1): 53 - 58

Artículo recibido el 18 de agosto de 2014 y aceptado para publicación el 27 octubre de 2014

Resumen

Introducción: Los metales pesados como el cadmio (Cd), no pueden ser degradados por métodos químicos o biológicos, y tienden a bioacumularse y a biomagnificarse; constituyen un grave problema en la cadena trófica, provocan diversos efectos tóxicos, en todos los organismos vivos. En humanos, se considera que la fuente directa de adquisición de Cd, proviene de alimentos cosechados en suelos contaminados por metales pesados. En suelos agrícolas, la presencia de altos niveles de Cd constituye un problema ambiental, debido a que el Cd es móvil y las plantas lo absorben fácilmente, como sucede en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). Aprovechando el potencial que tienen los hongos de adaptarse y crecer en suelos contaminados, y su capacidad de biosorción de metales pesados, se propuso una metodología para iniciar una serie de ensayos *in vitro*, con el objetivo de seleccionar cepas fúngicas tolerantes, a concentraciones crecientes de Cd, en medios de cultivo líquido. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de investigación en Biotecnología Agroambiental (LIIBAAM) de la Universidad de Santander, se presentan los resultados preliminares. **Materiales y métodos:** se realizó un muestreo totalmente al azar en suelos contaminados por metales pesados de la región minera del municipio de California y suelos agrícolas de la región cacaotera de los municipios: El Carmen y San Vicente de Chucurí (Santander del Sur-Colombia). Se analizaron en total, 45 muestras compuestas de las tres regiones de estudio para el aislamiento fúngico. **Resultados:** Los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, presentan altos porcentajes de biosorción de Cd, 98,6 % y 96% respectivamente en medios de cultivo líquidos. **Conclusiones:** La metodología ensayada fue eficiente para preseleccionar *in vitro* cepas fúngicas con alta capacidad de biosorción de Cd en su biomasa.

Palabras clave: *Aspergillus*, *Trichoderma*, biosorción, cadmio, hongo.

1. Profesora Titular. Universidad de Santander-UDES. Laboratorio de Biotecnología Agroambiental - Grupo Microbiota. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.

2. Microbióloga. Laboratorio de Biotecnología Agroambiental - Grupo Microbiota. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

3, 4. Estudiantes de Microbiología Industrial. Universidad de Santander. Bucaramanga Colombia. Email bguerra@udes.edu.co

ABSTRACT

Introduction: Heavy metals such as cadmium (Cd), can not be degraded by chemical or biological methods, and tend to bioaccumulate and biomagnify, are a serious problem in the food chain, cause a variety of toxic effects in all living organisms. In humans, it is considered that the direct source of acquisition of Cd, comes from food grown on soils contaminated by heavy metals. In agricultural soils, the presence of high levels of Cd is an environmental problem, because the Cd is mobile and plants absorb it easily, as in the crop's cocoa (*Theobroma cacao*). Considering the potential of fungi to adapt and grow in contaminated soils, and their ability to biosorption of heavy metals, a method was proposed to initiate a series of tests *in vitro*, with the aim of selecting tolerant fungal strains, at increasing concentrations of Cd in liquid culture media. The tests were conducted at the Laboratory of Agro-Environmental Biotechnology Research (LIIBAAM) at the University of Santander, preliminary results are presented. **Materials and methods:** A totally random sampling was performed in soils contaminated by heavy metals mining region of California and agricultural soils of the crop's cocoa region: El Carmen and San Vicente de Chucuri (Santander South - Colombia). We analyzed a total of 45 composite samples of the three study regions, for fungal isolation. **Results:** The genera *Aspergillus* and *Trichoderma*, showed high percentages of Cd biosorption, 98.6 % and 96 % respectively in liquid culture media. **Conclusion:** The tested methodology, was efficient for screening *in vitro* fungal strains with high capacity Cd biosorption in their biomass.

Keywords: *Aspergillus*, *Trichoderma*, biosorption, cadmium, fungi.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial y agrícola, así como la tendencia mundial a la urbanización han contribuido considerablemente a la contaminación ambiental, la cual constituye un problema a nivel mundial^{1,2}. Existen diversos contaminantes ambientales, según su naturaleza y origen, en particular, los metales pesados ejercen marcados efectos dañinos sobre la composición de la biota y el equilibrio de los ecosistemas debido a su alta toxicidad³. Su presencia en el medio ambiente se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, fundamentalmente por la acción antropogénica. Los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados son debidos a desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales, modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos, ruptura de la integridad

de biomoléculas y modificación de otros agentes biológicamente activos⁴.

La contaminación metálica supone una amenaza medioambiental importante para los seres vivos, puesto que diversos metales que son micronutrientes esenciales, como el cobre (Cu) y el zinc (Zn), resultan tóxicos en concentraciones elevadas, mientras que otros como cadmio (Cd), plomo (Pb), Cromo (Cr), mercurio (Hg) y arsénico (As), son tóxicos a dosis mínimas⁵. Concentraciones excesivas de metales en el suelo podrían impactar la calidad de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y la salud del medio ambiente, ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas, animales y los humanos⁶.

El Cd es considerado como un contaminante ambiental y se encuentra en forma de sales. El Cd es soluble en agua da origen a soluciones acuosas que no pueden tratarse por medios físicos ordinarios; por lo que actualmente se busca desarrollar tecnologías sustentables que permitan tratar las zonas contaminadas con estos tipo de metales. A este respecto se ha establecido el potencial de adaptación de cepas fúngicas en zonas contaminadas con metales pesados, por lo cual suponen el uso de su biomasa viva y/o muerta que sea capaz enlazar el metal y lo absorba en cantidades elevadas para tratar de eliminarlos del ecosistema contaminado⁷, así los microorganismos logran inmovilizar los metales pesados a través de diversos mecanismos tales como la biosorción, la bioacumulación, la biotransformación. La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado para la biorremediación de metales como el Cd, Cr, Pb, Ni, Zn, Cu. La biosorción es un proceso económico y con grandes ventajas respecto a otros métodos utilizados. Una alternativa viable es la utilización de microorganismos ya que estos pueden ser utilizados como biosorbentes, y se pueden aislar fácilmente a partir de ecosistemas contaminados.

En este trabajo se utilizaron hongos de vida libre, aislados de suelos contaminados por metales pesados en cultivos de cacao del municipio de San Vicente de Chucuri y el Carmen (Santander) y de suelos mineros de la región de California (Santander). El objetivo de este trabajo consistió en adaptar, seleccionar y evaluar en medios nutritivos líquidos, la capacidad de biosorción de Cd, por cepas fúngicas nativas con el propósito de seleccionar las más eficientes.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Muestreo de suelos:

Se realizó un muestreo al azar de los sitios de estudio a 20 cm desde la superficie del suelo, y en cada uno de los tres suelos contaminados por metales pesados, San Vicente, El Carmen, y California (Santander). Un total de 15 muestras compuestas de capacidad 1 kg, fueron

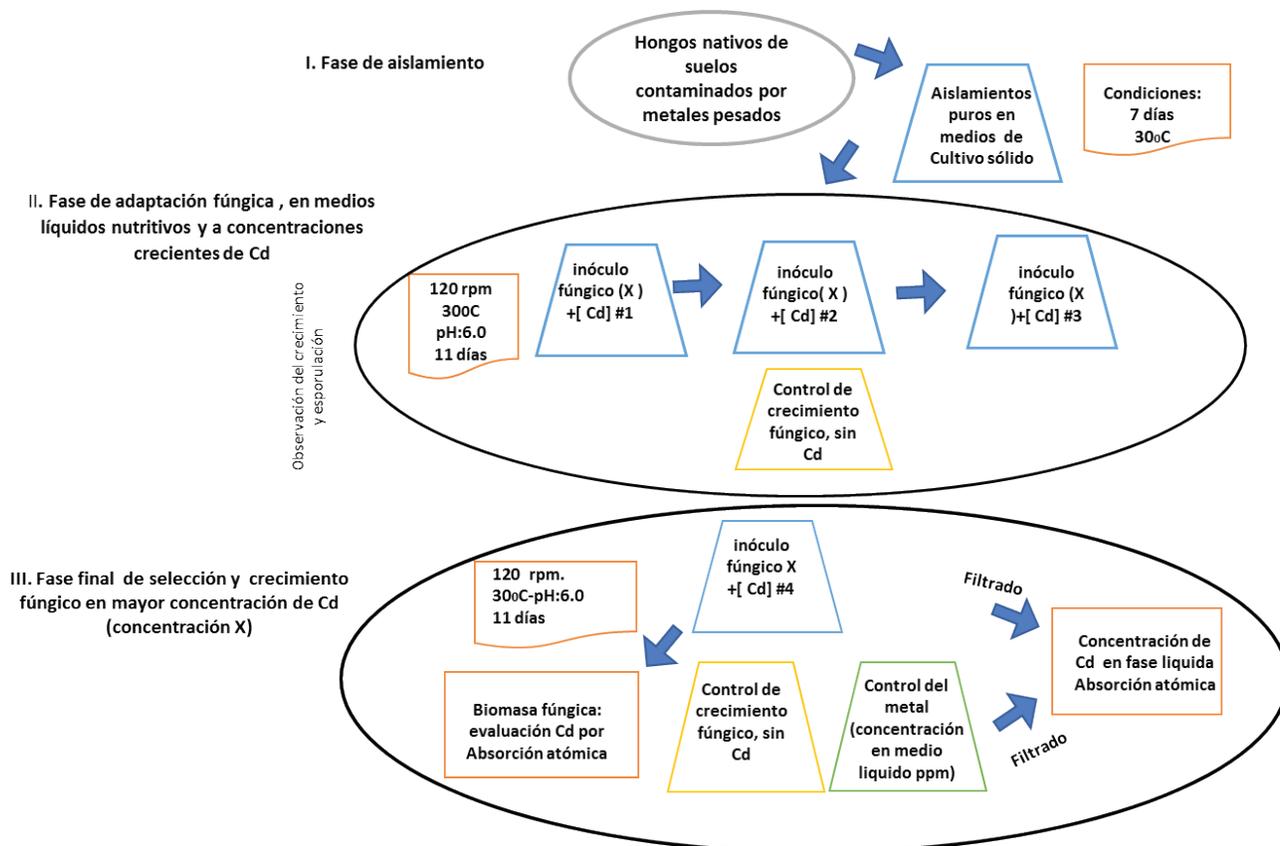


Fig. 1. Metodología general para evaluar la capacidad de biosorción de hongos de vida libre nativos de suelos contaminados por Cd. Fuente: Guerra Sierra, S. B. (2013).

consideradas por zona de muestreo. Posteriormente las muestras fueron transportadas al Laboratorio de investigación en Biotecnología Agroambiental de la Universidad de Santander, debidamente rotuladas y en cavas a temperatura de 10°C.

Aislamiento fúngico:

Los hongos fueron obtenidos de cada uno de los suelos utilizando el método de diluciones⁸, posteriormente se aislaron en cultivos puros, en agar papa-dextrosa (PDA), y se realizó una identificación morfológica de acuerdo a las características coloniales y microscópicas a nivel de estructuras de reproducción, utilizando la técnica del microcultivo. Los hongos fueron cultivados en agar PDA, por 7 días a temperatura de 30°C, antes de la fase de adaptación.

Fase de adaptación:

El crecimiento de los hongos se llevó a cabo inoculando 1×10^6 células/mL en 100 mL de caldo Tripticasa-soya (Merck®), más dextrosa al 0,1 %, incubados a 30°C con agitación constante (120 rpm), a pH: ±6.0 durante 11 días. Los inóculos fúngicos se

montaron por triplicado, de acuerdo a cada aislamiento o morfo especie (Tabla 1) y a diferentes concentraciones de Cd (4, 12, 20 y 40 ppm respectivamente).

Fase final de crecimiento en 81,2 ppm de Cd:

Una vez seleccionadas las 11 cepas que crecieron bien en la fase de adaptación, se separaron de los medios líquidos por filtración utilizando papel Whatman No.40 y se llevaron a horno seco, temperatura 70°C, el secado se realizó fraccionadamente: un tiempo inicial de 20 minutos seguido de la observación del secado y 40 minutos adicionales, hasta obtener un secado completo, sin incineración de la biomasa, en un horno de calor seco, marca Haceb (H-60). Una vez secadas las biomásas, fueron llevadas a cámara de flujo laminar, y se guardaron herméticamente en bolsas ziploc®, posteriormente se pesaron 0,5g del micelio seco de cada una de las cepas, ésta cantidad fue considerada como inóculo estándar para todas las 11 cepas fúngicas en 100 ml de caldo Tripticasa-soya (Merck®). La inoculación se realizó por triplicado para cada morfo especie y se dejaron crecer por 11 días, a 30°C en agitación constante 120 rpm para permitir el crecimiento y biosorción del metal pesado.

Evaluación de la capacidad de biosorción de Cadmio:

Las biomásas fúngicas y el medio líquido, fueron separados a través de filtraciones en recipientes estériles, utilizando papel Whatman No.40. Las biomásas fúngicas, fueron llevadas a horno seco, temperatura 70°C, fraccionadamente como se describió en el paso anterior y se guardaron herméticamente en bolsas ziploc, cubiertas con papel aluminio, posteriormente se almacenaron a 5°C. La medición de la concentración de cadmio en los filtrados se realizó en un equipo Espectrómetro de absorción atómica / AAS 55B AA marca Agilent Technologies, en el laboratorio de consultas industriales de la Universidad de Santander –Laboratorio certificado para medición de metales pesados. Un resumen de la metodología propuesta se muestra en la Figura1.

RESULTADOS

Aislamiento de cepas fúngicas tolerantes a concentraciones de Cd.

Fueron seleccionadas once (11) morfoespecies por su capacidad de adaptación y crecimiento en soluciones nutritivas y suplementadas con concentraciones crecien-

tes de cadmio. En la Figura 2, se muestra el crecimiento de las biomásas con relación a un control sin Cadmio, obsérvese la falta de esporulación de las cepas con relación al control.

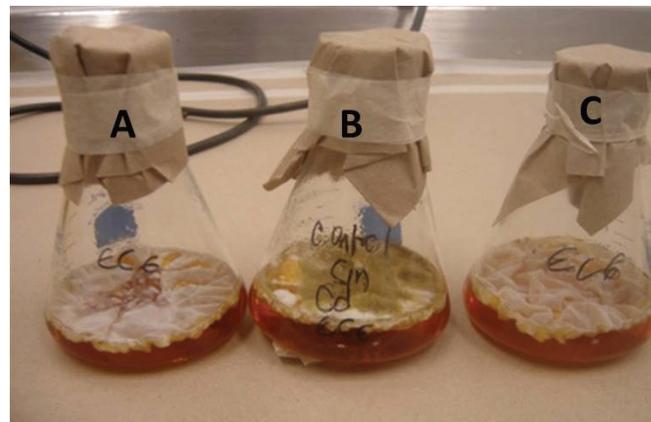


Fig. 2. Crecimiento de hongos en medios líquidos nutritivos a diferentes concentraciones de Cd. A y C: cepas fúngicas en crecimiento en medios líquidos suplementados con Cd. B: Control de crecimiento de una cepa fúngica en medio líquido, sin Cd. Grupo de investigación en Biotecnología-MICROBIOTA. 2013.

Tabla 1. % Captación de metales pesados por cepas aisladas de suelos contaminados por metales pesados. Municipios: San Vicente de Chucuri, El Carmen y California (Santander)

Nomenclatura según sitio de muestreo	Morfoespecie fúngica	Concentración de [Cd]ppm, en el filtrado*	Concentración de [Cd]ppm en la biomasa fúngica**	Porcentaje (%) captación
SV2	<i>Aspergillus-L001</i>	6,93	74,27	91,47
SV3	<i>Mucor-L002</i>	15,24	65,96	81,23
SV5	<i>Penicillium-L003</i>	40,32	40,88	50,34
SV6	<i>Penicillium-L004</i>	8,99	72,21	88,93
SV7	<i>Penicillium-L005</i>	33,81	47,39	58,36
EC2	<i>Trichoderma-L006</i>	3,20	78,00	96,06
EC5	<i>Aspergillus-L007</i>	1,11	80,09	98,63
EC6	<i>Aspergillus-L008</i>	3,98	77,22	95,10
SC3	<i>Aspergillus-L009</i>	9,19	72,01	88,68
SC4	<i>Penicillium-L010</i>	15,50	65,70	80,91
SC5	<i>Trichoderma-L011</i>	6,35	74,85	92,18
	Control	81,20	0,00	0,00

SV: suelos de la región cacotera de San Vicente de Chucuri, **EC:** suelos cacaoteros del Municipio del Carmen y **SC:** suelos mineros de California (Santander). **los valores obtenidos corresponden a la media obtenida de muestras evaluadas por absorción atómica por triplicado.

En la Tabla 1, se presentan los resultados obtenidos de la captación o biosorción de cadmio por las 11 cepas fúngicas. La mayor captación (98%), fue realizada por *Aspergillus*-L007, seguido por *Trichoderma*-L006 con 96,06% y *Aspergillus*-L008 con 95,10%.

El porcentaje de captación por las biomásas fúngicas se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Captación de biosorción de Cd} = \frac{[\text{Concentración Cd ppm en biomasa fúngica}]}{[\text{Concentración control Cd ppm}]} \times 100$$

CONCLUSIONES

La metodología propuesta en este trabajo fue útil y permitió el crecimiento de los hongos en soluciones líquidas y a concentraciones crecientes de Cd, sin embargo la esporulación de las 11 cepas aisladas se vio afectada por la presencia del metal pesado en la solución de crecimiento, contrariamente la formación de micelio por los hongos, no se afectó totalmente pues se formó la biomasa a un crecimiento más lento, con relación al control (dato no mostrado). Estos resultados concuerdan con trabajos donde se reporta que la presencia de metales pesados afecta a los microorganismos de diferentes maneras dependiendo del tipo de cepa, algunas crecen con variaciones llamativas en la morfología de las colonias, la esporulación y la producción de pigmentos y, a medida que aumenta la concentración de los metales se acentúan esos cambios.⁹

En general el género *Aspergillus* y *Trichoderma* mostrarán alto porcentaje de biosorción de Cd, estos resultados son consistentes con trabajos realizados con estos géneros fúngicos, para remover metales pesados y retenerlos en su biomasa.^{10,11}

Los hongos aislados mostraron un potencial de biosorción de Cd en soluciones líquidas a nivel de laboratorio, sin embargo se deben continuar ensayos a diferentes pH, y concentraciones de nutrientes que podrían influir sobre los resultados.

El aislamiento y selección de los hongos adaptados al (Cd) es parte importante de este trabajo y permitirá continuar con otros experimentos posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo hace parte del proyecto de investigación 002-12, aprobado y financiado por la Universidad de Santander - UDES.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores expresan que no existen conflictos de intereses y aceptan todo el contenido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vullo, D. L., "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente". Revista Química Viva. 2003; 2(3): 93-104.
2. Saldivar, A., "México, la economía del desarrollo insustentable". Mundo siglo XXI, Revista del centro de investigaciones económicas administrativas y sociales del Instituto. Politécnico Nacional. 2005; 1: 49-51
3. Maier, R., "Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants". Environmental Health Perspectives. 2003; 111: 1093-1101.
4. Ochiai, E. I. General principles of biochemistry of the elements. Plenum Press, New York. 648 1987.
5. Alonso, J., García, M.A., Pérez-López, M. Melgar, M.J. Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación. Revista de Toxicología. España. 2004; 21:11-15.
6. Gulson B.L., Mizon K.J., Korsch M.J., Howarth D. Non-orebody sources are significant contributors to blood lead of some children with low to moderate lead exposure in a major mining community. The science of the total environment. 1996; 181: 223-30.
7. Herrera, T. La contaminación con cadmio en suelos agrícolas. Instituto de Edafología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 2004.
8. Mueller, G.M., Schmit J.P., Ryvardeen L., O dell, T.E., Lodged J., Leacock, P.R., Mata, M., Umaña, L., WU, Q., Czederpiltz D.L. Recommended protocols for sampling macrofungi. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. 2004. 169-72.
9. Leitão, A. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. Artículo de revisión. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2009; 6 1393-1417.

10. Amini, M H Younesi and N. Barhamifar (), Biosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus niger* : response Surface methodology and isotherm study . *Chemosphere*.2009; 75:1483-91.
11. Akthar ,K.M.W, Akthar and AM Khalid. Removal and recovery of Uranium from aqueous solutions by *Trichoderma harzianum* , *Water Res.* 2007; 41:1366-78.
12. Guerra, S. Beatriz Elena. Comunicación personal- Generación y estandarización de Protocolos para aislamientos de hongos de vida libre, de suelos contaminados por metales pesados en Santander. Laboratorio de investigación en Biotecnología Agroambiental –LIIBAAM-Universidad de Santander. 2013.