UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de la bioprecipitación de plomo mediado por bacterias ureolíticas y su potencial aplicación en suelo agrícola

Laura Sofía Pineda Fernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias. Instituto de Biotecnología IBUN
Bogotá, Colombia
2025

Estudio de la bioprecipitación de plomo mediado por bacterias ureolíticas y su potencial aplicación en suelo agrícola

Laura Sofía Pineda Fernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Microbiología

Director:

Ph.D., Pedro Filipe de Brito Brandão

Departamento de Química

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental

Grupo de Investigación:

Grupo de Estudios para la Remediación y Mitigación de Impactos Negativos al Ambiente (GERMINA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología IBUN

Bogotá, Colombia

2025

A mis padres Esperanza y Pedro, a mis hermanas Daniela y Natalia, y a Lupita, quienes tienen todo mi amor y agradecimiento.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

_____

Laura Sofía Pineda Fernández

Fecha 22/10/2024

Agradecimientos

Quisiera expresar mi total y sincero agradecimiento al director de mi tesis de maestría, el profesor Pedro Filipe de Brito Brandão, por todo el acompañamiento brindado durante el desarrollo de esta tesis y, sobre todo, por su paciencia y empatía. De igual forma, quisiera agradecer a la profesora Elianna Castillo Serna, por su guía y consejos en el uso de la espectroscopía de absorción atómica para el desarrollo de este proyecto. Agradezco igualmente a los miembros del grupo de investigación GERMINA por el continuo aporte de ideas al proyecto, y en especial a mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, quienes fueron un apoyo valioso a nivel académico y personal. Gracias a Yony Fajardo por facilitar el acceso al Centro Agropecuario Marengo para hacer el muestreo del suelo, y al profesor Jaime Torres y a Norberto Pérez, de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por su colaboración en la caracterización del suelo muestreado. También al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia (MinAmbiente) por los permisos de acceso a recursos genéticos (Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero de 2016 –Otrosí No. 35), a la Dirección de Investigación y Extensión sede Bogotá (DIEB), Universidad Nacional de Colombia, por el financiamiento a través de los proyectos 57665, 48328, y 37691, y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (MinCiencias) a través del proyecto 110180863795/CT-190-2019). Finalmente, quiero dar mi más profundo agradecimiento a mis amigas y amigos por toda la motivación y apoyo que hicieron que el desarrollo de este trabajo fuera más ameno, y en especial a mi familia, que fue mi motor y mi apoyo principal para seguir adelante y culminar este trabajo.

Resumen

Estudio de la bioprecipitación de plomo mediado por bacterias ureolíticas y su potencial aplicación en suelo agrícola

El plomo se ha convertido en una problemática ambiental como resultado del aumento en las emisiones por actividades antropogénicas, y representa un riesgo para la salud y el medio ambiente debido a su potencial toxicidad sobre los seres vivos. Para mitigar el impacto negativo que puede tener este metal, recientemente se ha explorado el método de precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP) utilizando bacterias ureolíticas para inmovilizar Pb(II) precipitándolo como carbonato poco soluble, reduciendo así su biodisponibilidad para organismos como las plantas en el suelo. Este proyecto tuvo como objetivo evaluar la capacidad de precipitación de carbonatos de bacterias ureolíticas tolerantes al Pb(II) y su desempeño en la inmovilización del metal en suelo agrícola. Los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b, y *Serratia* sp. 5b fueron seleccionados dada su alta actividad ureolítica y la capacidad de remover más del 90% del Pb(II) en solución. Después de estudiar el aporte de diferentes mecanismos de inmovilización de Pb(II) con estos aislados, se encontró que, para los aislados del género *Serratia*, la contribución más importante a la remoción total del metal en solución es la biosorción de Pb(II) sobre la biomasa, mientras que para *Bacillus* sp. 92g2 la contribución más relevante proviene de la coprecipitación del metal con la matriz de carbonatos formada. La capacidad de precipitación de carbonatos fue comprobada para los tres aislados a través del análisis de los precipitados obtenidos, usando las técnicas de IR, DRX y SEM-EDX. Por último, con el ensayo de aplicación en suelo sólo se encontró una disminución del 20% en la fracción intercambiable del metal después de 13 días de haber inoculado *Serratia* sp. 5b con un medio suplementado con urea y Ca(II), y del 10% después de adicionar solo medio con urea y Ca(II). Sin embargo, esta disminución no se vio reflejada en un aumento en la fracción de Pb(II) unida a carbonatos. Este trabajo permitió determinar que los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 5b y *Serratia* sp. 89b tienen una alta capacidad de remoción de Pb(II) en solución a través de mecanismos de biosorción, adsorción, y coprecipitación del metal, aunque bajo las condiciones experimentales trabajadas no resultó efectivo el tratamiento de inmovilización en suelo agrícola.

Palabras clave: Biorremediación, plomo, MICP, actividad ureolítica, suelo agrícola.

Abstract

Study of lead bioprecipitation mediated by ureolytic bacteria and its potential application in agricultural soil.

Lead has become an environmental issue due to increased emissions from anthropogenic activities and represents a health and ecological risk due to its potential toxicity to living organisms. To mitigate the negative impact that this metal can have, the microbiologically induced carbonate precipitation (MICP) method has recently been explored using ureolytic bacteria to immobilize Pb(II) by precipitating it as a poorly soluble carbonate, thus reducing its bioavailability to organisms such as plants. This project aimed to evaluate the carbonate precipitation capacity of Pb(II)-tolerant ureolytic bacteria and their performance in immobilizing the metal in agricultural soil. The isolates *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b, and *Serratia* sp. 5b were selected given their high ureolytic activity and ability to remove more than 90% of Pb(II) in solution. After studying the contribution of different Pb(II) immobilization mechanisms with these isolates, it was found that, for the *Serratia* isolates the most important contribution to the total removal of the metal in solution is the biosorption of Pb(II) on the biomass. In contrast, for *Bacillus* sp. 92g2 the most relevant contribution comes from the co-precipitation of the metal with the carbonate matrix formed. The carbonate precipitation capacity was verified for the three isolates through the analysis of the obtained precipitates, using IR, XRD, and SEM-EDX techniques. Finally, with the soil application assay, only a 20% decrease in the metal exchangeable fraction was found after 13 days of inoculating *Serratia* sp. 5b with medium supplemented with urea and Ca(II), and 10% after adding medium with urea and Ca(II). However, this decrease was not reflected in an increase in the fraction of Pb(II) bound to carbonates. This work allowed us to determine that the isolates *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 5b and *Serratia* sp. 89b have a high capacity to remove Pb(II) in solution through biosorption, adsorption, and co-precipitation of the metal. However, under the experimental conditions tested, the immobilization treatment in agricultural soil was not effective.

Key words: Bioremediation, lead, MICP, ureolytic activity, agricultural soil.

Contenido

1. Introducción 14
1.1 Marco Teórico 14
1.1.1 Plomo y sus características 14
1.1.2 Contaminación con plomo 14
1.1.3 Plomo en suelos 15
1.1.4 Plomo en la agricultura 16
1.1.5 Métodos de remediación de plomo 16
1.1.6 Mecanismos de interacción bacteria-metal 18
1.1.7 Precipitación de metales y mecanismo MICP 19
1.2 Estado del arte 21
1.3 Planteamiento del problema 22
1.4 Justificación 24

2. Selección de bacterias ureolíticas para ensayos de inmovilización de plomo en solución acuosa 26
2.1 Introducción 26
2.2 Materiales y métodos 27
2.2.1 Reactivos y medios de cultivo 27
2.2.2 Selección de aislados 28
2.2.3 Caracterización de precipitados 30
2.2.4 Mecanismos de remoción de Pb(II) en solución 31
2.2.5 Análisis estadístico 35
2.3 Resultados y discusión 36
2.3.1 Selección de aislados bacterianos que inmovilizan Pb(II) en solución 36
2.3.2 Análisis de precipitados 39
2.3.3 Determinación de mecanismos asociados a la inmovilización de Pb(II) en solución 45
2.4 Conclusiones 53

3. Potencial de *Bacillus* sp. 92g2 y *Serratia* sp. 5b para la inmovilización de Pb(II) en suelo agrícola 55
3.1 Introducción 55
3.2 Materiales y métodos 56
3.2.1 Reactivos y medios de cultivo 56
3.2.2 Curva de crecimiento 57
3.2.3 Obtención y acondicionamiento del suelo 58
3.2.4 Ensayo de inmovilización 59
3.2.1 Análisis estadístico 62
3.3 Resultados y discusión 62
3.3.1 Seguimiento de la actividad ureolítica en suelo para los aislados *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2 62
3.3.2 Cambios en la distribución de Pb(II) por la inoculación con *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2 65
3.3.3 Conclusiones 70

4. Conclusiones y recomendaciones 71
4.1 Conclusiones 71
4.2 Recomendaciones 72

Anexos **77**

Referencias **88**

Lista de figuras

Figura 1-1. Interacciones metal-microorganismo en bacterias. Modificado de Chakraborty *et al.*, 2017. EPS: Exopolisacáridos. 19
Figura 1-2. Mecanismo ureolítico del proceso MICP. M^{2+} hace referencia a un metal divalente. Tomado de Tamayo-Figueroa et al. (2019). 20
Figura 2-1. Fracciones de Pb(II) en el sistema estudiado. EPS, exopolisacáridos. 32
Figura 2-2.. Producción de amonio y valores de pH obtenidos con cada aislado luego de 72 h en medio líquido suplementado con 70 mg L^{-1} de Pb(II). El valor inicial de pH del medio utilizado fue 6,7 - 6,8. 37
Figura 2-3. Remoción de Pb(II) obtenida con cada aislado evaluado luego de 72 h en medio líquido suplementado con 70 mg L^{-1} de Pb(II). 38
Figura 2-4. Espectros de infrarrojo para los precipitados obtenidos de *Serratia* sp. 89b, *Serratia* sp. 5b, y *Bacillus* sp. 92g2. Los espectros de $CaCO_3$ (Coblentz Society Inc, s/f) y calcita (Lafuente et al., 2015) se colocan como referencia para fines de comparación. .. 41
Figura 2-5. Difractogramas obtenidos para los precipitados obtenidos de *Serratia* sp. 89b, *Serratia* sp. 5b, y *Bacillus* sp. 92g2. Los espectros de calcita y vaterita fueron tomados de la base de datos ICSD (Zagorac et al., 2019), y corresponden a los patrones con mayor porcentaje de coincidencia para los precipitados bacterianos. 42
Figura 2-6. Micrografías de SEM de los precipitados producidos por *Serratia* sp. 89b (A-B), *Serratia* sp. 5b (D-E) y *Bacillus* sp. 92g2 (G-H), y sus respectivos espectros EDX (C, F, I). 44
Figura 2-7. Remoción de Pb(II) por *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, luego de 72 h en el medio de cultivo M11 (**Tabla 2-1**). 46
Figura 2-8. Comportamiento de la remoción de Pb(II) y el pH para los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, luego de 14 días de cultivo en el medio M10. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de remoción ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey, y las letras minúsculas corresponden a diferencia en el pH. 48
Figura 2-9. Fraccionamiento de Pb(II) dentro estudiado para los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, luego de 14 días de cultivo en el medio M10 a 30 °C y 120 rpm. Las diferencias significativas se muestran por cada fracción (*). 49
Figura 2-10. Comportamiento de la remoción de Pb(II) y el pH para *Serratia* sp. 5b luego de 14 días en 5 medios de cultivo diferentes: medio original urea y Ca(II) (M10); sin Ca(II) (M15); más Ca(II) (M16); más urea (M18); mayor OD_{600} (M10 1.2). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de

remoción (p > 0,05) según la prueba de Tukey, y las letras minúsculas corresponden a diferencia significativa entre pH. 51
Figura 2-11. Fraccionamiento de Pb(II) dentro del sistema MICP estudiado para *Serratia* sp. 5b luego de 14 días en 5 medios de cultivo diferentes: M10, M15, M16, M18, y M10 1.2 (**Tabla 2-1**). Las diferencias significativas se muestran por cada fracción (*)..... 52
Figura 3-1. Comportamiento de la actividad ureolítica en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en un mismo día de muestreo. 64
Figura 3-2. Comportamiento del pH del suelo en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en de un mismo día de muestreo. 65
Figura 3-3. Fracción de Pb(II) intercambiable en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de un mismo día de muestreo. 67
Figura 3-4. Fracción de Pb(II) unido a carbonatos en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de un mismo día de muestreo. 69

Lista de tablas

Tabla 2-1. Composición de los diferentes medios de cultivo usados en el presente trabajo. 28
Tabla 3-1. Composición de los diferentes medios de cultivo usados en el presente trabajo. 57
Tabla 3-2. Resumen de tratamientos utilizados para el ensayo de aplicación en suelo agrícola. 59

.

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
Ca(II)	Calcio(II)
Cd(II)	Cadmio(II)
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CMO	Contenido de materia orgánica
DRX	Difracción de Rayos X
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDX	Energy Dispersive X-Ray
EPS	Exopolisacáridos
F-AAS	Flame Atomic Absorption Spectroscopy
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IR	Infrared spectroscopy
Kps	Constante del producto de solubilidad
MICP	Microbiologically Induced Carbonate Precipitation
NBU	Nutrient broth with urea
OD_{600}	Densidad óptica a 600 nm
Pb	Plomo
Pb(II)	Plomo(II)
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Scanning Electron Microscopy
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
WHO	World Health Organization

1. Introducción

1.1 Marco Teórico

1.1.1 Plomo y sus características

La acelerada industrialización y el constante crecimiento de la sociedad actual han generado un incremento en la cantidad de contaminantes presentes tanto en cuerpos de agua como en suelos a nivel global (Masindi & Muedi, 2018). Entre éstos, un grupo que se destaca por los riesgos que representa a la salud y el medio ambiente es el de metales y metaloides como lo es el cadmio, el arsénico, o el plomo, siendo este último un metal potencialmente tóxico y no esencial para los seres vivos, por lo que tiende a acumularse al no cumplir una función biológica (Alloway, 2012; Remick & Helmann, 2023).

Este metal puede ser absorbido por el sistema respiratorio, digestivo, o a través de la piel, produciendo respuestas adversas como desórdenes neurológicos, cardiovasculares, respiratorios, inducción de estrés oxidativo y respuesta inflamatoria en varios órganos, anemia, hipertensión, entre otros (Balali-Mood et al., 2021; Mansouri et al., 2024; Salles et al., 2024; Shilpa et al., 2021). El sistema nervioso se ve afectado por la presencia de plomo a través de mecanismos como la mímica de la acción del calcio y disrupción en la homeostasis de calcio en el cuerpo, lo cual puede afectar proteínas como la proteína quinasa C, que es calcio-dependiente, y está involucrada en procesos de transmisión sináptica, por lo que una alteración en su funcionamiento puede llevar a fallas en procesos cognitivos como la memoria (Briffa et al., 2020; Vázquez & Peña De Ortiz, 2004).

1.1.2 Contaminación con plomo

El plomo se encuentra de forma natural como galena (PbS), cerusita ($PbCO_3$) y anglesita ($PbSO_4$), siendo galena el mineral más común (Cheriton & Gupta, 2005). También puede encontrarse en depósitos o menas junto con otros elementos como Zn o S los cuales son usados para actividades mineras (Luo et al., 2019; Tan, Zhou et al., 2017). Sin embargo, algunas actividades originadas a partir de la actividad humana son responsables del aumento progresivo del nivel de contaminación y la exposición de seres vivos a este metal. El uso histórico del tetraetilo de plomo como un aditivo en la gasolina ocasionó una deposición atmosférica del metal a partir de las emisiones de vehículos donde ocurría la

combustión de esta gasolina, lo que ha llevado a una contaminación perdurable en el ambiente (Wong & Li, 2004; Woo et al., 2023). Aunque hoy en día está descontinuado el uso de la gasolina con plomo, la combustión de la gasolina normal también representa una fuente de emisión del metal a la atmósfera dada la composición de los combustibles fósiles (Chrastný et al., 2018). Además de esto, algunos productos como las baterías de plomo o pinturas antiguas contienen plomo como aditivo, y su mala disposición ha ocasionado que sean una fuente contaminante importante (Chen et al., 2017; Hunt, 2016).

Estas actividades antropogénicas han contribuido especialmente a la acumulación de plomo en suelos de zonas industriales (Kinuthia et al., 2020), mineras (Oliveira et al., 2023) e incluso urbanas (Perez-Vazquez et al., 2015; Wong & Li, 2004). Adicionalmente, algunas prácticas en la agricultura como la aplicación de pesticidas y fertilizantes que contienen plomo dentro de sus formulaciones también contribuyen a la contaminación en suelos agrícolas (Chen et al., 2020; Cheraghi et al., 2013; Defarge et al., 2018; Veerasingam & Venkatachalapathy, 2014).

1.1.3 Plomo en suelos

El plomo se puede encontrar en los suelos en diferentes formas dependiendo de las condiciones tanto bióticas como abióticas de éste. Las repercusiones que pueda tener el metal para los seres vivos dependen principalmente de su biodisponibilidad en el medio, la cual se va a definir como la fracción de metal en la matriz (suelo) que pueda ser incorporado por diferentes organismos como plantas, animales o humanos (Rigoletto et al., 2020; Thums et al., 2008; Udovic & Lestan, 2009). El comportamiento del plomo en suelo depende de factores como el pH, la capacidad de intercambio catiónico, o contenido de materia orgánica. El pH afecta la disponibilidad del metal siendo ésta mayor a valores más bajos del pH (Udovic & Lestan, 2009; Ye et al., 2022). La presencia del plomo como catión Pb(II) se favorece en condiciones de pH por debajo de 6, y en condiciones más alcalinas tiende a formar complejos con iones hidroxilo, a ser adsorbido sobre óxidos de hierro y manganeso o silicatos presentes en el suelo, así como también a ser precipitado como sulfato, carbonato o fosfato (Alloway, 2012). Por otra parte, en suelos con una alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) y contenido de materia orgánica (CMO) la biodisponibilidad del plomo disminuye, puesto que el suelo tendrá una mayor capacidad de unión al catión del metal y se pueden formar complejos con la materia orgánica presente (Dayton et al., 2006; Mukhopadhyay et al., 2018). De igual forma, factores como la

presencia de otros cationes, comunidad microbiana, entre otros, puede afectar la movilidad y biodisponibilidad del metal en el suelo (Cao et al., 2023; Shi et al., 2021).

1.1.4 Plomo en la agricultura

La presencia de este metal en suelos puede afectar la producción agrícola por los múltiples efectos tóxicos que tiene sobre las plantas. Las raíces son las principales vías para la entrada de metales ya que al absorber agua del suelo que contiene nutrientes necesarios para la planta, también puede absorber los contaminantes que estén presentes en forma catiónica usando los mismos sistemas de absorción, debido a la similitud en el radio iónico y la carga de estos iones (Mclaughlin et al., 2011). El plomo tiene la capacidad de unirse a la pared celular de las raíces de algunas plantas, y puede ser transportado a través del xilema por la planta, o el floema para una absorción foliar (Rai et al., 2019). La presencia de plomo afecta procesos como la germinación de semillas al disminuir la producción de fitohormonas como el ácido giberélico (Atici et al., 2005), así como afecta la síntesis de clorofila, la transpiración y el crecimiento de las raíces, lo que puede perjudicar el crecimiento de la planta dependiendo de la concentración del metal (Shu et al., 2012; Zulfiqar et al., 2019). Así mismo, puede alterar los procesos de captación y transporte de agua (Rucińska-Sobkowiak et al., 2013), generar estrés oxidativo (Ashraf et al., 2017), o alterar las dinámicas de absorción, transporte y asimilación de nutrientes por parte de las plantas (Wang et al., 2011).

1.1.5 Métodos de remediación de plomo

Existen diferentes aproximaciones para remediar matrices contaminadas con metales, que en el presente texto hará referencia a mitigar la problemática por contaminación con metales, e involucran la aplicación de métodos químicos, físicos, y/o biológicos. Entre los métodos químicos más empleados está la fijación química para reducir la solubilidad del metal en el suelo usando agentes estabilizantes (minerales arcillosos, óxidos metálicos) (Huang & Lo, 2004; Sun et al., 2015), o la solidificación, que consiste en la encapsulación del metal en una matriz sólida formada por materiales como cemento o asfalto (Correia et al., 2020; Kumar et al., 2020; Li et al., 2019). También está la precipitación del catión del metal agregando sustancias químicas que modifican el pH del suelo para favorecer la formación de compuestos insolubles del metal; el intercambio iónico de cationes del metal por cationes no contaminantes presentes en matrices como resinas (Wang et al., 2018); o

la extracción química del metal con agentes quelantes o con soluciones de lixiviación que facilite su disolución y extracción posterior (Sharma et al., 2018; Zhu et al., 2021). Sin embargo, aunque los métodos químicos suelen tener una alta eficiencia y un rápido efecto sobre los contaminantes, también tienen un alto costo económico asociado y el inconveniente de la formación de subproductos que perturban negativamente el suelo, o que aumentan la cantidad de procesos posteriores de tratamiento (Li et al., 2019; Sharma et al., 2018).

Así mismo, entre los métodos físicos más comunes están el reemplazo por completo de suelo contaminado por nuevo suelo o la disminución del nivel de contaminación con el metal en el área al agregar más suelo sin contaminar (Li et al., 2019); el tratamiento térmico en el que se busca eliminar contaminantes como metales pesados que puedan ser evaporados a altas temperaturas para luego recuperarlos por condensación; o la remediación electroquímica en la que se aplica una corriente al suelo para que los cationes de los metales migren a un electrodo (Kumar et al., 2020; Sharma et al., 2018). Los métodos físicos también requieren de un procesamiento adicional, suelen tener un mayor costo en su aplicación, y pueden alterar las condiciones previas del suelo de forma negativa (Li et al., 2019; Sharma et al., 2018).

Frente a esto, se ha planteado el uso de métodos biológicos como una buena alternativa ya que pueden ser más económicos que otras técnicas tradicionales, suelen aplicarse fácilmente *in situ*, y también tienen el potencial de ser más amigables con el medio ambiente (Alvarez & Illman, 2006). Los métodos biológicos hacen uso de los mecanismos propios de plantas y microorganismos para inmovilizar, transformar o remover los contaminantes (Alvarez & Illman, 2006; Li et al., 2019). La remediación con plantas (fitorremediación) se basa principalmente en la capacidad de algunas plantas para tomar el metal biodisponible en el suelo a través de sus raíces y translocarlo hacia diferentes partes de la planta que puede ser retirada y desechada después (Saran et al., 2020), o en la estabilización del metal en el suelo por la interacción con metabolitos de la planta (Greipsson, 2011; Sarwar et al., 2017). Sin embargo, este método puede llegar a tomar mucho tiempo por el proceso de crecimiento de las plantas, además de que los residuos de biomasa generados requieren ser tratados como contaminantes, y puede llegar a ser contraproducente si las plantas que absorben el metal llegan a ser alimento de otros organismos (Rigoletto et al., 2020).

Por otra parte, los microorganismos han demostrado tener un gran potencial de remediación de contaminantes como los metales, dada la tolerancia que pueden generar a éstos bajo diferentes concentraciones, y su alta eficacia gracias a las diversas interacciones microorganismo-metal que pueden presentarse (Hassan, et al., 2020; Huang et al., 2022; Li et al., 2019; Li et al., 2016). Las bacterias se encuentran entre los microorganismos más usados para estas aplicaciones ya que tienen una alta adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, corto tiempo de generación, fácil manejo por su tamaño, alta relación superficie-volumen y poseen elementos genéticos extracromosomales como los plásmidos, que pueden portar genes de resistencia al metal (Chakraborty et al., 2017). Este tipo de remediación se puede implementar de forma directa al adicionar cultivos bacterianos al suelo contaminado (bioaumentación), o estimulando el crecimiento de bacterias ya presentes en el suelo suministrando nutrientes claves para que estos microorganismos puedan desarrollarse y realizar su actividad (bioestimulación) (Chen & Achal, 2019; Fashola et al., 2020). En algunos casos, las bacterias nativas de suelos contaminados con metales como el plomo no están presentes en concentraciones elevadas y puede que un proceso de bioestimulación no sea tan eficiente, por lo que la bioaumentación es una opción para asegurar un proceso de remediación más efectivo, en el que también pueden usarse bacterias nativas aisladas de dichos suelos, y así evitar una perturbación mayor a la microbiota original (Rigoletto et al., 2020). Es importante tener en cuenta también que la efectividad de esta biorremediación estará ligada a la capacidad de los microorganismos de tolerar la presencia del metal en las concentraciones de la matriz contaminada sin que su metabolismo se vea afectado, así como también bajo las diferentes condiciones ambientales a las que sean sometidos.

1.1.6 Mecanismos de interacción bacteria-metal

Hay diferentes mecanismos por los cuales las bacterias pueden tolerar la presencia de metales y ejercer los procesos de biorremediación (**Figura 1-1**). Los lípidos, proteínas, o polisacáridos que componen la pared celular bacteriana proporcionan a las bacterias la capacidad de unir cationes metálicos al exterior de su pared mediante un proceso denominado biosorción, dado por interacciones con los diferentes grupos funcionales cargados presentes como carboxilos, hidroxilos, grupos fosfato, entre otros (Bai et al., 2014). Así mismo, el proceso de biosorción se puede favorecer por la producción de exopolisacáridos, que son moléculas secretadas por las bacterias y compuestas

principalmente de azúcares y proteínas, y que pueden inmovilizar el metal al exterior de la bacteria por la presencia de grupos funcionales o proteínas que llevan a su complejización (Teng et al., 2019; Vimalnath & Subramanian, 2018). Algunas bacterias también tienen transportadores que facilitan el eflujo de los metales fuera de la célula para evitar daños celulares, o también puede usar transportadores para acumular metales en su interior donde reducen la toxicidad del metal convirtiéndolo a formas menos tóxicas mediante procesos de óxido reducción o metilación, o a través de la producción de proteínas ricas en cisteína denominadas metalotioneínas, que pueden inmovilizar el metal dentro de la bacteria (Brink et al., 2020; Kumari & Das, 2019; Naik & Dubey, 2013; Ramos-Zúñiga et al., 2019).

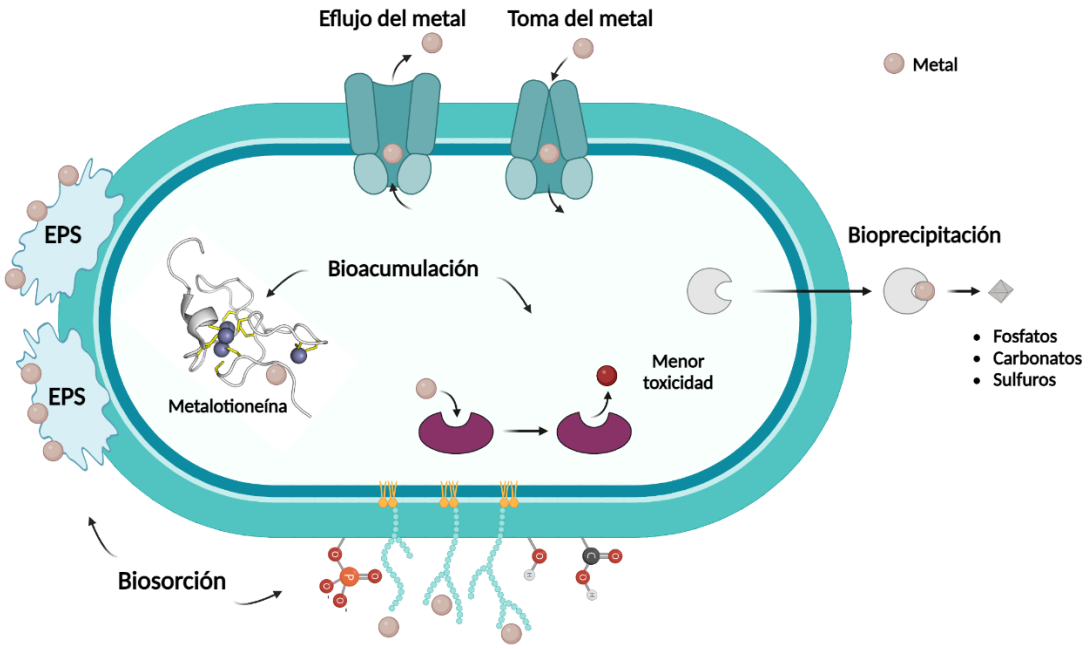

Figura 1-1. Interacciones metal-microorganismo en bacterias. Modificado de Chakraborty *et al.*, 2017. EPS: Exopolisacáridos.

1.1.7 Precipitación de metales y mecanismo MICP

El otro mecanismo de interacción relevante es la precipitación de los metales como sales poco solubles. Dentro de este mecanismo se encuentran ejemplos relevantes como la precipitación de fosfatos o sulfuros, usando bacterias solubilizadoras de fosfato o reductoras de azufre con potencial para la inmovilización de metales (Azabou et al., 2006;

Qin et al., 2023; Yang et al., 2023). Cuando la precipitación se da a través de carbonatos se habla del mecanismo MICP (*Microbiologically Induced Carbonate Precipitation*, por sus siglas en inglés). Aunque este proceso se puede dar a través de diversas rutas metabólicas, particularmente las bacterias ureolíticas, es decir aquellas productoras de la enzima ureasa, inducen esta precipitación de manera rápida y controlada, por lo que se han investigado como potenciales agentes de biorremediación de metales (Song et al., 2022). El mecanismo del proceso MICP se resume en la **Figura 1-2**. En primer lugar, la enzima ureasa cataliza la hidrólisis de la urea hasta formar amoníaco y ácido carbónico, posteriormente se favorece la formación de amonio e iones hidroxilo por el desplazamiento en el equilibrio del amoníaco. Esto conlleva a que se dé un aumento neto en el pH y se desplace el equilibrio del ácido carbónico hacia la formación de carbonatos que finalmente son los que van a reaccionar con cationes divalentes del metal para precipitarlo (Song et al., 2022; Tamayo-Figueroa et. al, 2019).

1. $CH_4N_2O + H_2O \xrightarrow{MICROBIAL-UREASE} NH_2COOH + NH_3$
2. $NH_2COOH + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2CO_3$
3. $2NH_3 + 2H_2O \leftrightarrow 2NH_4^+ + 2OH^- \qquad \uparrow pH$
4. $H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
5. $HCO_3^- + H^+ + 2NH_4^+ + 2OH^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + 2NH_4^+ + 2H_2O$
6. $Ca^{2+} + 2CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3 \qquad \Downarrow precipitate$
7. $M^{2+} + 2CO_3^{2-} \rightarrow MCO_3 \qquad \Downarrow precipitate$

Figura 1-2. Mecanismo ureolítico del proceso MICP. M^{2+} hace referencia a un metal divalente. Tomado de Tamayo-Figueroa et al. (2019).

En ambientes no contaminados este proceso se da naturalmente para la precipitación de cationes como el Ca(II), mientras que en presencia de otros cationes metálicos como el Pb(II) puede ocurrir la formación de carbonato correspondiente, o el catión se incorpora a la estructura del sólido precipitado sustituyendo el calcio en la estructura, o entrando en intersticios de ésta (Zhu & Dittrich, 2016). Puesto que los carbonatos que se precipitan tienen una baja solubilidad en agua (Kps 7.4×10^{-14} para $PbCO_3$) (Skoog et al., 2014), la precipitación de metales tóxicos con este mecanismo puede disminuir su movilidad en el

suelo y su biodisponibilidad, mitigando así los efectos adversos que tienen sobre las plantas (Kumari et al., 2014; Li et al., 2016).

1.2 Estado del arte

En los últimos años se han reportado varias investigaciones en torno al uso de bacterias ureolíticas como posibles agentes de biorremediación de metales mediante el proceso MICP. Un proceso de inmovilización a escala de laboratorio fue puesto a prueba bajo diferentes concentraciones de bacteria y plomo (Jiang et al., 2019). En el estudio encontraron que la bacteria *Sporosarcina pasteurii* es capaz de precipitar el plomo en rangos de concentración hasta 30 mM del metal y que este proceso se ve favorecido con el aumento en el número de células viables, lo que indica que una aproximación de bioaumentación es favorable para el proceso MICP.

En el año 2012, se reporta el uso de bacterias aisladas de zonas mineras altamente contaminadas con metales tóxicos para bioprecipitar plomo en suelos, demostrando que la bacteria *Kocuria flava* CR1, no solo crece a altas concentraciones de plomo (50 mM), sino también tiene la capacidad de disminuir en un 83,4% la fracción disponible del metal en suelo (Achal et al., 2012). También cabe resaltar que el monitoreo de la actividad enzimática permitió observar un incremento en la actividad ureasa a lo largo del experimento de 7 días, lo cual es buen indicador del grado de sostenibilidad del suelo. Por otra parte, en otro estudio se demostró que al tratar parcelas de suelo de 2 x 2 m con la bacteria ureolítica *Bacillus cereus* NS4 usando un medio NBU-urea (caldo nutritivo, $CaCl_2$ 25 mM y urea 2%), el contenido biodisponible de níquel se redujo de 900 mg kg^{-1} a 38 mg kg^{-1} luego de un mes mediante su precipitación como carbonato, demostrando así que es viable el uso del proceso MICP para la bioprecipitación de metales a mayor escala en suelo (Zhu et al., 2016).

Un estudio más detallado del proceso en suelos encontró que algunos indicadores de fertilidad como la CIC, el CMO, potasio y fósforo disponibles, entre otros, cambiaron luego de usar la cepa CJW-1 para biorremediar cadmio, lo cual indica la necesidad de evaluar los cambios asociados a la bioprecipitación de metales con el fin de implementar este proceso de forma adecuada en campo (Peng et al., 2020). Sumado a esto, en 2021 se realizó un estudio de la estructura física del suelo luego de la biorremediación de plomo usando *Bacillus pasteurii* ATCC 11859, en el cual se determinó que algunos parámetros

como el tamaño de partícula, la porosidad, y la permeabilidad del suelo incrementaron luego del tratamiento (Chen et al., 2021). Lo anterior confirma la importancia del monitoreo posterior al proceso de remediación en suelos. Adicionalmente en este estudio, así como en de otros autores (Wei et al., 2022), se confirmó por medio de extracciones secuenciales del suelo que el proceso de MICP lleva a un cambio en especiación del plomo puesto que la cantidad de metal en la fracción soluble se ve disminuida al mismo tiempo que se observa un incremento en la fracción de plomo unida a carbonatos.

Dado el interés que ha despertado esta aproximación de biorremediación, también se ha buscado hacer un esfuerzo por entender el/los mecanismo(s) detrás del proceso MICP. Un estudio reciente encontró que aplicando la bacteria *S. pasteurii* a drenaje ácido de minas, a nivel molecular, la presencia de la enzima anhidrasa carbónica facilita la interconversión de CO_2 a HCO_3^- y CO_3^{2-} para la precipitación de carbonatos y, a nivel geoquímico, los metales como el plomo están siendo coprecipitados con carbonato de calcio o hidróxidos de hierro y manganeso, así como también son adsorbidos en la matriz de estos precipitados y sobre la pared celular bacteriana (Cuaxinque-Flores et al., 2024). Adicionalmente, otra investigación estudió la precipitación de Cd a través del proceso MICP, y encontraron que los productos de mineralización resultantes no son solamente $CdCO_3$, sino también hay precipitación de hidróxidos ($Cd(OH)_2$) y formación de carbonatos mixtos en los que el cadmio sustituye átomos de calcio de la matriz de carbonato formada (Zeng et al., 2022). Estos estudios muestran que es fundamental entender los diferentes mecanismos o procesos simultáneos a MICP para tener una idea más clara de los precipitados que se obtienen, así como de la efectividad de la biorremediación que realmente se puede asociar a la precipitación de carbonatos.

1.3 Planteamiento del problema

Las múltiples fuentes de contaminación con metales tóxicos han contribuido a su acumulación en el ambiente, y entre estos se destaca el plomo dada su alta toxicidad y abundancia. A nivel global hay reportes de la presencia de este metal en diferentes cultivos destinados al consumo humano, tanto a nivel de suelo como en las plantas (Kumar et al., 2019; Rai et al., 2019), en los cuales se han encontrado concentraciones de plomo que exceden el límite permisible en alimentos estipulado por organizaciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO), que varía entre 0,1 y 0,3 mg kg^{-1} dependiendo

de la clase de fruta o verdura (FAO/WHO, 2021; Commission Regulation (EU) 2015). Algunos reportes de plomo en cultivos como el tomate, ajo y trigo en Pakistán (0,91-3,96 mg kg^{-1}) (Khan et al., 2013); la soja en Argentina (2,81-5,85 mg kg^{-1}) (Blanco et al., 2017); o el perejil, la alcachofa y la zanahoria en Colombia (4,17-11,9 mg kg^{-1}) (Lizarazo et al., 2020), muestran el potencial riesgo que representa este metal a la seguridad alimentaria dada su introducción a la cadena alimenticia. La presencia de plomo en cultivos está estrechamente ligada al grado de contaminación de los suelos donde son cultivados estos alimentos debido al proceso de transferencia del suelo a la planta (Lizarazo et al., 2020; Rodríguez et al., 2022), y cuyo aumento se debe principalmente a algunas prácticas agrícolas como el uso de pesticidas y fertilizantes con plomo, así como la implementación de un sistema de riego con aguas residuales. Aunque no se tiene a la fecha un límite definido internacionalmente de la máxima concentración de plomo permitido en suelos, hay algunos límites guía como el establecido por el gobierno de Finlandia de 60 mg kg^{-1} para suelos de uso no industrial (Decree 214/2007), o el recomendado por la WHO de un máximo de 0,1 mg kg^{-1} en suelos destinados a la agricultura (Kinuthia et al., 2020). En Colombia, pocos estudios se han realizado con respecto al grado de contaminación con plomo de suelos agrícolas, sin embargo hay reportes como el de Trujillo-González et al., 2022, que reporta concentraciones de plomo entre 4,95 y 20,27 mg kg^{-1} en suelos agrícolas en el Piedemonte Llanero, o el de Rodríguez y colaboradores (Rodríguez et al., 2022) en el que se reporta una concentración promedio de plomo en suelo de 33,4 mg kg^{-1} en Sibaté, Cundinamarca, y se demuestra una correlación directa entre la presencia del metal y su bioacumulación en hojas, tallo y raíces de remolacha, alcanzando valores que superan el límite permitido (3,08-4,76 mg kg^{-1}).

Es por esto que la continua contaminación de suelos con plomo, sumado a los diversos efectos adversos que este metal tiene sobre los organismos vivos y el ecosistema en general (ver **sección 1.1.1, 1.1.2** y **1.1.4** del **Marco Teórico**), representan una problemática tanto para agricultores como consumidores, a la cual se le debe prestar especial atención y buscar estrategias de mitigación de los impactos negativos que esta puede llegar a tener.

De acuerdo con lo anterior, y con base en la revisión bibliográfica realizada se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la capacidad de bacterias ureolíticas, seleccionadas de una colección de microorganismos aislados en Colombia que inducen la formación de carbonatos, para inmovilizar Pb(II) en solución acuosa y suelo agrícola?

1.4 Justificación

La precipitación de carbonatos mediada por bacterias ureolíticas con el mecanismo MICP es una aproximación que se ha implementado en el ámbito de la biotecnología, en su mayoría para fines de biocementación, ya que representa una opción más amigable con el medio ambiente que las metodologías convencionales (Castro-Alonso et al., 2019). Sin embargo, esta temática ha captado la atención de investigadores en los últimos años para la inmovilización de metales tóxicos dados los resultados promisorios obtenidos a escala de laboratorio (ver sección **Estado del arte**). A nivel de Colombia, aunque ya hay reportes del potencial uso de bacterias para inmovilización de metales como el cadmio (Bravo et al., 2018), es aún muy escasa la investigación que se ha adelantado en este tema, y a la fecha no se han encontrado reportes del uso de bacterias ureolíticas para la inmovilización de plomo en suelos del país.

Aunque es prometedora esta biotecnología, la mayoría de los estudios reportados hacen referencia al potencial de algunas bacterias para precipitar metales tóxicos en solución, pero en comparación son pocos los reportes de su aplicación en suelos contaminados, sobre todo suelos agrícolas. Sumado a esto, dentro de las investigaciones en torno a estos suelos, hay un mayor enfoque hacia la búsqueda de nuevos microorganismos con potencial MICP que resistan altas concentraciones de un metal, pero se evidencia una falta de profundización en el mecanismo de precipitación que permita vislumbrar mejor la viabilidad de está biotecnología en campo.

Teniendo en cuenta que se han encontrado reportes de contaminación con plomo en suelos agrícolas en el país, se hace relevante buscar estrategias de mitigación de los impactos negativos que tiene este metal para la agricultura. De acuerdo con lo anterior, este proyecto se plantea con el objetivo de contribuir al conocimiento en torno al proceso de bioprecipitación de metales tóxicos en forma de carbonatos, y de esta manera dar a conocer bacterias ureolíticas aisladas en Colombia con este potencial biotecnológico. Así mismo, esta investigación pretende brindar evidencia de la capacidad de estas bacterias

para inmovilizar plomo, no sólo en solución, sino en una matriz más compleja como lo es un suelo, como una estrategia para reducir la fracción biodisponible en suelos y de esta forma poder mitigar a futuro la bioacumulación del metal en los cultivos. Con esta investigación también se busca fortalecer la línea de investigación de biorremediación de metales tóxicos del grupo de investigación GERMINA, del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia, en el cual ya se han adelantado investigaciones referentes a la precipitación de carbonatos mediante el mecanismo MICP con fines de biocementación (Montaño-Salazar et al., 2018; Tamayo-Figueroa, 2023), y para la bioprecipitación de cadmio (Diez-Marulanda, 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2023, 2024, Adarme-Duran, 2024).

Objetivos

General

Evaluar la capacidad de precipitación de carbonatos por bacterias ureolíticas tolerantes a plomo(II) y su desempeño en la inmovilización del metal en suelo agrícola.

Específicos

1. Seleccionar un conjunto de bacterias ureolíticas tolerantes a plomo(II) para ensayos de inmovilización del metal
2. Determinar el porcentaje de remoción de plomo(II) por precipitación de carbonatos en solución acuosa mediado por las bacterias ureolíticas seleccionadas.
3. Evaluar el efecto de la aplicación de las bacterias ureolíticas seleccionadas sobre la fracción biodisponible de plomo(II) en suelo agrícola.

2. Selección de bacterias ureolíticas para ensayos de inmovilización de plomo en solución acuosa

2.1 Introducción

El Pb se ha convertido en uno de los metales pesados más abundantes en matrices como los suelos o cuerpos de agua, como resultado de sus diversas fuentes de emisión por actividades antropogénicas, y representa un riesgo para la salud y el medio ambiente debido a su potencial toxicidad sobre los seres vivos, así como por su permanencia en el medio (Masindi & Muedi, 2018). Algunas actividades humanas actuales e históricas, como la minería, la combustión de combustibles fósiles, o el uso de aditivos con plomo en gasolina o pinturas, han contribuido a la acumulación de Pb en el ambiente, aumentando el riesgo de exposición de los seres vivos a este metal (Hunt, 2016; Woo et al., 2023).

Para remediar la contaminación por Pb se han usado métodos físicos como el tratamiento térmico y la sustitución del suelo, y métodos químicos como la lixiviación química y la enmienda del suelo (Sharma et al., 2018). Sin embargo, el enfoque de la biorremediación utilizando bacterias u hongos, ha sido explorado como una alternativa más sostenible y económica para mitigar los impactos negativos de la contaminación por metales pesados (Azcón et al., 2010; Hassan et al., 2020). Las bacterias han demostrado ser una opción de biorremediación versátil dado que poseen múltiples mecanismos de interacción con metales para disminuir la toxicidad sobre ellas (Chakraborty *et al.*, 2017). Entre estos mecanismos se destaca la biosorción de cationes metálicos sobre grupos funcionales o proteínas presentes en la pared celular, o en sustancias secretadas por las bacterias como los exopolisacáridos, así como la bioacumulación de los metales al interior de la célula (Bai et al., 2014; Teng et al., 2019).

Recientemente, el método MICP (por sus siglas en inglés, *Microbially Induced Carbonate Precipitation*), ha sido explorado como una alternativa prometedora para inmovilizar metales precipitándolos como carbonatos, reduciendo así su biodisponibilidad debido a su baja solubilidad en agua (Jalilvand et al., 2020; Qiao et al., 2021). Entre las diversas estrategias de MICP, la vía ureolítica es una de las más estudiadas debido a la abundancia de bacterias ureolíticas en el medio ambiente y a la rápida precipitación que inducen (Song

et al., 2022). La ureasa secretada por las bacterias cataliza la hidrólisis de la urea presente en el medio dando lugar a la producción de amoníaco (NH_3) y ácido carbónico (H_2CO_3), que finalmente aumenta el pH dando lugar a la formación de iones carbonato (CO_3^{2-}) que interactúan con cationes metálicos para formar el correspondiente carbonato (**Figura 1-2**) (Tamayo-Figueroa et al., 2019).

El objetivo del presente estudio fue explorar la capacidad de 37 aislados bacterianos, provenientes de suelos cacaoteros colombianos, para hidrolizar urea y remover Pb(II) en solución a través de un proceso MICP. De igual forma, se buscó determinar la contribución de diferentes mecanismos que ocurren simultáneamente a la precipitación de carbonatos durante el proceso de remoción de Pb(II) en solución, para esclarecer la verdadera contribución del MICP. En este capítulo se abarcan las actividades relacionadas con los objetivos específicos 1 y 2.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Reactivos y medios de cultivo

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. Para los medios de cultivo se utilizaron los reactivos triptosa (Scharlau, Alemania), glucosa (D-Glucosa anhidra, Scharlab, España), NaCl (Panreac, España), urea (Panreac, España), $Pb(NO_3)_2$ (Merck, Alemania), $Ca(CH_3CO_2)_2$ (Merck, Alemania) y HNO_3 65% (v/v) (Merck, Alemania). Los medios fueron debidamente esterilizados en autoclave a 15 psi por 20 minutos, y sobre éstos se adicionó el volumen correspondiente de soluciones stock de urea (250 g L^{-1}), glucosa (100 g L^{-1}), Ca(II) (25 g L^{-1}), y Pb(II) (700 g L^{-1}), preparadas a partir de las sales ya mencionadas, y fueron esterilizadas por filtración con un filtro de poliamida de 0,2 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania), y ajustadas a un pH de 6,7-6,8 usando HNO_3 al 2%. Para los pre-inóculos de los aislados se usó un medio de cultivo base denominado M1, al cual no se le adicionó Ca(II) o Pb(II), y para la evaluación general de la inmovilización de Pb(II) en solución se usó un medio suplementado con el metal (M10). Otros medios de cultivo empleados se especifican en la **sección 2.2.4**, y en la **Tabla 2-1** se resume la composición de los medios usados. Para la preservación de los microorganismos a -20° C y -80 °C se usó como base el medio M1, y se adicionó glicerol estéril al 20% (v/v).

Tabla 2-1. Composición de los diferentes medios de cultivo usados en el presente trabajo.

Componente	M1	M10	M11	M15	M16	M18
Triptosa	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}
NaCl	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}
Glucosa	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}
Urea	20 g L^{-1}	20 g L^{-1}	-	20 g L^{-1}	20 g L^{-1}	30 g L^{-1}
Calcio: Ca(II)	-	400 mg L^{-1}	-	-	800 mg L^{-1}	400 mg L^{-1}
Plomo: Pb(II)	-	70 mg L^{-1}	70 mg L^{-1}	70 mg L^{-1}	70 mg L^{-1}	70 mg L^{-1}
pH	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8

Para la cuantificación de Pb por absorción atómica se preparó una curva de calibración entre 0,14 y 1,12 mg L^{-1} Pb(II), a partir de un patrón del metal de 1000 mg L^{-1} (Panreac, España). Para la curva de calibración de NH_4^+ (0,17 – 2,08 mg L^{-1}) se utilizó un estándar de 1000 mg L^{-1} (Merck, Alemania), y la cuantificación se hizo con los reactivos de salicilato de sodio (Panreac, España), nitroprusiato de sodio (Merck, Alemania), EDTA (Chemí, Colombia). Para la limpieza de los precipitados se utilizó H_2O_2 al 30% (Chemí, Colombia), y para la extracción secuencial se usaron los reactivos EDTA, HCl 37% (v/v) (Merck, Alemania), y HNO_3 65% (v/v) (Merck, Alemania).

2.2.2 Selección de aislados

Para la selección de los microorganismos, se partió de un conjunto de 37 aislados bacterianos obtenidos en fincas agrícolas en Santander, Colombia entre 2019 y 2021. Estos aislados ya habían sido caracterizados en trabajos previos dentro del grupo de investigación, tanto macroscópicamente (morfología de colonia), como microscópicamente (tinción de Gram), y se tenía conocimiento previo de la actividad de la enzima ureasa de cada aislado (cualitativa y cuantitativamente). Adicionalmente, en estos trabajos se había realizado previamente una derreplicación molecular a través del análisis de polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP) de las regiones V4-V5 del gen 16S *rRNA* , y a partir de los perfiles obtenidos se secuenció el gen 16S *rRNA* para algunos de los aislados (Diez-Marulanda & Brandão, 2023; Adarme-Duran et al., 2024). La información obtenida de estos trabajos previos se encuentra en el Anexo 1, **Tabla A-1**. La reactivación de los

aislados preservados en glicerol se realizó inoculando cada uno en un medio de cultivo líquido suplementado con Triptosa (5 g L^{-1}), peptona de carne (10 g L^{-1}), urea (20 g L^{-1}), y NaCl (5 g L^{-1}), y fueron dejados en agitación constante (120 rpm) a 30 °C por 12 h. Estos cultivos fueron sembrados en un medio sólido con la misma composición y agar (15 g L^{-1}) para verificar que no tuvieran contaminación.

Los criterios de selección de los aislados se basaron en dos factores principales: 1) la actividad ureolítica cuantitativa en presencia de Pb(II) a través de la cuantificación de amonio (NH_4^+) producido por cada aislado, y 2) la capacidad de remoción del metal en solución acuosa. Para este ensayo se partió de un pre-inóculo de cada aislado dejado la noche anterior en el medio de crecimiento base sin presencia del metal (**Tabla 2-1**).El día del ensayo los inóculos fueron ajustados a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,35, y se realizó la inoculación al 1% en el medio M10 suplementado con Pb(II) 70 mg L^{-1} y Ca(II) 400 mg L^{-1} (**Tabla 2-1**). El ensayo se realizó por triplicado en tubos de centrífuga de 50 mL estériles con un volumen de medio de 10 mL, y éstos fueron incubados a 30 °C y 120 rpm por 72 h. Las condiciones de inoculación y cultivo se mantuvieron iguales para los ensayos, a menos de que se especifique algo distinto en la metodología. Al cabo de este tiempo se centrifugaron los tubos a 8500 rpm por 15 minutos para obtener el sobrenadante, se tomaron 5 mL para determinar el pH final con un potenciómetro (pH 510 Series Meter, Oakton), y el volumen restante se utilizó para la cuantificación de NH_4^+ y Pb(II) remanente en solución.

Para la cuantificación de NH_4^+ se utilizó la reacción de Berthelot en la cual el NH_4^+ presente reacciona con salicilato, hipoclorito de sodio, y nitroprusiato de sodio para la producción del compuesto coloreado indofenol y su posterior cuantificación por espectrofotometría a través de la interpolación en una curva de calibración (Verdouw et al., 1978; Yu et al., 2021). Cada muestra fue diluida con agua desionizada antes de la reacción, de forma que su absorbancia entrara dentro de la curva de calibración y no hubiera interferencias en la cuantificación.

La remoción de Pb(II) se determinó a través de la cuantificación del metal remanente en el medio usando Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (F-AAS) (contrAA700, Analytik Jena). Las muestras fueron diluidas con HNO_3 al 2% (v/v) para poder interpolar la absorbancia en la curva de calibración correspondiente. El porcentaje de remoción se

calculó teniendo en cuenta la concentración del metal en el blanco de medio (C_{blanco}) y en el sobrenadante final de cada aislado (C_{final}), de acuerdo con la **Ecuación 2.1**:

$$\%\, remoción = \frac{C_{blanco} - C_{final}}{C_{blanco}} \times 100 \qquad \text{(Ecuación 2.1)}$$

2.2.3 Caracterización de precipitados

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de remoción se seleccionaron 3 aislados cuyas actividades ureolíticas se encontraban entre las más altas y con mayores porcentajes de remoción: *Serratia* sp. 89b, *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp 92g2. Para caracterizar los precipitados obtenidos con cada uno de los aislados se siguió la metodología de inoculación y cultivo de la **sección 2.2.2** exceptuando el tiempo de cultivo, el cual fue de 2 semanas. La modificación en el tiempo de cultivo se realizó teniendo en cuenta ensayos preliminares en los que se determinó que luego de 72 h no se obtiene una cantidad suficiente de precipitados para realizar la caracterización correspondiente (datos no mostrados). Adicionalmente, se colocaron 6 réplicas por cada aislado para obtener una mayor cantidad de precipitados.

Después de 2 semanas se centrifugaron los tubos a 8500 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Se adicionaron 15 mL de agua desionizada para resuspender el pellet, se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante, y se repitió el lavado una vez más. Posteriormente se adicionaron 15 mL de agua desionizada en cada tubo y se colocaron en baño María por 30 minutos para facilitar la remoción de biomasa de los precipitados, para después dejarlos en reposo por 5 minutos (Diez-Marulanda & Brandão, 2024; Montoya et al., 2005). Con ayuda de una micropipeta se retiró el líquido de cada tubo, cuidando que no se retiraran los sólidos sedimentados, sino solamente el líquido con biomasa aún suspendida. Luego del primer lavado se juntaron las 6 réplicas de cada aislado resuspendiendo la biomasa restante y precipitados en agua desionizada hasta llegar a un volumen final de 10 mL. Estos tubos fueron colocados en un microondas a 700 W en 2 ciclos de 30 segundos cada uno, y se dejó reposando 5 minutos para luego retirar el líquido sin tomar la fase sedimentada. Este lavado se repitió 4 veces hasta observar que ya no había turbidez en el líquido luego de dejar sedimentar el sistema.

Los precipitados se filtraron al vacío haciendo lavados con agua desionizada y el sólido recolectado se dejó secando por 24 h a 50 °C en cajas de Petri. Posteriormente se adicionaron 10 mL de una solución de H_2O_2 al 10% (v/v) pH 8, y se dejaron las cajas cerradas en agitación constante (160 rpm) por una semana para completar la remoción de biomasa de los precipitados (Falster et al., 2018; Zhang et al., 2020c). Al cabo de una semana se retiró el líquido de cada caja, se hicieron 3 lavados con 10 mL de agua desionizada, y se dejaron secando por 72 h a 50 °C. La mitad del precipitado obtenido con cada aislado se maceró en un mortero de ágata y se llevó para análisis por difracción de rayos X (DRX) (X-pert PRO Difractometer, PANalytical, Holanda) y espectroscopía infrarroja (IR) (Nicolet iS10 Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), mientras que el sólido restante se usó para el análisis de la morfología de los precipitados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (VEGA3, TESCAN- XFlash 410, Bruker, República Checa), así como también para el análisis elemental de estos mediante espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) haciendo uso del detector XFlash 410 (Bruker, Alemania). El análisis por DRX se realizó bajo radiación CuKα (λ = 1,54 Å), con un barrido de 10 a 80° (2θ), y la identificación por DRX se hizo usando el software HighScore Plus versión 3.0.5 (PANalytical, 2012, Almelo, Holanda) por comparación con los patrones de difracción reportados en la base de datos ICSD (Zagorac et al., 2019).

2.2.4 Mecanismos de remoción de Pb(II) en solución

Con los aislados seleccionados se realizó un ensayo en un medio suplementado con Pb(II) pero sin los componentes para la precipitación de carbonatos (M11, **Tabla 2-1**), para determinar si había remoción del metal en solución acuosa por otros mecanismos. Para este ensayo se partió de un pre-inóculo *overnight* de cada aislado en el medio de cultivo sin metal M1, y el día siguiente fueron inoculados al 1% en 10 mL de medio M11 en tubos de centrífuga de 50 mL. El OD_{600} se ajustó a 0,35 y se colocaron 3 réplicas por aislado. Al cabo de 72 h se centrifugaron los tubos y con el sobrenadante se midió pH y se cuantificó el metal remanente en solución (ver **sección 2.2.2**).

Para determinar el porcentaje de remoción de Pb(II) mediante precipitación de carbonatos se propuso un protocolo de extracción secuencial del metal que permitiera caracterizar su presencia en distintas fracciones dentro del sistema (Mirimanoff & Wilkinson, 2000; Sheng et al., 2022; Zhang et al., 2020b). Para esto se establecieron 5 fracciones como se muestra

en el **Figura 2-1**. La primera fracción (F1) corresponde al metal que no está dentro del porcentaje de remoción (Pb remanente), la segunda fracción (F2) hace referencia al metal que fue adsorbido sobre las células bacterianas o biomasa (Pb biosorbido), la fracción 3 (F3) corresponde al metal que fue adsorbido sobre la matriz de carbonatos precipitados en el sistema (Pb adsorbido), mientras que en la cuarta fracción (F4) se tiene en cuenta el metal que fue precipitado o co-precipitado como carbonato (Pb precipitado), y finalmente en la quinta fracción (F5) se encuentra el metal que fue acumulado al interior de las células bacterianas (Pb bioacumulado).

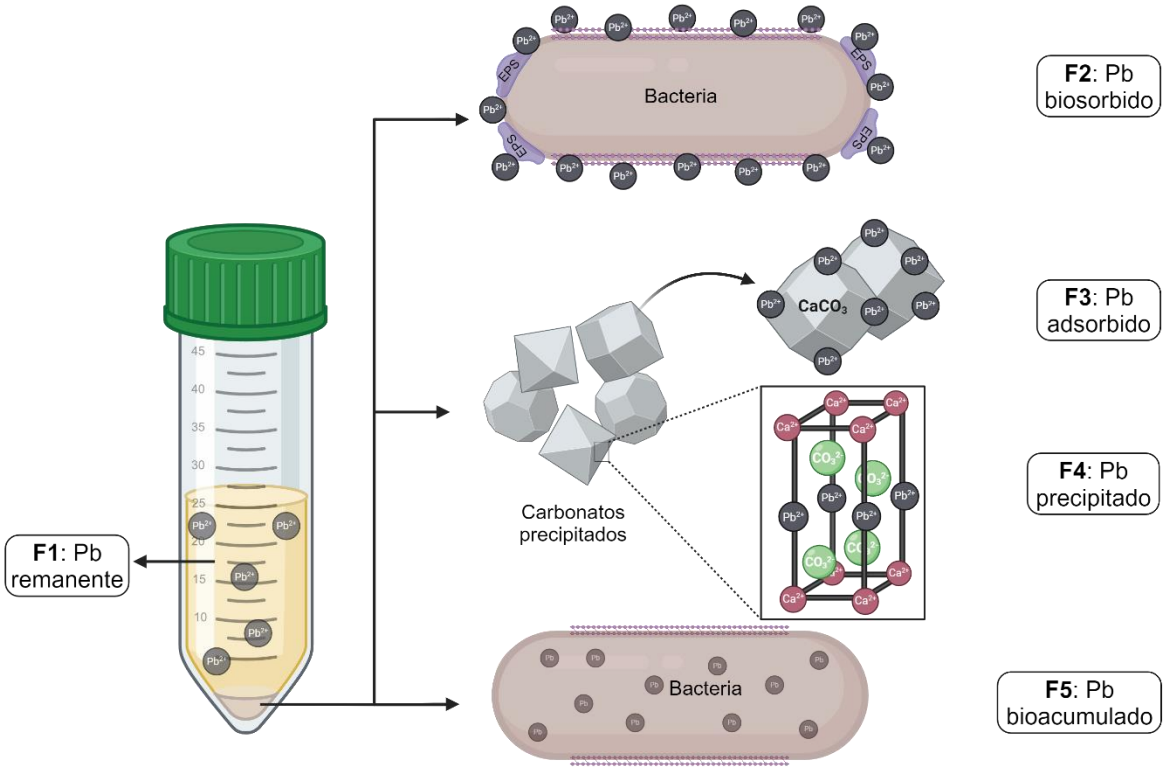

Figura 2-1. Fracciones de Pb(II) en el sistema estudiado. EPS, exopolisacáridos.

En este ensayo se realizó la incubación de las muestras por 2 semanas para poder caracterizar mejor la fracción de precipitados, de acuerdo con lo establecido en la **sección 2.2.3**. Se colocaron 8 réplicas en paralelo para cada aislado repartidas en 2 grupos, de las cuales se tomaron 4 para la extracción de las fracciones F1, F2, F4 Y F5 (grupo 1), y se tomaron otras 4 para extraer la fracción F3 (grupo 2).

El protocolo de extracción de cada fracción para las muestras del grupo 1 se muestra a continuación:

F1 (Pb remanente): El contenido de cada tubo de 50 mL (tubo A) fue homogeneizado suavemente usando un vórtex y se transfirió a tubos de 15 mL (tubo B). Se centrifugaron las muestras a 8500 rpm por 15 minutos y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo de 15 mL (previamente pesado) después de pasar por un filtro de poliamida de 0,2 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania) usando portafiltros Swinnex, 13 mm (Merck Millipore, Alemania), y fue rotulado como F1. Se adicionaron 2 mL de agua desionizada al tubo de centrífuga original (tubo A) para lavar las paredes, y este volumen fue transferido al tubo de 15 mL que contenía el pellet resultante (tubo B). Utilizando un asa redonda desechable se resuspendió cuidadosamente el pellet de cada tubo, y se lavó el asa con 1 mL de agua desionizada para un volumen final de lavado de 3 mL. Se centrifugaron los tubos bajo las mismas condiciones anteriores, se desechó el sobrenadante, y el lavado se repitió una vez más. Las condiciones de centrifugación para el protocolo de extracción de las demás fracciones fueron iguales, a menos de que se especifique lo contrario.

F2 (Pb biosorbido): Se adicionó 1 mL de una solución de EDTA 20 mM pH 7 en cada tubo A para lavar las paredes, y este volumen fue transferido al correspondiente tubo B para resuspender el pellet con el asa. El lavado del asa se hizo con 1 mL de la misma solución de EDTA para tener un volumen final de 2 mL, y el pellet resuspendido se dejó en contacto con la solución por 30 segundos. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue transferido a un tubo de 15 mL rotulado como F2, previamente pesado. Cada sobrenadante fue filtrado usando el mismo filtro que en la extracción de F1. Se hicieron 2 lavados con agua desionizada siguiendo la misma metodología que para F1, con la excepción de que el sobrenadante de cada lavado no fue descartado, sino que fueron adicionados al tubo correspondiente rotulado como F2 (Zhang et al., 2020b).

F4 (Pb precipitado): Se adicionaron 2 mL de una solución de HCl 1,2 M en cada tubo A para lavar las paredes, y este volumen fue transferido al correspondiente tubo B para resuspender el pellet. La muestra se dejó en contacto con la solución de HCl 1,2 M hasta que no se observara más burbujeo, producto de la disolución de los precipitados (aproximadamente 2 minutos), y no se utilizó el asa ya que la solución permite la resuspensión total del pellet. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante fue

transferido a un tubo de 15 mL rotulado como F4, previamente pesado. Cada sobrenadante fue filtrado usando el mismo filtro que en las anteriores extracciones. Igual que en la metodología anterior, se hicieron 2 lavados con agua desionizada, que fueron adicionados al tubo correspondiente rotulado como F4 (Sheng et al., 2022).

F5 (Pb bioacumulado): El contenido de cada tubo B fue transferido a un tubo plástico de digestión previamente pesado y rotulado como F5, usando 4 mL de agua regia ($HCl:HNO_3$ 3:1) para la transferencia y lavado del filtro. Cada tubo se colocó en un bloque digestor (DigiPREP Jr, SCP Science) a 120 °C por 60 minutos para digerir por completo la biomasa (Zhang et al., 2020b).

F3 (Pb adsorbido): Con las 4 réplicas restantes de cada aislado se realizó la extracción de F3 partiendo de la metodología descrita en la **sección 2.2.3** para la recuperación de los precipitados, incluyendo el tratamiento térmico y el tratamiento posterior con H_2O_2 10% (v/v) pH 8. En este caso, las réplicas no fueron transferidas a otro tubo ni fueron mezcladas, sino que se mantuvieron como réplicas individuales por cada aislado evaluado. Una vez se obtuvieron los precipitados secos luego de los tratamientos mencionados anteriormente, se adicionaron 2 mL de EDTA 20 mM pH 7 a cada tubo, se homogeneizó suavemente cada muestra con un vórtex, y se dejaron en contacto por 30 segundos. Posteriormente se centrifugaron las muestras y con ayuda de una micropipeta se transfirió el sobrenadante de EDTA a tubos de 15 mL previamente pesados y rotulados como F3. Se hicieron 2 lavados con agua desionizada de igual forma que para las fracciones anteriormente descritas con la diferencia de que los sobrenadantes recolectados no fueron filtrados.

Para cada fracción se dejó un blanco de reactivos sin la muestra. Las muestras fueron acidificadas con 100 µL de una solución de HNO_3 2% (v/v) y llevadas a una masa final usando agua desionizada, a excepción de F1, que solamente se midió la masa final sin adicionar agua. El pH final con cada muestra se midió a partir del sobrenadante ya pesado obtenido para F1. La cuantificación de Pb(II) se realizó usando Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (F-AAS) (contrAA700, Analytik Jena), y las muestras fueron diluidas con HNO_3 al 2% (v/v) para poder interpolar la absorbancia en la curva de calibración correspondiente. El porcentaje de recuperación del fraccionamiento se tomó

como la suma de los porcentajes de cada fracción, y se mantuvo en el rango de 90-100% para todos los casos.

Puesto que la cuantificación de F2 (Pb biosorbido) incluye el metal que puede ser extraído con EDTA de la matriz de precipitados, y no solamente el metal extraído de la pared celular de las bacterias, se utilizó el valor obtenido para F3 como una corrección de dicha fracción. Esta corrección se hizo teniendo en cuenta que la extracción de F3 se realizó sobre muestras que pasaron por un tratamiento extenso de limpieza para eliminar la biomasa y dejar solamente los precipitados, de forma que lo extraído con EDTA proviene de la matriz de carbonatos y no de las células bacterianas.

Este mismo protocolo se repitió para uno de los aislados seleccionados (*Serratia* sp. 5b) en 3 medios de cultivo adicionales (M15, M16 y M18, **Tabla 2-1**), con el fin de estudiar el efecto que pueden tener diferentes componentes del medio sobre las fracciones del metal en el sistema. En este caso se utilizó un medio de cultivo sin Ca(II) añadido (M15), un medio con mayor cantidad de Ca(II) con respecto al medio original (M16), y un medio con mayor cantidad de urea con respecto al medio original (M18). Adicionalmente, se realizó una inoculación en el medio de cultivo original (M10) con un inóculo de mayor densidad óptica (OD_{600} 1,2) para evaluar el efecto de la cantidad de células presentes en el sistema. En este caso se hizo la extracción de las fracciones F1 (remanente), F2 (biosorbido), F4 (precipitado) y F5 (bioacumulado), sin la corrección dada por F3 (adsorbido) puesto que no en todos los medios de cultivo evaluados se lograron recuperar precipitados.

2.2.5 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el promedio de las réplicas, y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Se hizo una comparación a nivel de cada fracción entre los 3 aislados, así como entre las fracciones obtenidas con diferentes medios de cultivo a través de un análisis de varianza (ONE-WAY ANOVA) y usando la prueba de comparación múltiple de Tukey, tomando como significativo un p-valor <0,05. Todos los análisis se hicieron con el software GraphPad Prism versión 10.3.1 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Selección de aislados bacterianos que inmovilizan Pb(II) en solución

Se tomó como punto de partida una colección de microorganismos aislados de fincas cacaoteras de Santander, Colombia, entre 2019 y 2021. Estos microorganismos fueron caracterizados en trabajos previos (ver **sección 2.2.2**), y los resultados de la caracterización e identificación se resumen en la **Tabla A-1** (**Anexo 1**).

Se determinó la actividad ureolítica de 37 aislados bacterianos en presencia de Pb(II) luego de 72 h de exposición, y los resultados se encuentran en la **Figura 2-2**. De los 37 aislados evaluados, sólo el aislado 91d no creció en las primeras 24 h, y presentó turbidez en el medio después de pasadas 48 h del ensayo. De acuerdo con los resultados obtenidos se clasificaron los aislados en 3 grupos según la actividad ureolítica dada la concentración de iones NH_4^+ producida (baja, media, y alta). De estos aislados, 29 presentaron una baja producción de amonio, menor a 0,5 µmol mL^{-1} h^{-1}, lo que podría atribuirse al efecto adverso de los cationes Pb(II) por su unión a grupos catalíticamente activos de enzimas como la ureasa, o la competencia con los iones metálicos que son necesarios para la actividad catalítica, causando así una disminución en su actividad (Xie et al., 2024). Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran, por ejemplo, los aislados 91h o 92h2 del género *Bacillus*, los aislados 95d o 101a del género *Citrobacter*, el aislado 67p del género *Delftia*, el aislado 76b o 76c2 del género *Klebsiella*, los aislados 67r, 91d o 67l del género *Pseudomonas*, y los aislados 67q o 67w del género *Stenotrophomonas*.

El pH final obtenido con cada aislado también se observa en la **Figura 2-2**. Entre los aislados con baja actividad se encontraron dos comportamientos principales. Por una parte, pese a no mostrar una actividad ureolítica tan alta, 17 aislados lograron ocasionar un aumento en el pH del medio con respecto al pH inicial (6,7-6,8), obteniendo valores entre 7,00 y 7,55. Por otra parte, los 12 aislados restantes provocaron una disminución del pH entre 5,16 y 6,55. Esta última tendencia puede atribuirse a un proceso fermentativo de la glucosa presente en el medio de cultivo. Los aislados que mostraron este comportamiento pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Citrobacter*, conocidos

por ser buenos fermentadores y producir ácidos como resultado de la fermentación (Brink et al., 2020; Mangayil et al., 2011; Sun et al., 2023; Zhou et al., 2013). El proceso fermentativo que tuvo lugar puede deberse a una posible disminución en la disponibilidad de oxígeno en los tubos de cultivo, ya que la biomasa se sedimentó parcialmente con las condiciones de agitación moderada utilizadas.

Entre los aislados de actividad media, con una producción de NH_4^+ entre 0,5 y 1,0 µmol mL^{-1} h^{-1}, se encuentran los aislados 63c, 85j y 96q del género *Pseudomonas*, el aislado 67p del género *Delftia,* y el aislado 92g2 del género *Bacillus* (**Figura 2-2**). Con estos aislados se obtuvo un pH final mayor que con los aislados de menor actividad ureolítica, entre 7,91 y 9,49, dado un mayor grado de hidrólisis de urea. De igual forma, los aislados 5b, 58b y 89b del género *Serratia*, que presentaron la mayor actividad ureolítica con una producción de NH_4^+ entre 1,2 y 2,03 µmol mL^{-1} h^{-1}, también ocasionaron un aumento en el pH con valores entre 8,96 y 9,49 (**Figura 2-2**).

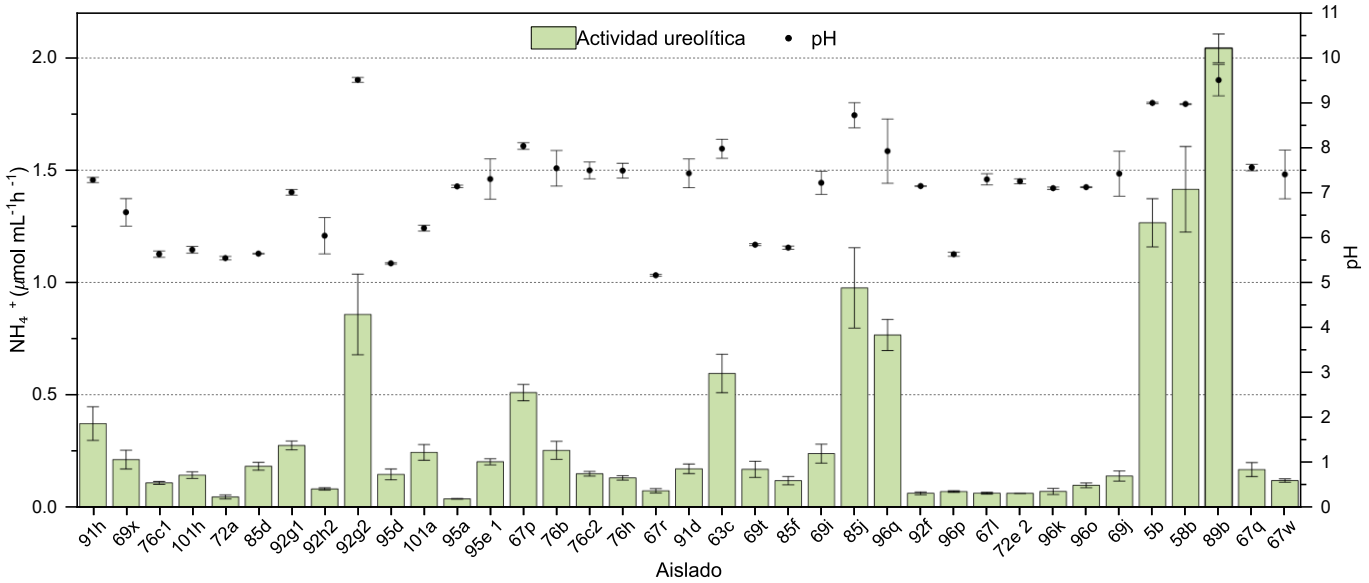

Figura 2-2.. Producción de amonio y valores de pH obtenidos con cada aislado luego de 72 h en medio líquido suplementado con 70 mg L^{-1} de Pb(II). El valor inicial de pH del medio utilizado fue 6,7 - 6,8.

Como era de esperarse, según los valores de actividad enzimática y pH, los aislados 5b, 58b y 89b fueron capaces de eliminar entre el 96,9 y el 99,3% de Pb(II) en el medio, y en

general, los aislados con baja actividad ureasa presentaron escasos porcentajes de remoción de Pb(II), con valores entre 0,93 y 23,01%, como se muestra en la **Figura 2-3**. Sin embargo, dentro de este último grupo, los aislados *Stenotrophomonas* sp. 67q y 67w lograron remover 80,6 y 47,1% del Pb(II) en solución respectivamente, lo cual da indicios de la presencia de otros mecanismos de inmovilización de este metal, que ya han sido previamente reportados, como la biosorción en la pared celular atribuida a la interacción con grupos funcionales como hidroxilo (-OH), amino (-NH_2) y carboxilo (-COOH) (Sim & Ting, 2017; Sun et al., 2021). Por último, entre los aislados con actividad media se destacaron *Bacillus* sp. 92g2 y *Pseudomonas* sp. 85j, que presentaron remociones de 76,9 y 87,3% respectivamente, lo cual muestra que a una menor actividad ureolítica también se pueden obtener valores altos de remoción de Pb(II) en solución.

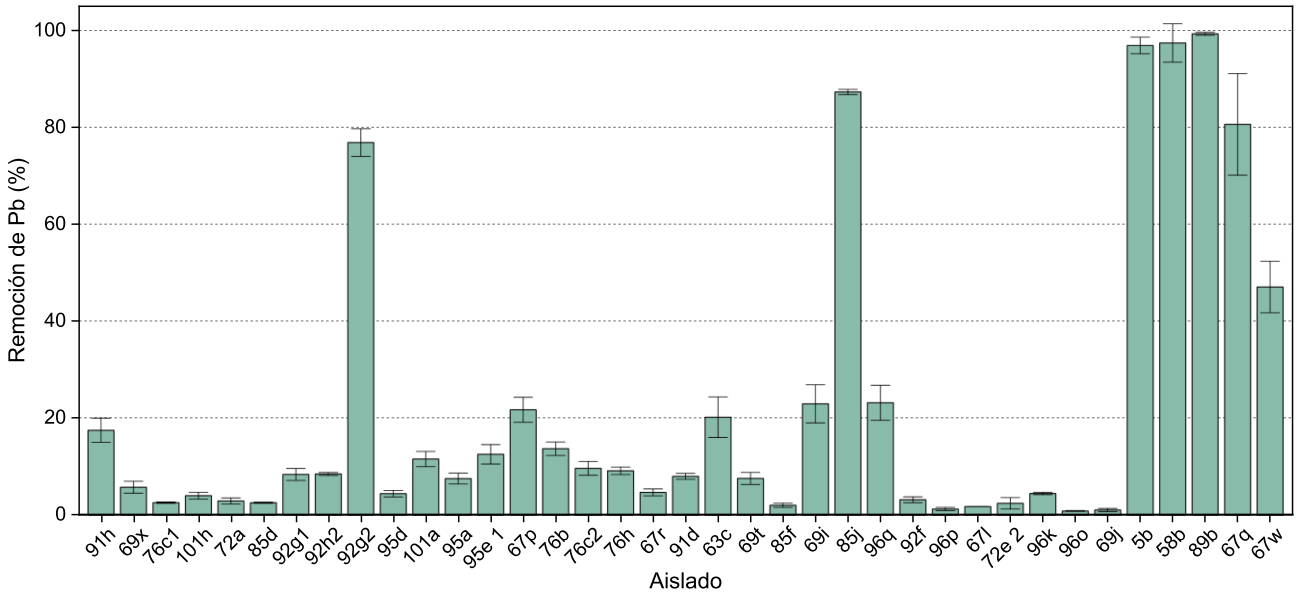

Figura 2-3. Remoción de Pb(II) obtenida con cada aislado evaluado luego de 72 h en medio líquido suplementado con 70 mg L^{-1} de Pb(II).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron 3 aislados para continuar con los ensayos de mecanismos de remoción de Pb(II). En primer lugar, se seleccionó el aislado *Serratia* sp. 89b que presentó la mayor actividad ureolítica y el mayor porcentaje de remoción para Pb(II) en solución. De igual forma se seleccionó el aislado *Serratia* sp. 5b, cuya actividad ureolítica y porcentaje de remoción también se encuentra entre los 3 más altos y que, adicionalmente, por trabajos previos se conoce su tolerancia y capacidad

de remoción de Cd(II) en solución, lo cual representa una característica de interés para remediación de múltiples metales (Diez-Marulanda & Brandão, 2024). Por último, se seleccionó el aislado *Bacillus* sp. 92g2 puesto que, no solo presentó un buen porcentaje de remoción y actividad ureolítica, sino que también resulta de interés para estudiar otros mecanismos de interacción y remoción de Pb(II), ya que corresponde a un género diferente a los otros 2 aislados seleccionados y difiere en la composición de su pared celular al ser una bacteria Gram-positiva.

2.3.2 Análisis de precipitados

- Análisis por espectroscopía de infrarrojo

Se recuperaron los precipitados producidos por los tres aislados seleccionados, *Serratia* sp. 89b, *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2, y su morfología y composición fueron analizadas como parte del estudio de la precipitación de carbonatos mediado por estas bacterias. La presencia de distintos grupos funcionales fue observada usando espectroscopía de infrarrojo, y la **Figura 2-4** muestra los espectros obtenidos. La banda vertical azul muestra una señal en la región de 3414-3437 cm^{-1} donde se dan estiramientos de enlaces -OH y -NH, lo que da indicios de la presencia de grupos hidroxilo o amino en los tres precipitados bacterianos. Esta señal de -OH puede corresponder a la presencia de agua en los precipitados (Rodriguez-Blanco et al., 2011), aunque también puede provenir de aminoácidos o carbohidratos con grupos -OH y -NH (Zhang et al., 2020). La presencia de estos grupos en este caso podría indicar que el proceso de limpieza de precipitados no fue 100% efectivo para remover toda la biomasa o los exopolisacáridos. Por otra parte, la banda verde en la región entre 2923-2930 cm^{-1} muestra igualmente señales para los tres aislados, que pueden asignarse a vibraciones -CH del grupo alquil, también proveniente de la biomasa (Oliveira et al., 2014). La banda de color rojo muestra una señal típica de estiramiento asimétrico de carbonatos, y puede observarse que, mientras para el espectro de calcita y $CaCO_3$ hay una sola señal, para los precipitados de los aislados del género *Serratia* hay una partición de esta señal en dos picos, 1411 y 1482 cm^{-1} para *Serratia* sp. 89b, y 1405 y 1474 cm^{-1} para *Serratia* sp. 5b, y la señal en 1410 cm^{-1} en el espectro de *Bacillus* sp. 92g2 presenta un hombro. Esta partición se ha reportado en el espectro de infrarrojo de $CaCO_3$ amorfo como una señal característica para diferenciarlo de otros polimorfos como la calcita (Cai et al., 2010; Rodriguez-Blanco et al., 2011). Las bandas de color gris muestran otras señales menos intensas asociadas a carbonatos, tales como

vibraciones de carbonatos (CO_3^{2-}) (2511-2517 cm^{-1}), o estiramiento simétrico de carbonato (1072-1086 cm^{-1}) (Cai et al., 2010; Zeng et al., 2022). En la región entre 500 y 1000 cm^{-1} se observan dos señales comunes entre los precipitados y la calcita. Alrededor de 870 cm^{-1} y se observa una banda que puede ser asociada con una flexión de carbonato fuera del plano (Cai et al., 2010), mientras que la señal de vibración simétrica de carbonato, que aparece entre 711 y 712 cm^{-1} para el espectro de calcita y *Bacillus* sp. 92g2, se corre un poco hacia 745 cm^{-1} para los precipitados del género *Serratia*. Esta última señal de flexión de carbonatos se ve más intensa cuando se tiene calcita presente, e incluso se ha reportado como inexistente en carbonatos amorfos (Cai et al., 2010; Rodriguez-Blanco et al., 2011). Por último, en los espectros de calcita y *Bacillus* sp. 92g2 se ve una señal en 1795 y 1798 cm^{-1} respectivamente, asignada a una vibración de carbonatos propia de calcita (Zeng et al., 2022). Lo anterior muestra que, aunque los precipitados bacterianos presenten señales reportadas para carbonato amorfo como el estiramiento cerca a los 1410 cm^{-1}, también comparten señales características de calcita, sugiriendo así que en los precipitados puede haber una mezcla de polimorfos de $CaCO_3$ y carbonato amorfo.

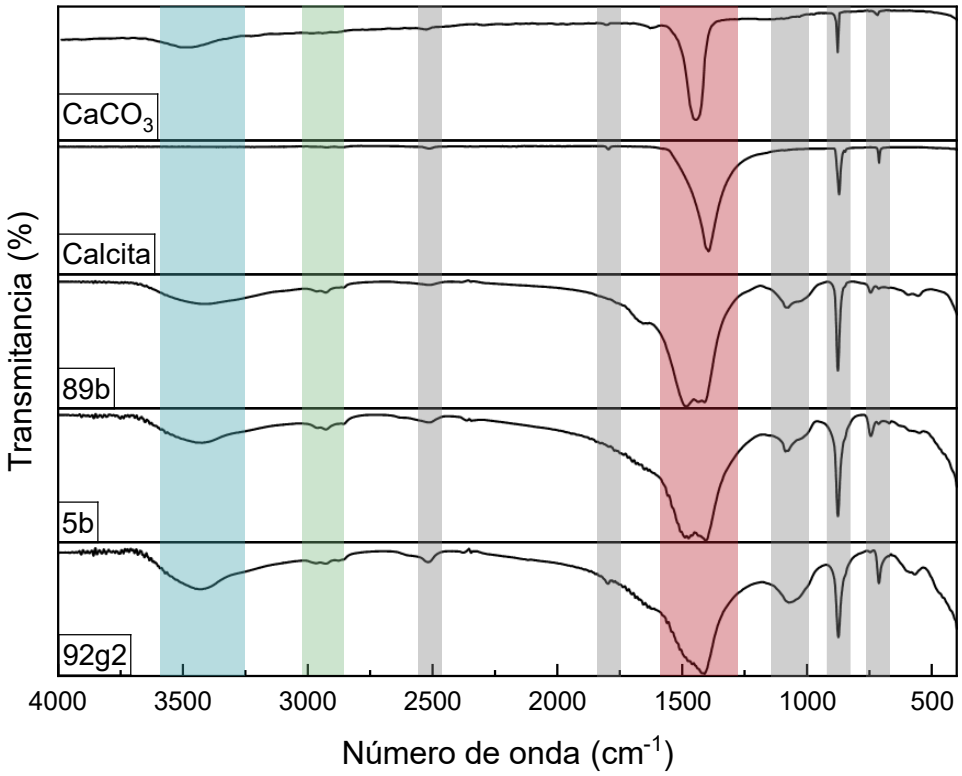

Figura 2-4. Espectros de infrarrojo para los precipitados obtenidos de *Serratia* sp. 89b, *Serratia* sp. 5b, y *Bacillus* sp. 92g2. Los espectros de $CaCO_3$ (Coblentz Society Inc, s/f) y calcita (Lafuente et al., 2015) se colocan como referencia para fines de comparación.

- Análisis por difracción de rayos X

La identidad de los precipitados bacterianos fue obtenida a través de la comparación de los difractogramas obtenidos con difractogramas de patrones reportados en bases de datos (**Anexo B, Tabla B-1)**. El difractograma del precipitado de *Bacillus* sp. 92g2 mostrado en la **Figura 2-5** fue identificado como calcita dada la similitud con el patrón de calcita en los picos principales en la posición 2θ de 23°, 29°, 36°, 39°, 43°, 47° y 48°. Este resultado confirma el análisis realizado por espectroscopía de infrarrojo, en el que se tenían señales correspondientes a calcita. Por otra parte, los difractogramas de los precipitados de *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b comparten 6 picos alrededor de la posición 2θ 25°, 27°, 32°, 43° y 49°, los cuales coinciden con el patrón de vaterita. Adicionalmente, estos dos difractogramas también presentan la señal característica de calcita alrededor de 29°, y el difractograma de *Serratia* sp. 89b tiene otras señales compartidas con la calcita en 23°, 36°, y 39°. Estos resultados confirman que los 3 aislados bacterianos son capaces de precipitar carbonatos, y que éstos se encuentran mayoritariamente como el polimorfo vaterita para el caso de *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, y como calcita para *Bacillus* sp. 92g2. Es importante resaltar que las señales compartidas con ambos polimorfos sugieren la presencia de una mezcla en el precipitado, y los porcentajes de coincidencia de los precipitados del género *Serratia* fueron menores al 62% (**Tabla B-1**). También es importante tener en cuenta que el tratamiento térmico realizado sobre los precipitados puede influir en polimorfo predominante dado que a mayores temperaturas se puede dar la transformación del carbonato amorfo a un polimorfo como calcita (Chong et al., 2014). Por último, los difractogramas de los 3 precipitados analizados fueron identificados como $CaCO_3$ y no $PbCO_3$, contrario a lo reportado por algunos autores para el proceso MICP con Pb(II) (Zhang et al., 2020b). Esto se debe principalmente a que hay 5,7 veces más Ca(II) que Pb(II) en el medio de cultivo usado (ver **Tabla 2-1**), con el fin de favorecer un proceso de coprecipitación con Pb(II) a través de una precipitación más rápida de $CaCO_3$ (Khadim et al., 2019). Este comportamiento se ha reportado también para otros cationes metálicos divalentes, en donde en presencia de Ca(II) no se reportan cationes metálicos diferentes a $CaCO_3$ (Cuaxinque-Flores et al., 2020).

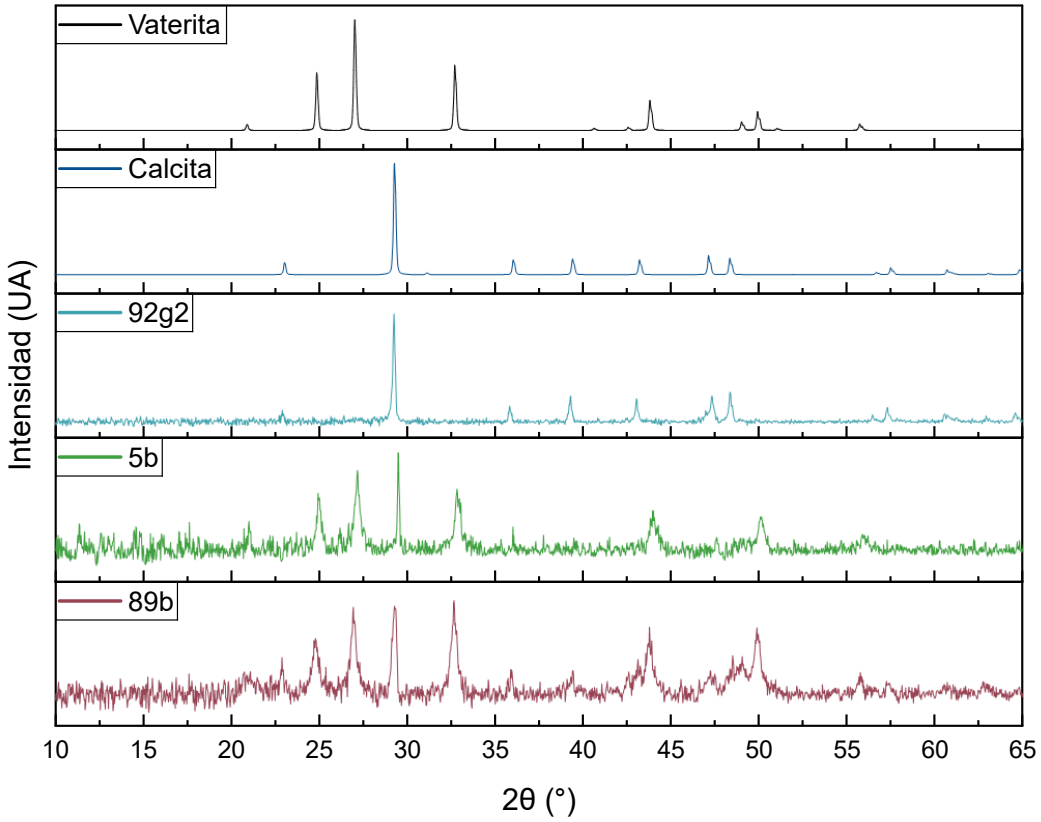

Figura 2-5. Difractogramas obtenidos para los precipitados obtenidos de *Serratia* sp. 89b, *Serratia* sp. 5b, y *Bacillus* sp. 92g2. Los espectros de calcita y vaterita fueron tomados de la base de datos ICSD (Zagorac et al., 2019), y corresponden a los patrones con mayor porcentaje de coincidencia para los precipitados bacterianos.

- <u>Análisis por SEM-EDX</u>

  Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido permitieron observar dos principales morfologías de los precipitados, diferenciadas por el género correspondiente al aislado. Por un lado, los precipitados de los aislados de *Serratia* presentan apilamientos por capas de microcristales planos de cara lisa, que forman estructuras más grandes con formas piramidales (**Figura 2-6 A-B, D-E**). Estas estructuras piramidales han sido reportadas también para el proceso de precipitación de carbonatos mediado por la bacteria *Sporosarcina luteola* (Cuaxinque-Flores et al., 2020). Por otra parte, en el precipitado de *Bacillus* sp. 92g2 se observan estructuras más pequeñas (2 µm) y en su mayoría esféricas, a

excepción de algunos microcristales romboédricos que se encuentran entre las esferas (**Figura 2-6 G**). La mayoría de los reportes sobre la morfología de vaterita muestran formas esféricas, mientras que para la calcita se reportan formas romboédricas, como se observa en las imágenes de *Bacillus* sp. 92g2 (Chong et al., 2014). Sin embargo, se han reportado morfologías de crecimiento por capas para vaterita (Trushina et al., 2014), así como la coexistencia de varios polimorfos en un precipitado (Rodriguez-Blanco et al., 2011), y la aparición de diferentes morfologías debida al efecto de las células bacterianas y la presencia de exopolisacáridos durante la nucleación, ya que éstos pueden modificar las estructuras uniendo grupos de microcristales (Azulay et al., 2018). La **Figura 2-6 H** muestra agujeros distribuidos a lo largo del precipitado y en cercanía a las estructuras esféricas, lo que posiblemente corresponde al espacio antes ocupado por las células bacterianas en forma de bacilo que fueron removidas después del tratamiento de limpieza de los precipitados. Esto da indicios de la formación de los microcristales alrededor de las células, que sirven como sitios de nucleación (Xue et al., 2022; Zhang et al., 2020). Para el precipitado de *Serratia* sp. 5b se encontró también la impresión dejada por varias células bacterianas sobre estructuras más amorfas (**Anexo C**).

Por último, el análisis elemental por EDX muestra en los tres casos la presencia de Ca, C y O, lo cual se espera dada la composición del $CaCO_3$ (**Figura 2-6 C, F, I**). Se confirmó la presencia de Pb con una señal baja en el caso de los tres precipitados, siendo esta señal mucho menor en comparación con Ca. Lo anterior había sido evidenciado con los análisis de IR y DRX, los cuales mostraron señales propias de $CaCO_3$ pero no de $PbCO_3$ o precipitados de Pb. Esto puede deberse a que hay una proporción mayor de Ca(II) en el medio de cultivo, y también a que el Pb(II) podría estar siendo removido de la solución a través de otros mecanismos como la biosorción o bioacumulación en la materia orgánica, la cual fue removida a través de un proceso de limpieza de los precipitados (Yan et al., 2021).

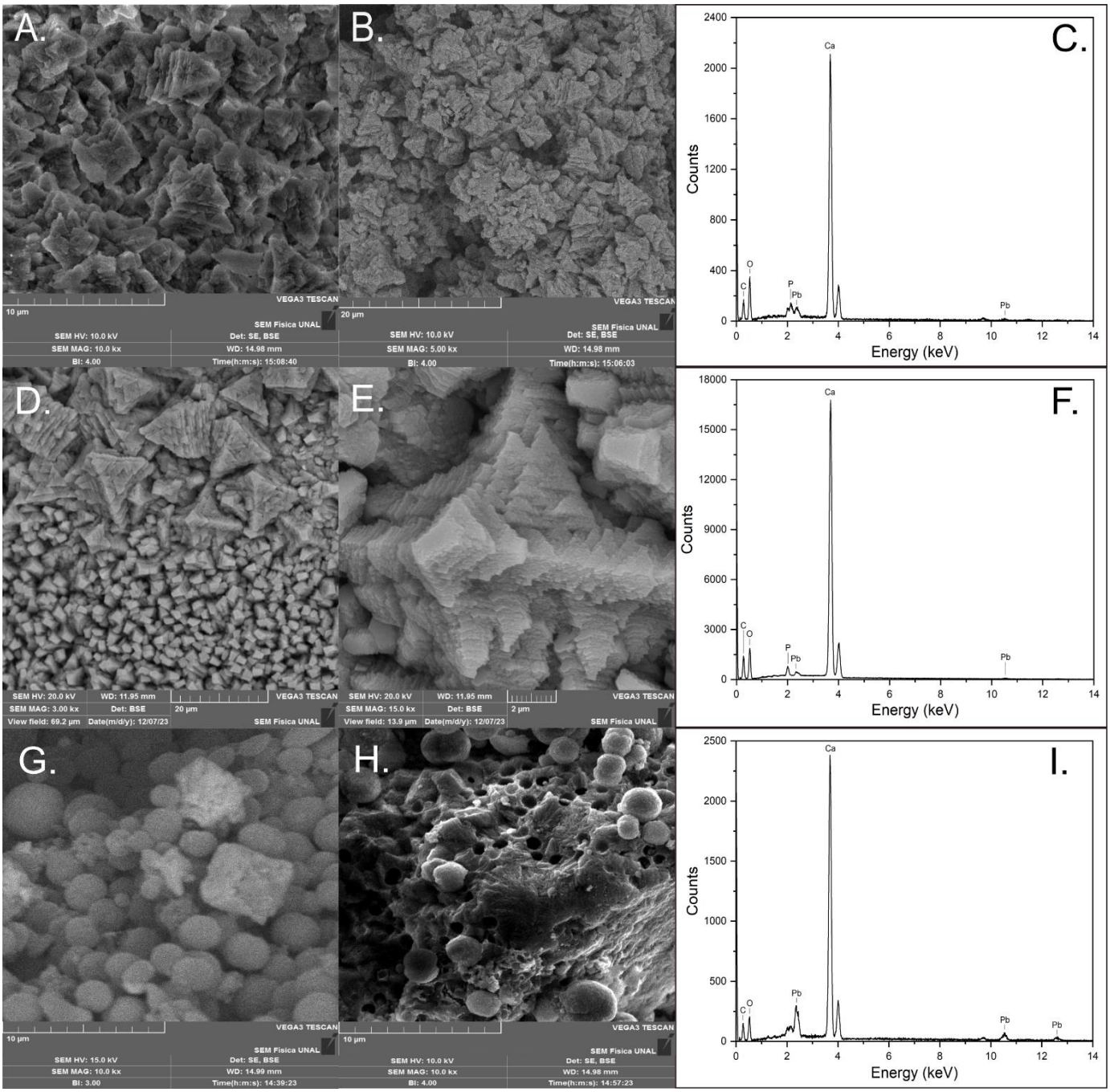

Figura 2-6. Micrografías de SEM de los precipitados producidos por *Serratia* sp. 89b (A-B), *Serratia* sp. 5b (D-E) y *Bacillus* sp. 92g2 (G-H), y sus respectivos espectros EDX (C, F, I).

2.3.3 Determinación de mecanismos asociados a la inmovilización de Pb(II) en solución

El cultivo de *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b, y *Serratia* sp. 5b en el medio M11 sin urea ni Ca(II) (ver **Tabla 2-1**) dio como resultado una remoción de Pb(II) en solución menor a 20% para los 3 aislados (**Figura 2-7**). Esta disminución en la remoción de Pb(II) con respecto a los datos encontrados en un medio con urea y Ca(II) (**Figura 2-3**) puede deberse a varios factores. En primer lugar, el Ca(II) presente en el medio puede influir sobre la respuesta al estrés ocasionado por metales pesados como se ha reportado para la bacteria *Bacillus* sp. 98, ya que aumenta la expresión de proteínas que eliminan las especies reactivas de oxígeno inducidas por la presencia de metales como el Cd(II), y mantiene la morfología e integridad de la células bacterianas (Wu et al., 2021). En este caso, dada la presencia de Pb(II) en el medio, una baja concentración de Ca(II) podría no ser suficiente para que haya una reducción en la toxicidad sobre los aislados, lo que afectaría el crecimiento bacteriano y, por ende, el porcentaje de remoción de Pb(II). Sumado a esto, la ausencia de urea para favorecer un proceso de precipitación extracelular de Pb(II) también puede estar contribuyendo a que no haya disminución en el efecto tóxico sobre las bacterias. Sin embargo, para corroborar estas hipótesis se debe tener en cuenta el crecimiento bacteriano como un factor a comparar entre el medio con y sin urea y Ca(II), a través de medidas de densidad óptica (OD_{600}) o de unidades formadoras de colonia (UFC). Por otro lado, aunque se hayan obtenido porcentajes de remoción bajos, el hecho de que una parte del Pb(II) haya sido removido de la solución indica que estos aislados, sobre todo los del género *Serratia*, presentan otros mecanismos como biosorción o bioacumulación bajo las condiciones estudiadas, que les permite remover el metal en un medio sin estímulo para el proceso MICP.

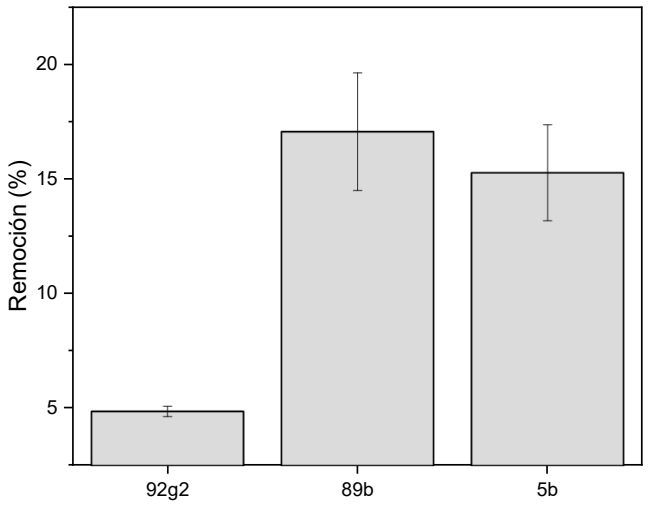

Figura 2-7. Remoción de Pb(II) por *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, luego de 72 h en el medio de cultivo M11 (**Tabla 2-1**).

- <u>Fraccionamiento de Pb(II) dentro del sistema MICP</u>

La contribución de diferentes mecanismos de inmovilización de Pb(II) dentro del sistema MICP estudiado se determinó a través de la extracción secuencial del metal asociado a 5 fracciones diferentes (Remanente, Biosorbido, Adsorbido, Precipitado, y Bioacumulado). Luego de 14 días de cultivo, los aislados *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b mantuvieron un porcentaje de remoción muy alto (98%), mientras que el aislado *Bacillus* sp. 92g2 alcanzó una remoción máxima del 93% (**Figura 2-8**), mostrando un aumento con respecto al porcentaje de remoción de 77% en el ensayo inicial de 72 h (**Figura 2-2**). Estos porcentajes de remoción estuvieron acompañados por valores altos de pH (mayores a 9,6) como se espera después del proceso de hidrólisis de urea (**Figura 1-2**, **capítulo 1**, **sección 1.1.7**).

En los resultados del fraccionamiento de Pb(II) mostrado en la **Figura 2-9,** se observó que hay un aporte mayoritario del proceso de biosorción sobre la remoción total obtenida para los dos aislados de *Serratia*, mientras que para *Bacillus* sp. 92g2 este porcentaje se reduce casi a la mitad. Una alta contribución de la biosorción sobre la remoción de Pb(II) para *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b puede deberse a las características de la composición de su pared teniendo en cuenta reportes previos que demuestran que la unión de cationes Pb(II) a otro aislamiento del mismo género, *Serratia* Se1998, se da como un proceso espontáneo favorecido termodinámicamente, y que lleva a la formación de complejos con

grupos carboxilo y fosforilo a través de la formación de enlaces C-O-Pb y P-O-Pb (Chen et al., 2019).

Para la fracción de Pb(II) precipitado se observó el comportamiento contrario. El aislado *Bacillus* sp. 92g2 es capaz de inmovilizar Pb(II) dentro de una matriz de carbonato en un 40,8%, mientras que para *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b este porcentaje corresponde a 15,2 y 13,5%, respectivamente. Este resultado podría ser explicado por la diferencia en la actividad ureolítica de los aislados de *Serratia* frente al aislado de *Bacillus* mostrada en la **Figura 2-1**, y la velocidad de precipitación con cada uno. Un estudio realizado para la bacteria *Sporosarcina pasteurii* demostró que, aunque al aumentar la temperatura de reacción se tiene una mayor actividad ureolítica, esta actividad se mantiene sólo por las primeras 70 h de ensayo antes de comenzar a decaer y que, además, este decaimiento es más pronunciado que a temperaturas menores donde la actividad ureolítica es más baja, aunque se mantiene hasta 360 h (Peng & Liu, 2019). En este caso, es importante verificar si hay un verdadero decaimiento en la actividad ureolítica de los aislados de *Serratia* en función del tiempo, y si puede estar ligado también a un crecimiento inicial más rápido de la bacteria bajo las condiciones estudiadas que ocasione el agotamiento de los nutrientes y oxígeno disponibles, llevando a la muerte celular. Más relevante aún, Peng & Liu (2019) también reportaron que hay una menor cantidad de $CaCO_3$ precipitado cuando se da una hidrólisis rápida de urea en las primeras horas de reacción ya que no se permite una adecuada formación de los precipitados, lo cual podría estar ocurriendo para los aislados del género *Serratia*, teniendo en cuenta su actividad ureolítica mayor. Este proceso de hidrólisis rápida puede ocasionar una saturación del medio, que se ha asociado con la formación preferencial del polimorfo vaterita (Rodriguez-Navarro et al., 2003), lo cual fue confirmado por los análisis de DRX para *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b (**Figura 2-5**). Esta posible diferencia en la velocidad y mecanismo de nucleación podría ser responsable del bajo porcentaje de inmovilización de Pb(II) por precipitación o coprecipitación con carbonatos, pero debe hacerse un estudio más detallado y un seguimiento en función del tiempo para corroborarlo.

La fracción de Pb(II) adsorbida en los precipitados fue menor que las fracciones de Pb(II) biosorbido y precipitado excepto para *Serratia* sp. 5b, y no hubo una diferencia significativa entre los porcentajes de *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2, aunque el aislado de *Bacillus* hubiera presentado un porcentaje más de tres veces superior de Pb(II) precipitado. Lo anterior puede explicarse teniendo en cuenta que, aunque *Bacillus* sp. 92g2 presentó un

mayor porcentaje de Pb(II) precipitado con carbonatos, no indica que haya una mayor cantidad total de precipitado con respecto a los aislados de *Serratia*. Además de esto, se ha reportado que independientemente del polimorfo de $CaCO_3$ que se obtenga, hay una adsorción importante de Pb(II) dada por un proceso de intercambio catiónico con iones Ca(II) o recristalización sobre la superficie de los carbonatos (Godelitsas et al., 2003; Lin et al., 2020). Por último, el porcentaje de Pb(II) en la fracción bioacumulada fue menor al 2% para todos los aislados, indicando así que dentro del sistema MICP establecido el aporte de la bioacumulación del metal al interior de las células no es relevante. La baja contribución de la bioacumulación también fue reportada por Sheng *et al.* 2022, a través de un estudio de los procesos micro-dinámicos que ocurren dentro del sistema MICP para *Pseudochrobactrum* sp. en presencia de Cd(II), donde además encontraron que la biosorción tiene una contribución relevante en la remoción total de cadmio.

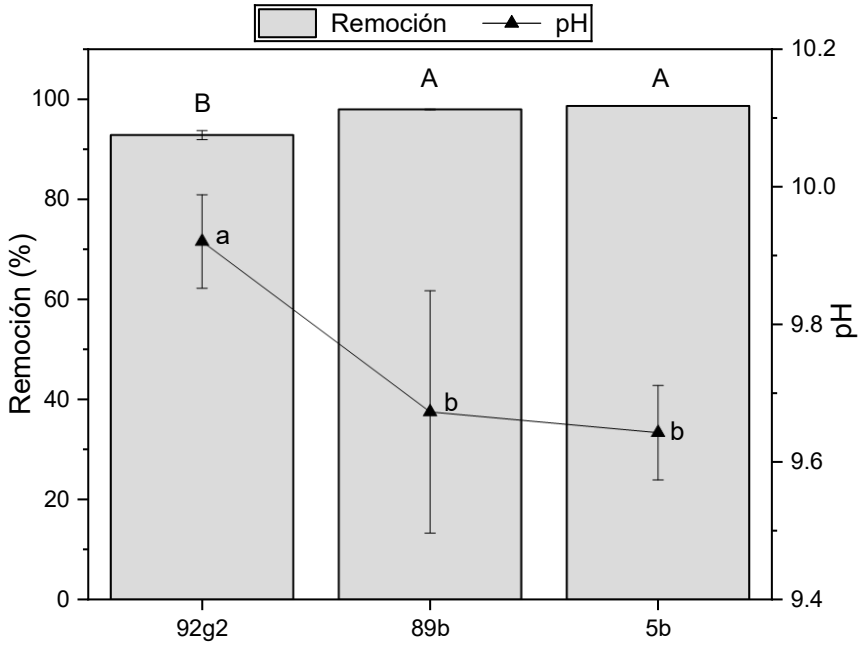

Figura 2-8. Comportamiento de la remoción de Pb(II) y el pH para los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, luego de 14 días de cultivo en el medio M10. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de remoción ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey, y las letras minúsculas corresponden a diferencia en el pH.

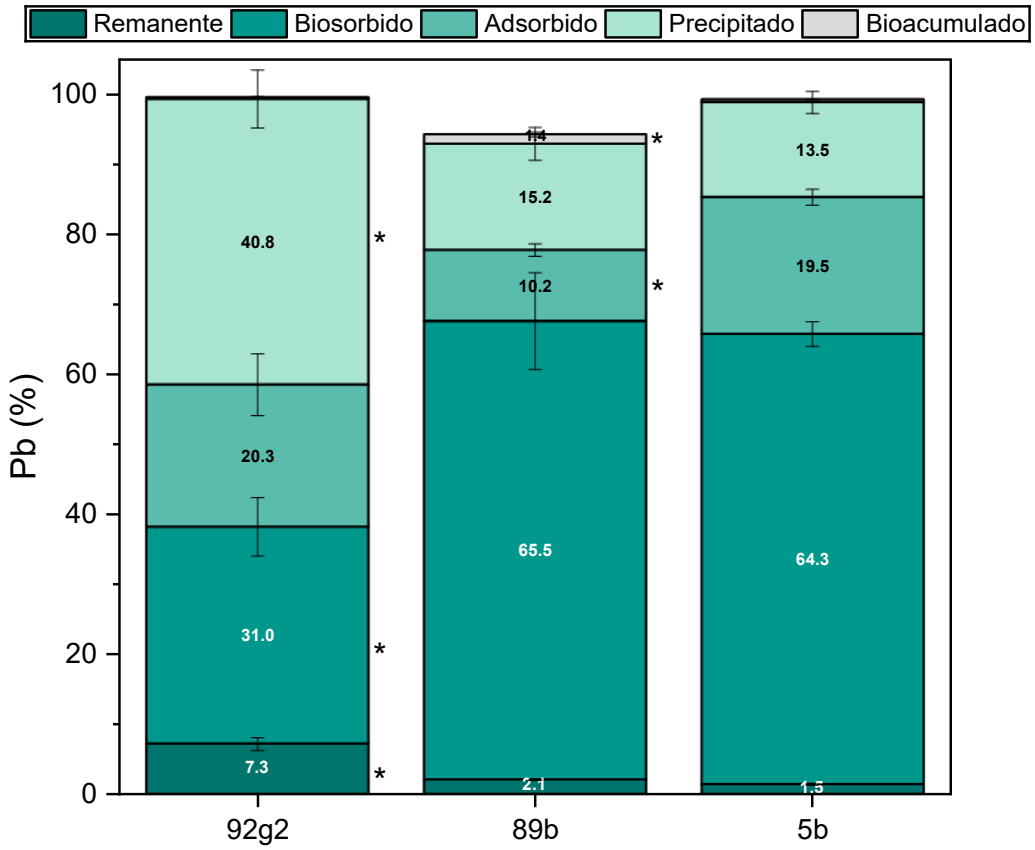

Figura 2-9. Fraccionamiento de Pb(II) dentro estudiado para los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b, luego de 14 días de cultivo en el medio M10 a 30 °C y 120 rpm. Las diferencias significativas se muestran por cada fracción (*).

- <u>Efecto del medio de cultivo sobre el fraccionamiento de Pb(II)</u>

  Teniendo en cuenta el bajo porcentaje de inmovilización de Pb(II) en la fracción precipitada por parte de los aislamientos del género *Serratia*, se evaluó el cambio en el fraccionamiento del metal con *Serratia* sp. 5b usando 5 medios de cultivo (**Tabla 2-1**). La **Figura 2-10** muestra que el porcentaje de remoción alcanzado con otros medios de cultivo es similar al obtenido en el medio inicial usado (M10), a excepción del medio sin Ca(II) añadido (M15), que fue significativamente menor que con los otros medios, aunque se mantiene por encima de 90%. De igual forma el pH final alcanzado con cada medio se mantuvo por encima de 9,2, y hubo un aumento significativo en el medio M18 dado que se tiene una mayor concentración de urea disponible para hidrolizar.

En términos generales el fraccionamiento de Pb(II) con *Serratia* sp. 5b no cambió sustancialmente en los medios evaluados comparado con el fraccionamiento del medio inicial (**Figura 2-11**). En todos los casos se mantuvo una predominancia notable de la fracción biosorbida sobre las demás, seguida de la fracción precipitada y bioacumulada, a excepción del medio sin Ca(II) (M15) en el que la fracción precipitada fue significativamente menor. Dado que no fue posible recuperar precipitados para M15 por la baja precipitación, en este fraccionamiento no se tomó en cuenta la corrección por adsorción sobre carbonatos. Lo anterior confirma que bajo las condiciones estudiadas no se da la precipitación directa de $PbCO_3$, y que la presencia de Ca(II) en el medio es fundamental para que se dé el proceso de coprecipitación con carbonatos como se ha reportado ampliamente para biorremediación por MICP (Jiang et al., 2019; Kim et al., 2021). El medio con una mayor cantidad de células bacterianas (M10 1.2) tampoco mostró un aumento significativo en la fracción precipitada, contrario a lo reportado por otros autores que afirman el efecto relevante de la presencia de más células bacterianas para aumentar la hidrólisis de la urea y los puntos de nucleación (Xue et al., 2022; Zhang et al., 2022). Esto puede deberse a que se haya hidrolizado por completo la urea presente en el medio, de forma que la presencia de más enzima ureasa no tenga efecto, o a que haya una tasa de hidrólisis muy rápida al inicio, que afecte la adecuada formación de carbonatos que inmovilicen el Pb(II), como se analizó en el fraccionamiento inicial. A esta hipótesis se le suma el hecho de que al aumentar la urea presente (M18) o la cantidad de Ca(II) (M16), no hay cambios significativos en la fracción de Pb(II) precipitada, descartando así que la baja inmovilización en la fracción precipitada sea por una cantidad insuficiente de los componentes claves para MICP. Por último, es importante resaltar que aunque la fracción de Pb(II) precipitada por *Serratia* sp. 5b es baja, en todos los medios a excepción de M15 se logró recuperar una cantidad suficiente de los precipitados, lo que podría sugerir que, más que una cuestión de disminución de actividad ureolítica, en este sistema con *Serratia* se puede estar favoreciendo un mecanismo de nucleación y crecimiento de cristales de carbonato con una distribución o estructura que hagan más difícil la incorporación de iones Pb(II) a la matriz carbonatada.

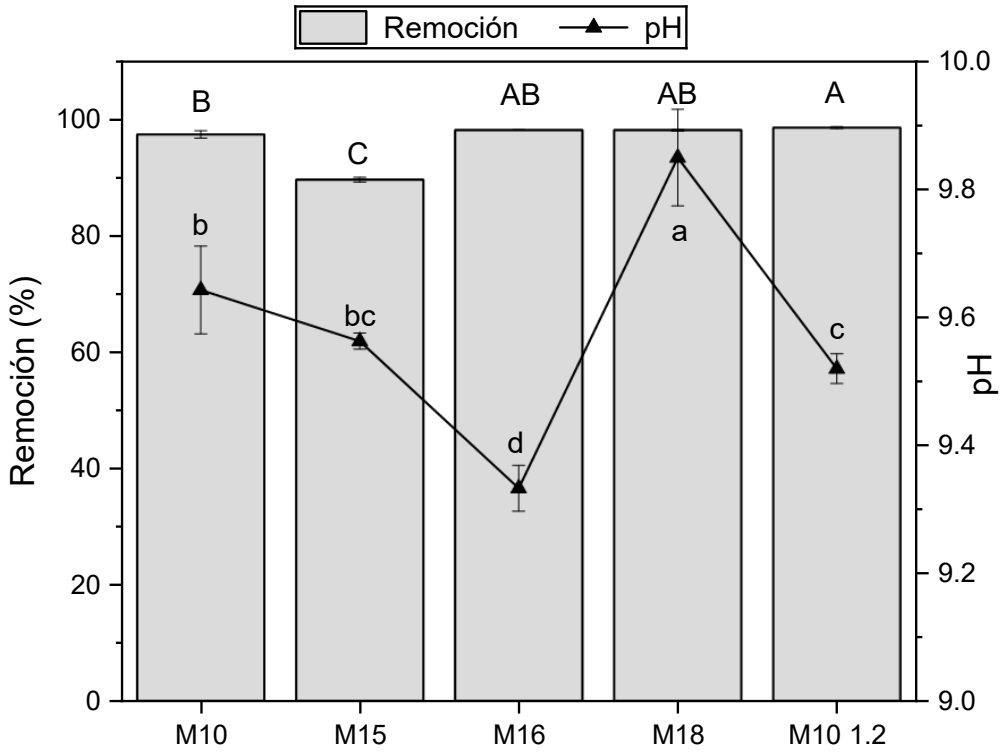

Figura 2-10. Comportamiento de la remoción de Pb(II) y el pH para *Serratia* sp. 5b luego de 14 días en 5 medios de cultivo diferentes: medio original urea y Ca(II) (M10); sin Ca(II) (M15); más Ca(II) (M16); más urea (M18); mayor OD_{600} (M10 1.2). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de remoción ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey, y las letras minúsculas corresponden a diferencia significativa entre pH.

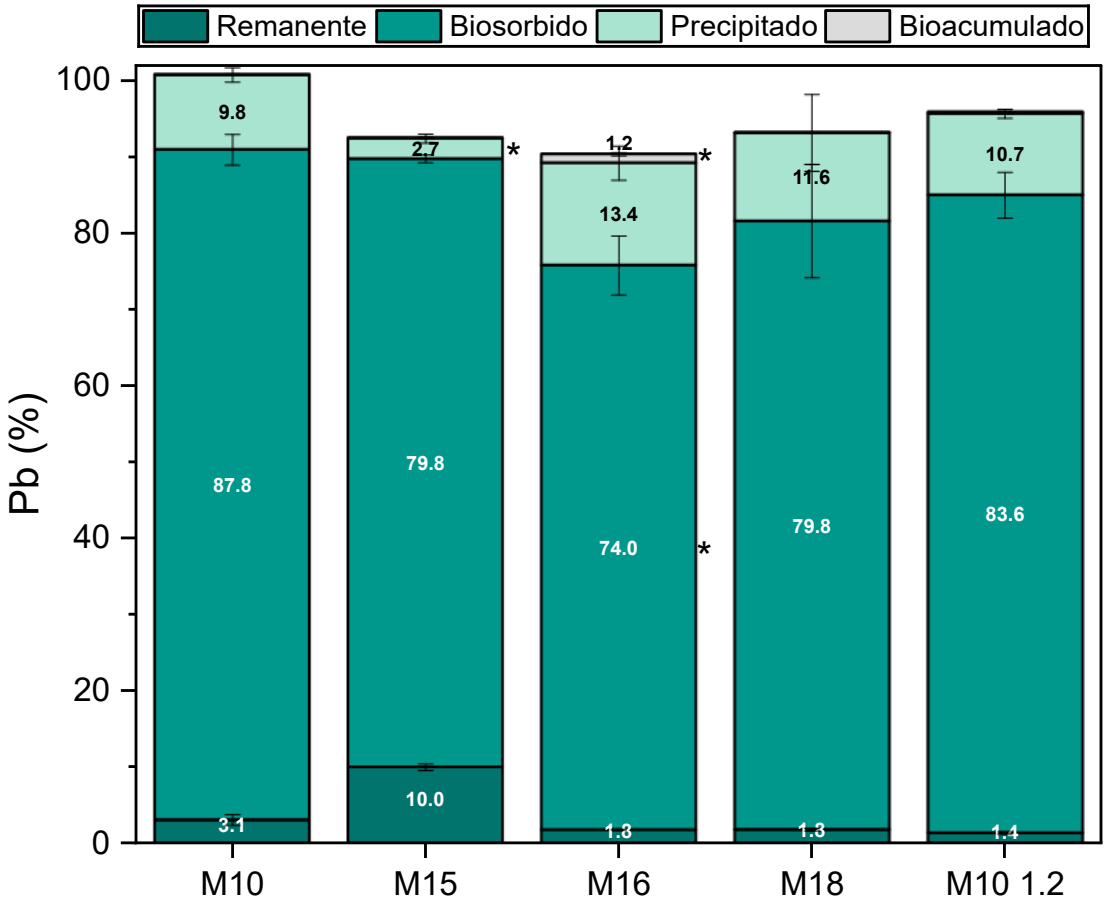

Figura 2-11. Fraccionamiento de Pb(II) dentro del sistema MICP estudiado para *Serratia* sp. 5b luego de 14 días en 5 medios de cultivo diferentes: M10, M15, M16, M18, y M10 1.2 (**Tabla 2-1**). Las diferencias significativas se muestran por cada fracción (*).

De acuerdo con los resultados del fraccionamiento se seleccionó el aislado *Bacillus* sp. 92g2 como primer candidato para la aplicación en suelo, dado el alto porcentaje de Pb(II) asociado a la fracción precipitada. Como segundo candidato se seleccionó el aislado *Serratia* sp. 5b dado que, aunque la fracción de Pb(II) precipitada fue poca, se encontró evidencia de la gran capacidad de remoción del metal en solución por otros mecanismos como la biosorción, sumado al interés de utilizar un aislado que también sea capaz de remover Cd(II), como se reportó en un trabajo previo del grupo de investigación (Diez-Marulanda, 2022; Diez-Marulanda & Brandão, 2024).

2.4 Conclusiones

Se analizó la actividad ureolítica y capacidad de remoción en presencia de Pb(II) para 37 aislados bacterianos provenientes de fincas cacaoteras de Santander, Colombia. Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b y con ellos se realizó un estudio de la distribución de Pb(II) dentro del sistema MICP estudiado, a través de la división del sistema en 5 fracciones asociadas a la inmovilización del metal: Remanente, Biosorbido, Adsorbido, Precipitado, y Bioacumulado. En general, los resultados de este fraccionamiento indican que, pese a tratarse de un sistema MICP con un medio de cultivo suplementado con urea y Ca(II), la remoción de Pb(II) no se da mayoritariamente por la precipitación o coprecipitación del metal con carbonatos, sino que hay un aporte significativo de la biosorción y la adsorción sobre los precipitados formados. Por último, se estudió el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo sobre el porcentaje de Pb(II) inmovilizado en la fracción precipitada, encontrando que la ausencia de Ca(II) en el medio lleva a una disminución significativa de la fracción, mientras que el aumento de la concentración de urea, Ca(II) o el número de células no ocasiona un aumento significativo.

3. Potencial de *Bacillus* sp. 92g2 y *Serratia* sp. 5b para la inmovilización de Pb(II) en suelo agrícola

3.1 Introducción

La contaminación con plomo no es una problemática que se vea limitada solamente a productos como pinturas o aguas residuales. Actualmente, la presencia de plomo en zonas de fácil acceso para humanos representa un riesgo para la salud dado que existe una mayor posibilidad de una exposición directa a sus efectos adversos, a través del contacto con matrices como suelos contaminados como se ha reportado para suelos de cascos urbanos (McBride, 2013; Zia et al., 2011), o en suelos agrícolas. Esta problemática propicia hoy en día un escenario para la entrada de este contaminante a la cadena alimenticia a través de su acumulación en cultivos destinados al consumo humano, como se ha reportado para el cacao (Arévalo-Gardini et al., 2017), lechuga, zanahoria, fríjol (McBride, 2013), calabaza, y la espinaca (Kumar et al., 2019).

El Pb en el suelo se puede encontrar como el catión Pb(II), que es la forma más disponible para seres vivos como las plantas, y puede ser transportado a través del xilema por la planta, ya que las raíces son las principales vías para la entrada de metales (Rai et al., 2019). Este metal afecta procesos vitales como la germinación de semillas (Seneviratne et al., 2019), la síntesis de clorofila, o el crecimiento de las raíces, afectado negativamente el crecimiento de la planta (Zulfiqar et al., 2019).

Frente a esto, se han explorado diferentes alternativas de remediación que buscan inmovilizar el Pb(II) en el suelo para disminuir su disponibilidad hacia los seres vivos. Algunos ejemplos de estas aproximaciones ha sido el uso de enmiendas como el biochar proveniente de diversas fuentes como el bambú y la paja de arroz (Lu et al., 2017), y más recientemente se ha explorado el potencial de la inoculación de bacterias que puedan inmovilizar el metal a través de distintos mecanismos. Un ejemplo de esto es el estudio de la inmovilización de Cd(II) en una plantación de arroz, en el que Liu *et al*., 2018 demostraron un alto potencial de biosorción del metal en suelo por parte de la bacteria *Delftia* sp. B9, que llevó a una disminución en la acumulación de Cd(II) en la planta.

Otro mecanismo de inmovilización que ha demostrado tener potencial para aplicación en suelo es la precipitación extracelular de los metales, convirtiendo cationes metálicos como el Pb(II) en formas insolubles como los fosfatos o sulfuros (Azabou et al., 2006; Yang et al., 2023). Dentro del grupo de bacterias que precipitan extracelularmente metales, las bacterias ureolíticas son usadas frecuentemente dado que pueden hidrolizar la urea presente en el medio para favorecer la formación de carbonatos metálicos a través de un proceso denominado MICP (*Microbiologically Induced Carbonate Precipitation*, por sus siglas en inglés). Ejemplos de la aplicación de este mecanismo en suelo para inmovilizar Pb(II) muestran una correlación entre la disminución de la fracción disponible del metal en suelo, y el aumento en el pH y en la cantidad de NH_4^+ producido a partir de la hidrólisis de la urea por parte de las bacterias, que finalmente induce la formación de carbonatos en la matriz (Achal et al., 2012; Wei et al., 2022).

En el presente trabajo se tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación de un suelo agrícola con los aislados *Serratia* 5b y *Bacillus* sp. 92g2 sobre la fracción de Pb(II) intercambiable en el suelo, y hacer un seguimiento del mecanismo de inmovilización del metal a través del monitoreo del pH y la actividad ureolítica en función del tiempo.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reactivos y medios de cultivo

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. Para los medios de cultivo se utilizaron los reactivos triptosa (Scharlau, Alemania), glucosa (D-Glucosa anhidra, Scharlab, España), NaCl (Panreac, España), urea (Panreac, España), $Pb(NO_3)_2$ (Merck, Alemania), $Ca(CH_3CO_2)_2$ (Merck, Alemania), y HNO_3 65% (Merck, Alemania). Los medios fueron debidamente esterilizados en autoclave a 15 psi por 20 minutos, y sobre éstos se adicionó el volumen correspondiente de soluciones stock de urea (250 g L^{-1}), glucosa (100 g L^{-1}), y Ca(II) (25 g L^{-1}), preparada a partir de la sal ya mencionadas, y fueron esterilizadas por filtración con un filtro de poliamida de 0,2 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania), y ajustadas a un pH de 6,7-6,8 usando HNO_3 al 2% (v/v). Para los pre-inóculos de los aislados se usó un medio de cultivo base denominado M1, al cual no se le adicionó Ca(II) o Pb(II). Otros medios de cultivo empleados se especifican en la **sección 3.2.4** y en la **Tabla 3-1** se resume la composición de los medios usados. Para la preservación de los

microorganismos a -20° C y -80 °C se usó como base el medio M1, y se adicionó glicerol estéril al 20% (v/v).

Tabla 3-1. Composición de los diferentes medios de cultivo usados en el presente trabajo.

Componente	M1	M+U [1]	M+UC [2]	M1 sólido	M+U sólido
Triptosa	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}	1 g L^{-1}	10 g L^{-1}	10 g L^{-1}
NaCl	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	0.1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}
Glucosa	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	0.1 g L^{-1}	1 g L^{-1}	1 g L^{-1}
Urea	-	4 g L^{-1}	4 g L^{-1}	-	4 g L^{-1}
Calcio: Ca(II)	-	-	400 mg L^{-1}	-	-
Agar	-	-	-	1,5% (p/v)	1,5% (p/v)
pH	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8

[1] La sigla M+U hace referencia a la adición de urea al medio de cultivo base M1.
[2] La sigla M+UC hace referencia a la adición de urea y Ca(II) al medio de cultivo base M1.

Para el proceso de contaminación del suelo se preparó una solución stock de Pb(II) 10 g L^{-1} a partir de la sal $Pb(NO_3)_2$ (Merck, Alemania), y para los protocolos de extracción del metal se emplearon los reactivos HCl 37% (v/v) (Merck, Alemania), HNO_3 65% (v/v) (Merck, Alemania), $MgCl_2{\cdot}6H_2O$ (Panreac, España), $CH_3COONa{\cdot}3H_2O$ (Merck, Alemania), y ácido acético glacial (Chemí). En la extracción de amonio se utilizó urea (Panreac, España), KCl(Panreac, España), y tetraborato disódico $Na_2B_4O_7{\cdot}10H_2O$ (Panreac, España).

Para la cuantificación de Pb y de amonio se siguieron los mismos parámetros de las curvas de calibración descritos en la **sección 2.2.1**.

3.2.2 Curva de crecimiento

Para los ensayos en suelo se seleccionaron los aislados *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2. Se realizó una curva de crecimiento para cada aislado en el medio de cultivo M1 antes de hacer los ensayos de inmovilización en suelo. Para tener continuidad en los puntos de muestreo se colocaron dos conjuntos de réplicas por aislado, cada uno con tres réplicas y un blanco de medio sin bacteria. Para el pre-inóculo de partida se hizo una inoculación al 1% del banco de trabajo de cada aislado en 10 mL de medio M1 (**Tabla 3-1**) y se dejó incubando a 30 °C y 120 rpm por 12 horas. Posteriormente se inocularon al 1% tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 85 mL del mismo medio, se dejaron incubando bajo

las mismas condiciones y se tomaron alícuotas de 1 mL cada 2 horas, partiendo de la hora cero de inoculación, para medir la densidad óptica (OD_{600}). Pasadas las primeras 12 horas de muestreo se realizó la inoculación del segundo conjunto de réplicas bajo las mismas condiciones que el primero, y se comenzaron a tomar muestras de este conjunto al día siguiente (12 horas después de la inoculación). El cultivo se dejó hasta completar las 54 horas de crecimiento con el primer conjunto inoculado (**Anexo D**, **Figura D-1** y **D-2**).

3.2.3 Obtención y acondicionamiento del suelo

La muestra de suelo fue tomada en el Centro Agropecuario Marengo bajo las coordenadas 4.683048, -74.220003 (latitud, longitud), donde se tomaron aproximadamente 50 kg de suelo a una profundidad máxima de 15 cm (**Anexo E**). Se retiraron manualmente las piedras y material vegetal visible, y se dejó secando el suelo por una semana a temperatura ambiente luego de extenderlo. El suelo seco fue macerado, pasado por un tamiz de 2 mm, y mezclado manualmente para obtener una muestra homogénea. A partir de la muestra homogénea se realizó la caracterización del suelo a través de un servicio externo del Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, y el reporte de resultados y métodos se encuentra en el **Anexo F** (**Figura F-1**).

Se tomaron 25 cajas plásticas de dimensiones 27 x 20 x 8 cm, se pesaron 650 g del suelo seco en cada una, y se adicionaron 260 mL de una solución de Pb(II) 250 mg L^{-1} preparada a partir de la solución stock de 10 g L^{-1} Pb(II) proveniente de la sal $Pb(NO_3)_2$, para una concentración final aproximada de Pb(II) de 100 mg kg^{-1} suelo. Cada caja fue manualmente homogeneizada con ayuda de un tenedor plástico de jardinería y se dejaron tapadas a la sombra por 3 meses para permitir la estabilización del metal en el suelo. El proceso de homogeneización manual se realizó semanalmente, y pasados los 3 meses se realizó la cuantificación de Pb(II) pseudototal para verificar la concentración final (**Anexo H**), y la metodología de extracción empleada se basa en la Norma Técnica Colombiana 3838 y 3934 (ICONTEC, 1996, 2003) (**Anexo G**). El proceso de extracción de Pb(II) pseudototal fue corroborado con la extracción de Pb(II) del material de referencia certificado NCS DC 73319a (**Anexo H**).

3.2.4 Ensayo de inmovilización

Con el fin de estudiar los posibles efectos de los aislados sobre la fracción de Pb(II) en suelo, se establecieron 5 tratamientos con los dos aislados seleccionados (*Bacillus* 92g2 y *Serratia* 5b), y se dejaron 5 réplicas por cada uno, asignadas de forma aleatoria. El primer tratamiento fue el control del suelo al cual se le adicionó solo agua desionizada estéril (CA), el segundo tratamiento fue el control de medio de cultivo M+UC sin bacteria (CU) para evaluar el efecto de la bioestimulación de bacterias ureolíticas presentes ya en el suelo (Chen & Achal, 2019), el tratamiento 3 consistió en la adición de *Bacillus* 92g2 en medio M+UC (**Tabla 3-1**) (TU92g2), en el tratamiento 4 se adicionó *Serratia* 5b en medio M+UC (TU5b), y el último tratamiento fue la adición de *Serratia* 5b resuspendida en agua (TA5b) para evaluar otros mecanismos de inmovilización sin urea. En la **Tabla 3-2** se muestra el resumen de los tratamientos realizados.

Tabla 3-2. Resumen de tratamientos utilizados para el ensayo de aplicación en suelo agrícola.

Tratamiento	**Abreviatura**
Sólo agua	CA
Medio M+UC	CU
Medio M+UC + *Bacillus* 92g2	TU92g2
Medio M+UC + *Serratia* 5b	TU5b
Agua + *Serratia* 5b	TA5b

Para los tratamientos con los aislados se colocó un pre-inóculo de cada uno partiendo de 100 µL del banco de trabajo en 40 mL de medio M1 y se dejó incubando por 12 h bajo las condiciones de cultivo previamente descritas (**sección 3.2.2**). Posteriormente, se transfirió cada pre-inóculo a tubos de centrífuga de 50 mL y se centrifugaron a 5000 rpm por 8 minutos y se desechó el sobrenadante. En el caso de *Serratia* 5b se dividió en 2 el pre-inóculo inicial antes de centrifugar para separar la biomasa para los tratamientos TU5b y TA5b. La biomasa recuperada para *Bacillus* 92g2 y la mitad de *Serratia* 5b fueron resuspendidas en matraces Erlenmeyer de 2 L estériles con 400 mL de medio M+U (**Tabla 3-1**), mientras que la otra mitad de la biomasa de *Serratia* 5b se resuspendió en 400 mL de medio M1. Los cultivos se dejaron por otras 12 h bajo las mismas condiciones de

crecimiento, se recuperó la biomasa en tubos de centrífuga como se describió anteriormente, y se resuspendió en medio M+UC para los tratamientos TU92g2 y TU5b, y en agua estéril para TA5b. El OD_{600} de los inóculos finales se ajustó para obtener aproximadamente $4x10^8$ UFC mL^{-1}, lo cual fue verificado sembrando por triplicado diferentes diluciones de los inóculos en el medio M1 sólido para el inóculo de TA5b, y en el medio M+U sólido para TU92g2 y TU5b (**Tabla 3-1**). En cada caja se adicionaron 50 mL del tratamiento correspondiente y se homogeneizó manualmente. Ambos aislados fueron inoculados en fase exponencial, de acuerdo con las curvas de crecimiento realizadas (**Anexo D**). El ensayo se realizó a escala de laboratorio a temperatura ambiente, y se monitoreó la temperatura con un termohigrómetro en la mañana y en la tarde. La temperatura se mantuvo en un rango entre 18,8 y 21,4° C (datos no mostrados). Las cajas se dejaron abiertas a la sombra y se cubrieron con un angeo (**Anexo H**). Se realizaron muestreos de 10 g por caja después de 1, 3, 7 y 13 días de iniciado el ensayo para medir pH, seguir la actividad ureolítica a través de la cuantificación de amonio producido en el suelo, y cuantificar la cantidad de Pb(II) presente en las fracciones intercambiable y carbonatada de Tessier (Tessier et al., 1979).

Para el seguimiento de la actividad ureolítica en suelo se modificó la metodología “Método de actividad ureasa por determinación colorimétrica de amonio” (Kandeler et al., 2015). Brevemente, se tomó 1 g del suelo muestreado por caja (base húmeda) y se colocó en tubos de centrífuga de 50 mL. Se adicionaron 4 mL de una solución de buffer borato 0,1 M pH 10 y 500 µL de una solución de urea 720 mM. Las muestras fueron suavemente agitadas y llevadas a incubar a 37 °C por 2 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 6 mL de una solución de KCl 2M-HCl 0,01 M y se dejaron las muestras en agitación por 30 minutos en un agitador rotativo vertical a 26 rpm. Al cabo de este tiempo se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 8500 rpm y se tomó el sobrenadante para continuar con el proceso de cuantificación de amonio como se describió en el capítulo anterior (**sección 2.2.2**). Es importante tener en cuenta que por cada muestra se montó una segunda réplica adicionando 500 µL de agua desionizada en lugar de urea, como control para tener en cuenta el amonio presente inicialmente en el suelo antes de la cuantificación de amonio por los tratamientos estudiados.

Posteriormente se realizó la extracción de Pb(II) en suelo siguiendo el protocolo de extracción secuencial de Tessier que plantea la repartición del metal en 5 fracciones: Intercambiable, Unida a carbonatos, Unida a óxidos de Fe-Mn, Unida a materia orgánica,

y Residual (Tessier et al., 1979). La extracción se llevó a cabo hasta completar la extracción de la fracción 2 o fracción carbonatada.

Fracción 1 (Pb intercambiable): El suelo muestreado por caja se secó a 50 °C por 3 días y se maceró para pasarlo por un tamiz de 2 mm. Se pesó 1 g de suelo seco en un tubo de centrífuga de 50 mL y se adicionaron 8 mL de una solución de $MgCl_2$ 1 M pH 7 para luego dejar 1 hora en agitación en un agitador rotativo vertical a 26 rpm. Posteriormente, se centrifugaron las muestras como se describió anteriormente, y se filtró el sobrenadante usando un papel de filtro (banda azul grado 5893, Whatman Schleicher & Schuell, Alemania) sobre un tubo de fondo plano previamente pesado. Se hizo un lavado del suelo centrifugado con 3 mL de agua desionizada y se recuperó ese sobrenadante de la misma forma que el anterior.

Fracción 2 (Pb carbonatado): Las muestras de suelo fueron dejadas a 50 °C una noche para secarlo y continuar la extracción al día siguiente. El papel filtro de la extracción anterior se lavó con 3 mL de una solución de acetato de sodio 1 M pH 5 para pasar el suelo restante al tubo inicial, y se terminó de adicionar la solución extractante a cada muestra hasta completar 8 mL. Las muestras se dejaron en agitación por 5 h bajo las mismas condiciones que la fracción 1, luego se centrifugaron y el sobrenadante se recuperó en otro tubo de fondo plano pesado, de la misma forma que en la fracción 1 incluyendo el lavado.

Todas las muestras fueron acidificadas con 1 mL de HNO_3 65% (v/v) y fueron llevadas a una masa final con agua desionizada antes de hacer las diluciones correspondientes con HNO_3 2% (v/v) para poder interpolar la absorbancia en la curva de calibración correspondiente. La concentración de Pb(II) se determinó usando Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (F-AAS) (contrAA700, Analytik Jena).

Para determinar el pH se partió de las muestras secas y maceradas, se pesaron 2 g de suelo por muestra en un tubo de centrífuga de 50 mL y se adicionaron 5 mL de agua desionizada para mantener la proporción 1:2.5 (FAO, 2021). Se agitaron las muestras en un agitador horizontal a 160 rpm por 1 hora y se dejaron en reposo otra hora antes de la lectura. El pH se determinó con un potenciómetro (pH 510 Series Meter, Oakton).

3.2.1 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el promedio de las réplicas, y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Para cada variable evaluada (NH_4^+, pH, Pb(II) intercambiable y Pb(II) carbonatado) se hizo una comparación entre los tratamientos por día de muestro a través de un análisis de varianza (ONE-WAY ANOVA) y usando la prueba de comparación múltiple de Tukey, tomando como significativo un p-valor <0,05. Todos los análisis se hicieron con el software GraphPad Prism versión 10.3.1 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Seguimiento de la actividad ureolítica en suelo para los aislados *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2

A través del monitoreo de la actividad ureolítica, el pH, y la distribución de Pb(II), se realizó el seguimiento al proceso de inmovilización de Pb(II) en suelo agrícola con *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2. El efecto sobre la actividad ureolítica en suelo fue evaluado para los 5 tratamientos diferentes, descritos en la **sección 3.2.4**, y las diferencias en la actividad ureolítica comenzaron a evidenciarse desde el tercer día después de la inoculación del suelo (**Figura 3-1**). Se observó un aumento significativo de la actividad para todos los tratamientos con respecto al primer día, pero con la adición de *Serratia* sp. 5b junto con urea y Ca(II) (TU5b) se obtuvo el valor máximo en todo el ensayo (4244 μmol kg^{-1} h^{-1}), lo que indica que la hidrólisis de urea con *Serratia* sp. 5b es más rápida que con *Bacillus* sp. 92g2, como se había encontrado para los ensayos en solución (**Figura 2-2**), y también con respecto a los microorganismos ureolíticos presentes en el suelo no estéril (CU). Curiosamente, el control con agua (CA) y el tratamiento sólo con *Serratia* sp. 5b (TA5b) también presentaron un aumento en la tasa de NH_4^+ producido en el tercer día, aunque no se haya adicionado una fuente de urea. Esto puede deberse a que el suelo usado para el ensayo tuviera algo de urea remanente que no fue degradada en el proceso de secado, ni de acondicionamiento del suelo, que pudiera ser luego hidrolizada por los microorganismos ureolíticos propios del suelo después de aumentar las condiciones de humedad al añadir agua, o por *Serratia* sp. 5b añadida como tratamiento. Un caso similar se reportó en un

estudio en el que se evaluó la capacidad de biorremediación de Cd(II) y Pb(II) en suelo por parte de la bacteria *Bacillus pasteurii*, sin adicionar urea exógena, sino partiendo solamente de la urea ya presente en el suelo (Zhang et al., 2024).

El comportamiento del pH del suelo fue similar que el de la actividad ureolítica en la primera semana de ensayo (**Figura 3-2**). En el día 3 se observó un aumento significativo en el pH para todos los tratamientos, a excepción de CA que no presentó ningún cambio significativo en el pH en todo el ensayo. El aumento del pH en el día 3 para los tratamientos TU5b, TU92g2, y CU, coincide con el incremento en la actividad ureolítica para ese día de muestreo (**Figura 3-1**), dada la formación de iones NH_4^+ y OH^- por la hidrólisis de la urea (**Figura 2, sección 1.1.7**). Para el tratamiento TA5b, este aumento significativo del pH también puede estar dado por los iones NH_4^+ provenientes de la amonificación de otras moléculas orgánicas como proteínas o ácidos nucleicos (Strock, 2008). El aumento en el pH del suelo sin adición externa de urea también fue reportado en un ensayo de biorremediación de Pb(II) con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Huang et al., 2006). En este trabajo se atribuye el aumento en el pH al NH_4^+ producido después de la solubilización del amoniaco formado por la amonificación del nitrógeno orgánico, que es favorecido por la descomposición de materia orgánica por parte de *Phanerochaete chrysosporium*.

Sin embargo, los valores del día 7 indican una disminución significativa de la actividad para los tratamientos TU5b y CU con respecto al día 3. Un comportamiento similar también fue reportado por Zhang *et.al*, 2024 en un ensayo de inmovilización de Pb(II) en suelo con *Bacillus pasteurii* en el cual como consecuencia de no adicionar más nutrientes hay una pérdida de la actividad ureolítica luego de 7 días de inocular el suelo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que también puede haber run efecto de otras condiciones del sistema como una disminución en la humedad del suelo, ya que no se adicionó más agua desde la inoculación. Al cabo de 13 días, el tratamiento con *Bacillus* sp. 92g2 (TU92g2) fue el que obtuvo la mayor actividad ureolítica, seguido de TU5b, TA5b, CA, y CU. La obtención de actividades ureolíticas mayores con la adición de bacterias cultivadas (bioaumentación) frente a la bioestimulación de microorganismos propios de los suelos fue reportada también para la bacteria *Bacillus pasteurii* (Mahanty et al., 2013), aunque en este trabajo se resaltan las posibles interacciones negativas entre las bacterias inoculadas y los microorganismos ya presentes en el suelo. Esto también podría ser una causa de las fluctuaciones en la

actividad ureolítica de *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2. Por otra parte, la disminución en el pH puede estar relacionada no sólo con la reducción en la actividad ureolítica en el día 7, sino también como resultado del metabolismo de los microorganismos presentes en el suelo. Algunos organismos como *Burkholderia fungorum* pueden tomar el NH_4^+ presente en el suelo como fuente de N (Jacobson & Wu, 2009), o puede darse un proceso de nitrificación en el cual el NH_4^+ es oxidado para formar NO_3^-, llevando a una consecuente disminución del pH, y que ha sido reportado en suelos ácidos, como el suelo usado en el presente trabajo (Li et al., 2017).

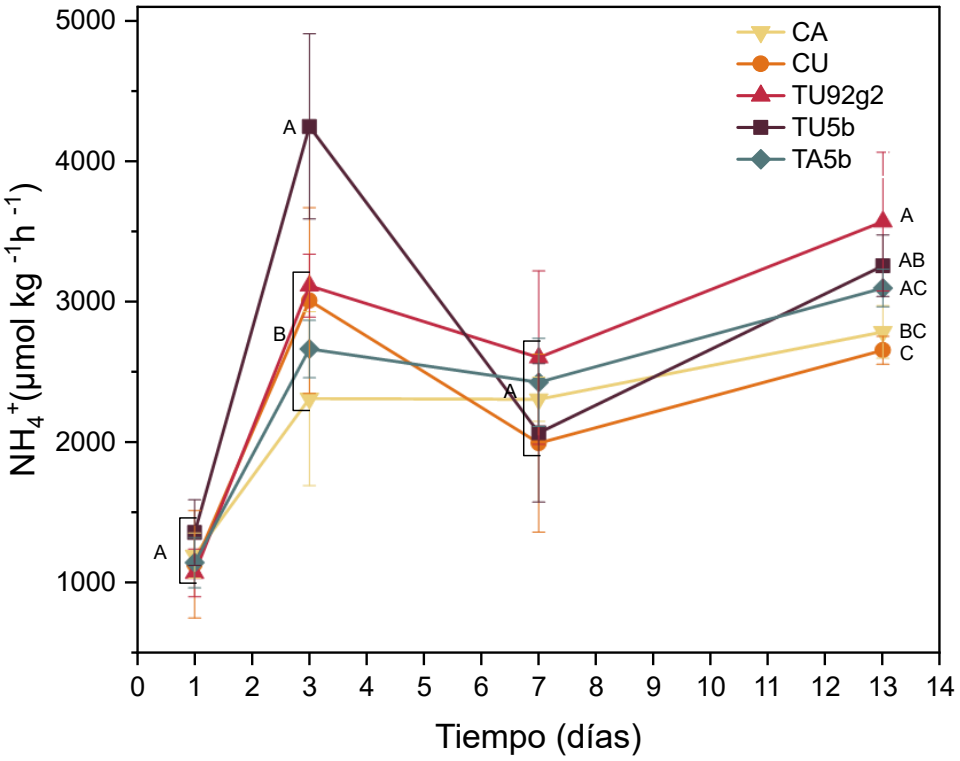

Figura 3-1. Comportamiento de la actividad ureolítica en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en un mismo día de muestreo.

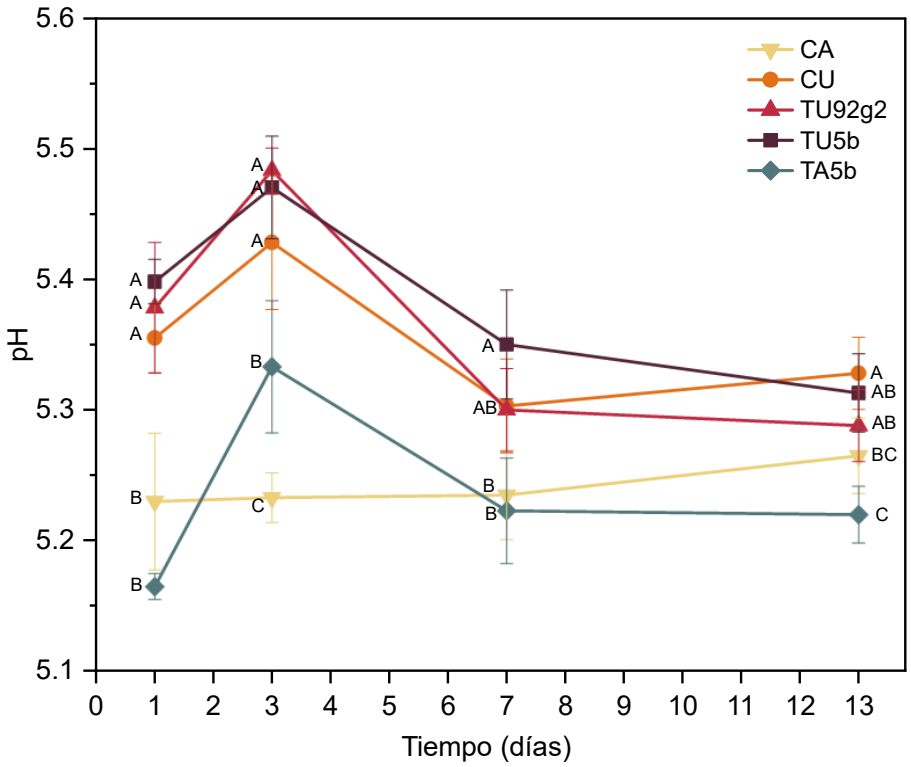

Figura 3-2. Comportamiento del pH del suelo en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en de un mismo día de muestreo.

3.3.2 Cambios en la distribución de Pb(II) por la inoculación con *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2

La efectividad de los tratamientos evaluados fue determinada a través de la cuantificación de Pb(II) presente en la fracción intercambiable según la extracción secuencial de Tessier, la cual se asocia a la fracción del metal que está más disponible para los organismos vivos dada la unión débil a las partículas de suelo y su alta movilidad (Li et al., 2020). Después de tres días de ensayo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control con agua (CA), a excepción del tratamiento sólo con *Serratia* sp. 5b (TA5b), que aumentó la fracción de Pb(II) intercambiable alrededor del 12%, como se muestra en la **Figura 3-3**. Este incremento puede darse por factores metabólicos tanto del aislado inoculado, como de los microorganismos ya presentes en el suelo, entre los que se encuentra la producción de ácidos orgánicos que solubilicen el Pb(II) unido a otras

fracciones menos disponibles como la fracción carbonatada, como se reportó para un ensayo de remediación de suelo contaminado con Cd(II) usando *Bacillus* sp. (Mo et al., 2022). Sin embargo, la **Figura 3-2** no muestra una disminución significativa en el pH para TA5b en el tercer día de muestreo, lo que podría estar indicando que este incremento en la fracción intercambiable de Pb(II) puede estar dada por un aumento en la materia orgánica disuelta en el suelo, que abarca compuestos como aminoácidos, polihidroxifenoles, o aminoazúcares, y que se ha reportado que favorecen la formación de complejos con cationes metálicos como el Pb(II) y la desorción de este metal del suelo (Li et al., 2011; Liu et al., 2007). De igual manera, aunque el tratamiento con *Bacillus* sp. 92g2 haya mostrado la mayor actividad ureolítica después de 13 días de ensayo (**Figura 3-1**), no hubo una disminución significativa en la fracción de Pb(II) intercambiable para ningún día de muestreo. Este resultado por sí solo no indica necesariamente que no se haya dado la precipitación de carbonatos, sino que ese proceso no afectó significativamente la distribución de Pb(II) en el suelo. Los resultados finales obtenidos con el tratamiento TA5b tampoco mostraron una diferencia significativa con respecto al control, lo que indica que, bajo las condiciones del ensayo, no se evidenciaron otros mecanismos de inmovilización de Pb(II) por parte de *Serratia* sp. 5b. Reportes de remediación de Pb(II) en suelo sin usar el mecanismo de MICP, como el de Cheng *et al*., 2020, muestran que bacterias de los géneros *Serratia y Bacillus* tienen la capacidad de inmovilizar metales sin la adición de un medio con urea. Sin embargo, en el caso de los tratamientos TU92g2 y TA5b, la inefectividad de los tratamientos puede deberse a factores como la supervivencia de *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2 bajo las condiciones del ensayo, ya que puede haber una fuerte competencia por nutrientes con los microorganismos endógenos del suelo.

Por el contrario, los muestreos del día 7 y 13 mostraron una disminución significativa en la fracción intercambiable de Pb(II) con respecto al control (CA) para los tratamientos de inoculación con urea y *Serratia* sp. 5b (TU5b), y el control de medio con urea y Ca(II) (CU), los cuales presentaron una concentración final de Pb(II) de 7,24 y 8,10 mg kg^{-1}, respectivamente. En este ensayo, los cambios en la fracción intercambiable representan un 10 y 20% de inmovilización del Pb(II) con los tratamientos CU y TU5b, respectivamente. Al igual que para el tratamiento TU92g2, la baja inmovilización con TU5b puede deberse a la falta de adaptación de los aislados inoculados bajo las condiciones experimentales. Un estudio de los efectos que tiene la introducción de bacterias exógenas provenientes de estiércol, sobre las comunidades microbianas presentes en suelo agrícola demostró la baja

adaptabilidad de algunos géneros como *Paracoccus* y *Glycomyces*, posiblemente por un acceso limitado a recursos por la competencia con la comunidad microbiana original (Yang et al., 2022). Estas condiciones experimentales pueden también haber afectado la hidrólisis de urea y la formación de carbonatos por la baja humedad en el suelo después de varios días de ensayo, así como por la cantidad de urea añadida, que es menor a la concentración reportada usualmente para estos ensayos (~ 1%) (Wei et al., 2022). Esta concentración se decidió por ensayos preliminares a menor escala (10 g de suelo) (datos no mostrados), en los que esta concentración de urea fue suficiente para evidenciar disminuciones significativas en la fracción intercambiable.

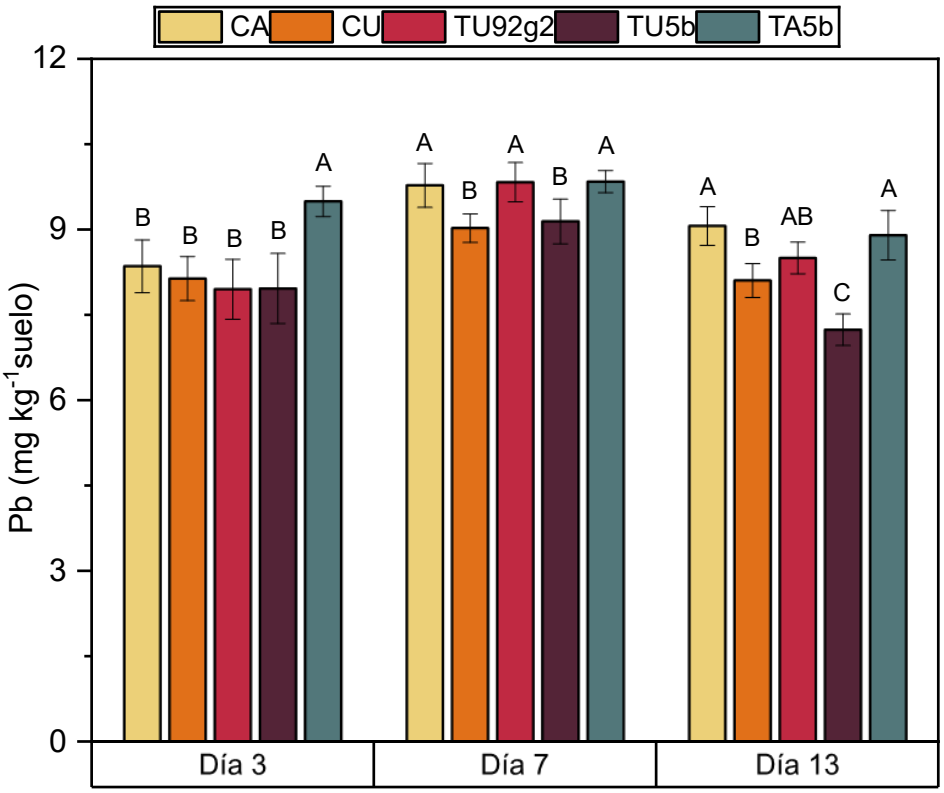

Figura 3-3. Fracción de Pb(II) intercambiable en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de un mismo día de muestreo.

Se corroboró la baja eficiencia del proceso MICP para los tratamientos CU, TU5b y TU92g2 mediante la cuantificación de Pb(II) unido a la fracción carbonatada (**Figura 3-4**), teniendo

en cuenta que el mecanismo efectivo de MICP involucra la formación de carbonatos que inmovilicen Pb(II) y, por tanto, una mayor cantidad del metal pasará a estar unido a esta fracción en el suelo. En el ensayo realizado, después de 13 días no se obtuvo ningún cambio significativo en esta fracción para ningún tratamiento con respecto al control con agua. Entre los factores que más influyen en este proceso está el pH, que en este ensayo se mantuvo entre 5,11 y 5,49, y que afecta la distribución de especies de los metales. En un pH ácido hay una predominancia del plomo como el catión Pb(II), y en suelos tiende a formar complejos orgánicos dado que no se ve favorecida la formación de carbonatos o fosfatos (Kicińska et al., 2022). Además el pH afecta la actividad de la enzima ureasa, que se ha reportado que tiene mayor actividad en pH más neutros o alcalinos (Tang et al., 2020). Cabe resaltar que también se ha reportado la efectividad del proceso MICP a un pH cercano a 4, para aplicaciones de biocementación de suelos (Lai et al., 2023), y con pH de 5,6 para aplicaciones de biorremediación de metales en suelos mineros, en donde *Bacillus firmus* XP8 fue capaz de aumentar el pH del suelo lo suficiente para que se diera el proceso de precipitación de carbonatos (Yang et al., 2016). Teniendo en cuenta lo anterior, se debe considerar que la efectividad del proceso MICP depende también del efecto del pH sobre las bacterias inoculadas, ya que previamente estaban siendo cultivadas a un pH de 6,7, y al ser expuestas a un pH menor se puede estar perjudicando su adaptación en el medio y, por ende, su capacidad de inmovilizar el metal en suelo. En este mismo sentido, también puede haber un efecto de la temperatura del suelo, que tuvo fluctuaciones entre 18,8 y 21,4° C durante los 13 días del ensayo, sobre el crecimiento y metabolismo de los aislados. Para corroborar lo anterior se debe determinar la temperatura y el pH óptimos de crecimiento de los aislados.

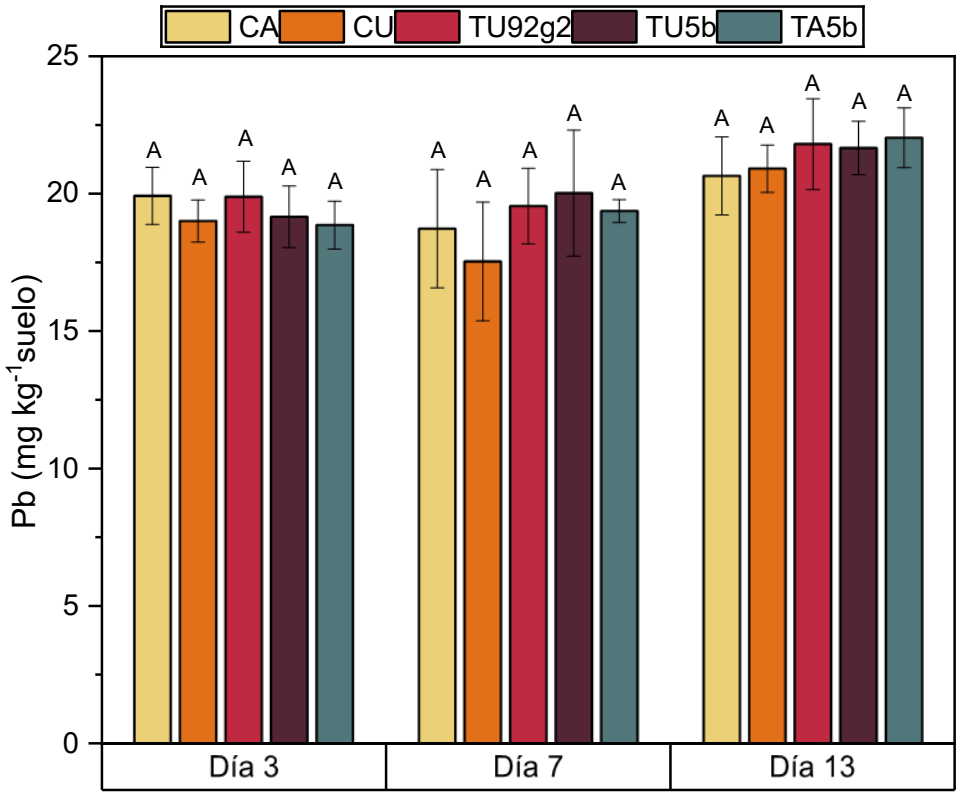

Figura 3-4. Fracción de Pb(II) unido a carbonatos en función del tiempo para cada tratamiento (ver **Tabla 3-2**). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de un mismo día de muestreo.

Al contrastar las altas tasas de remoción de Pb(II) en solución para *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2 (**sección 2.3.2**), y la evidencia de la capacidad de precipitación de carbonatos (**sección 2.3.3**), con los resultados de la cuantificación de Pb(II) intercambiable y carbonatado en suelo (**Figura 3-3** y **Figura 3-4**), se puede deducir que la baja eficiencia de inmovilización de este metal en suelo agrícola está relacionada con las condiciones del ensayo que podrían estar afectando el crecimiento y metabolismo de los aislados inoculados, como la competencia con otros microorganismos endógenos del suelo, el pH o la temperatura, así como también con las condiciones para el proceso MICP como la concentración de urea. Para corroborar estas hipótesis es necesario evaluar el efecto de estas variables sobre el crecimiento bacteriano, y la respuesta en la inmovilización de Pb(II) cambiando parámetros como la concentración de urea, cantidad de células inoculadas, frecuencia de inoculación, entre otros. Finalmente es importante cuantificar el metal

asociado otras fracciones del suelo como la fracción orgánica, la fracción de óxidos de Fe y Mn, y la fracción residual, para tener un mayor entendimiento de los procesos de inmovilización de Pb en suelo dados por la inoculación de las bacterias seleccionadas.

3.3.3 Conclusiones

Se realizó el seguimiento del proceso de inmovilización de Pb(II) en suelo a través de la cuantificación de la actividad ureolítica y los cambios en el pH para los tratamientos de bioestimulación (CU), inoculación de *Serratia* sp. 5b con urea (TU5b) y sin urea (TA5b), e inoculación con *Bacillus* sp. 92g2 (TU92g2). Después de tres días de ensayo se obtuvo el valor máximo en la producción de NH_4^+ para TU5b, pero al finalizar los 13 días de ensayo, el tratamiento TU92g2 fue el que presentó la mayor actividad. El aumento en los valores de pH coincide con la actividad ureolítica en el tercer día de muestreo, pero disminuye gradualmente en el resto del ensayo, posiblemente por causa del metabolismo de los microorganismos presentes en el suelo. Se evaluó la inmovilización de Pb(II) en suelo agrícola a través de la cuantificación del metal intercambiable en suelo, asociado a la biodisponibilidad, y se determinó que los tratamientos TA5b y TU92g2 no tienen un efecto significativo en la reducción de la fracción intercambiable de Pb(II), mientras que los tratamientos CU y TU5b lograron una reducción en esta fracción del 10% y 20% respectivamente. Sin embargo, la reducción en esta fracción no fue acompañada de un aumento en la cantidad de Pb(II) unido a la fracción carbonatada como se esperaría para un proceso de biorremediación por MICP, y se atribuye esto principalmente a las condiciones del ensayo.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

En el presente trabajo se investigó la actividad ureolítica y la capacidad de remoción de Pb(II) en un medio de cultivo suplementado con urea, Ca(II) y Pb(II), para 37 aislados bacterianos provenientes de fincas cacaoteras de Santander, Colombia. Por una parte, se encontraron tres aislados pertenecientes al género *Serratia* con actividades ureolíticas altas y porcentajes de remoción cercanos a 100% y, por otro lado, se encontraron cuatro aislados de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*, que presentaron actividades ureolíticas menores pero altos porcentajes de remoción.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y el interés en explorar el potencial de la precipitación de carbonatos por MICP, se seleccionaron los aislados *Bacillus* sp. 92g2, *Serratia* sp. 89b y *Serratia* sp. 5b para analizar con mayor detalle los mecanismos de interacción entre la bacteria y el Pb(II) que están involucrados en este proceso. Este análisis se realizó a través de la cuantificación de Pb(II) en cinco fracciones establecidas para el sistema: Pb Remanente, Pb Biosorbido, Pb Adsorbido, Pb Precipitado, y Pb Bioacumulado. Este fraccionamiento mostró que, bajo las condiciones de cultivo seleccionadas, la remoción de Pb(II) en solución para *Serratia* sp. 5b y *Serratia* sp. 89b se da principalmente a través de la biosorción del metal en la pared celular o en los exopolisacáridos que produzcan estas bacterias, y el porcentaje del metal asociado a la fracción carbonatada es de sólo el 13,5 y 15,2%, respectivamente. En el caso de *Bacillus* sp. 92g2, el porcentaje de Pb(II) removido que se asocia a la fracción de carbonatos fue de 40,8%, indicando que es el mecanismo de remoción más relevante para esta bacteria, seguido de la biosorción (31,0%) y la adsorción sobre los carbonatos (20,3%). Se encontró también que el mecanismo de bioacumulación de Pb(II) no es relevante para la remoción del metal con ninguno de los 3 aislados. Adicionalmente, se analizaron los precipitados obtenidos usando las técnicas de IR, DRX y SEM-EDX, con las que se pudo comprobar que los 3 aislados son capaces de precipitar carbonatos con diferentes morfologías.

Por último, se evaluó la efectividad de la aplicación de los aislados seleccionados en suelo agrícola contaminado con Pb(II) para disminuir la fracción disponible del metal. Los tratamientos con *Serratia* sp. 5b y *Bacillus* sp. 92g2 en presencia de urea y Ca(II) (TU5b y

TU92g2, respectivamente) mostraron las actividades ureolíticas más altas después de 13 días de ensayo, aunque esto no se vio reflejado en un aumento significativo del pH del suelo. Por otra parte, los tratamientos TU5b y CU (adición de urea y Ca(II)), disminuyeron la cantidad de Pb(II) en la fracción intercambiable, asociada a la biodisponibilidad, 20% y 10% respectivamente, mientras que los tratamientos TU92g2 y TA5b (inoculación de *Serratia* sp. 5b sin urea) no causaron una diferencia significativa en la fracción. Finalmente, la cuantificación de Pb(II) asociado a la fracción carbonatada del suelo permitió determinar que la reducción de la fracción intercambiable para TU5b y CU no coincidió con un aumento en la cantidad del metal asociado a la fracción carbonatada, contrario a lo reportado para ensayos de biorremediación con MICP. Con los resultados obtenidos se pudo determinar que, bajo las condiciones elegidas para el ensayo en suelo agrícola, la mayor reducción en la fracción intercambiable de Pb(II) en suelo se obtuvo al inocular *Serratia* sp. 5b en un medio con urea y Ca(II), pero deben evaluarse otras condiciones que permitan mejorar la efectividad en la reducción de la fracción intercambiable de Pb(II). De igual forma, para tener un mayor entendimiento de los procesos de inmovilización del metal en suelo, es necesario determinar los cambios en la cantidad de Pb asociado a otras fracciones de suelo.

Este trabajo muestra la alta capacidad de una selección de bacterias aisladas de fincas cacaoteras, pertenecientes a diferentes géneros, para remover Pb(II) en solución, generando conocimiento sobre el potencial de bacterias recuperadas de ambientes naturales de Colombia para ser aplicadas con fines de biorremediación. Adicionalmente, en este trabajo se propone una metodología detallada y novedosa para estudiar la repartición de Pb(II) en diferentes fracciones asociadas a la remoción del metal en solución, y que sirve como una herramienta para verificar y reportar la contribución real de diferentes mecanismos de interacción bacteria-metal sobre la remoción total.

4.2 Recomendaciones

Para ampliar el alcance de la investigación se recomienda hacer el análisis del fraccionamiento de Pb(II) en solución acuosa con los aislados *Pseudomonas* sp. 85j y *Stenotrophomonas maltophilia* 67w, que presentaron altos porcentajes de remoción del metal con diferentes actividades ureolíticas. De esta forma, se puede obtener más información del porcentaje de Pb(II) realmente inmovilizado por precipitación de

carbonatos para bacterias pertenecientes a más géneros. Para complementar la metodología del fraccionamiento en solución, también se recomienda hacer un ensayo de producción de exopolisacáridos para determinar cuáles aislados tienen esta característica. Posteriormente, se recomienda hacer un proceso de extracción de los exopolisacáridos producidos bajo las mismas condiciones que el ensayo de fraccionamiento, de manera que pueda cuantificarse otra fracción de Pb(II) asociada a la biosorción en esta matriz.

Finalmente, se recomienda hacer una optimización de la concentración de urea e inóculo que permita obtener una mayor reducción en la fracción intercambiable de Pb(II) en suelo. Otra alternativa que se puede aplicar para este fin es evaluar el efecto de hacer inoculaciones repetidas en función del tiempo que permitan una introducción constante de la bacteria que se va a evaluar, y de nutrientes necesarios para el proceso. Teniendo en cuenta que la finalidad de disminuir la fracción intercambiable en el suelo es evitar la absorción de Pb(II) por parte de las plantas, se recomienda plantear un ensayo en suelo donde se haga el proceso de biorremediación ya optimizado, y posteriormente se siembre alguna planta de interés. De esta forma, una vez la planta haya germinado y crecido hasta cierto punto, se puede extraer la cantidad de Pb(II) presente en diferentes partes de la planta o incluso el fruto, y determinar de esta forma la verdadera efectividad de la inmovilización. Por último, se recomienda evaluar la estabilidad de la inmovilización a largo plazo, puesto que se sabe que los carbonatos también pueden ser disueltos por causa del metabolismo de diversos microorganismos del suelo, así como por la acidificación del suelo por lluvia ácida o por dinámicas propias del suelo.

A. Anexo 1: Características de aislamientos bacterianos de fincas cacaoteras de Santander, Colombia

Tabla A-1. Identificación y caracterización de los aislamientos bacterianos usados en este trabajo.

Código	Gram	Perfil SSCP[c]	Identificación[d]	Código	Gram	Perfil SSCP[c]	Identificación
91h[a]	+	Gg	*Bacillus proteolyticus*	69t[a]	-	X	*Pseudomonas* sp.
69x[a]	+	Y	*Bacillus pacificus*	85f[a]	-	G	*Pseudomonas* sp.
76c1[a]	+	-	*Bacillus thuringiensis*	69i[a]	-	W	-
101h[a]	+	P	*Bacillus thuringiensis*	85j[a]	-	H	*Pseudomonas* sp.
72a[a]	+	Bb	*Bacillus*	96q[a]	-	Z	-
85d[a]	+	F	*Bacillus toyonensis*	92f[a]	-	J	-
92g1[a]	+	Ee	*Bacillus sp*	96p[a]	-	Z	-
92h2[a]	+	L	*Bacillus thuringiensis*	67l[a]	-	R	*Pseudomonas fluorescens*
92g2[a]	+	-	*Bacillus cereus*	72_e2[a]	-	Cc	*Pseudomonas mosselii*
95d[a]	-	M	*Citrobacter* sp.	96k[a]	-	Z	*Pseudomonas* sp.
101a[a]	-	I	*Citrobacter* sp.	96o[a]	-	Z	-
95a[a]	-	M	-	69j[a]	+	X	-
95e_1[a]	-	N	*Citrobacter* sp.	5b[b]	-	*	*Serratia surfactantfaciens*
67p[a]	-	S	*Delftia tsuruharensis*	58b[a]	-	A	*Serratia marcescens*
76b[a]	-	D	*Klebsiella michiganesis*	89b[a]	-	I	*Serratia marcescens*
76c2[a]	-	D	*Klebsiella* sp.	67q[a]	-	T	*Stenotrophomonas* sp.

76h[a]	-	D	-	67w[a]	-	Ii	*Stenotrophomonas maltophilia*
67r[a]	-	R	*Pseudomonas fluorescens*				
91d[a]	-	J	*Pseudomonas* sp.				
63c[a]	-	B	*Pseudomonas* sp.				

[a] Estos aislamientos fueron caracterizados como parte de una tesis doctoral aún no publicada del grupo de investigación (Adarme-Duran, 2024).

[b] Este aislamiento fue caracterizado como parte de una tesis de maestría dentro del grupo de investigación (Diez-Marulanda, 2022).

[c] Cada letra o conjunto de letras hace referencia a un grupo diferente indicando un perfil distinto de SSCP.

[d] En la identificación se encuentra el nombre del microorganismo con el porcentaje de identidad más alto obtenido por BLAST. Los espacios sin un nombre asignado corresponden a los aislamientos a los que no se les realizó la secuenciación del gen 16S rRNA.

B. Anexo B: Identificación de precipitados por DRX

Tabla B-1. Resultados de la comparación de los difractogramas de los tres aislados bacterianos usados en este trabajo contra la base de datos ICSD.

Aislado	**Patrón seleccionado**	**Código de referencia[a]**	**Puntaje de similitud**
Serratia sp. 89b	Calcium Carbonate-Vaterite	00-024-0030	81
Serratia sp. 5b	Calcium Carbonate-Vaterite	00-024-0030	54
Bacillus sp. 92g2	Calcium Carbonate-Calcite	01-086-2340	62

[a] El código de referencia es el identificador de los patrones seleccionados en la base de datos ICSD.

C. Anexo C: Micrografías adicionales de los precipitados bacterianos

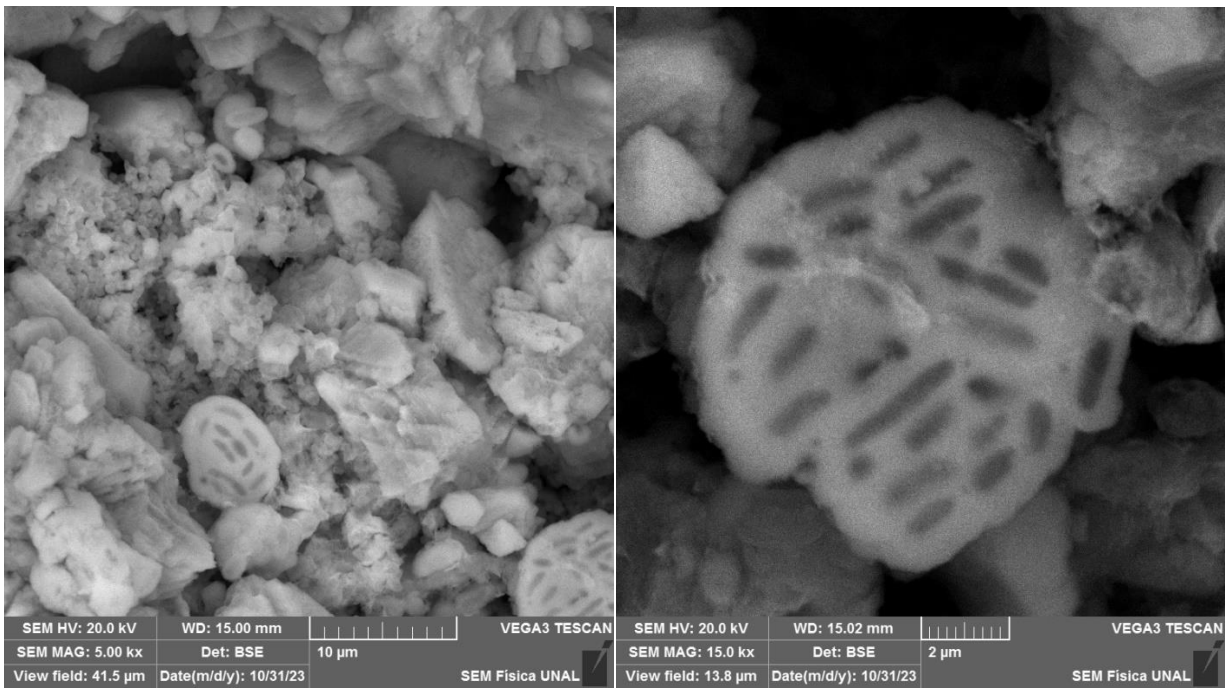

Figura C-1. Micrografías para el precipitado de *Serratia* sp. 5b que muestran la calcificación de bacterias.

D. Anexo D: Curvas de crecimiento

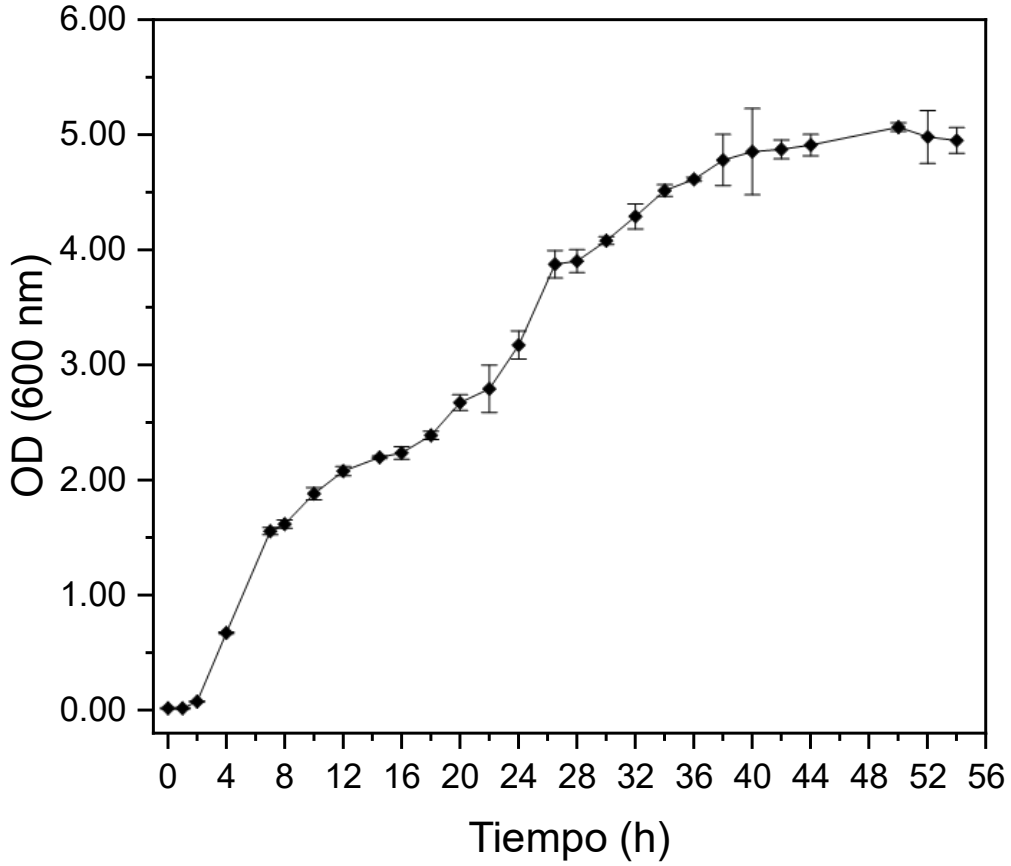

Figura D-1. Curva de crecimiento para *Serratia* sp. 5b en medio M1 a 30 °C y 120 rpm.

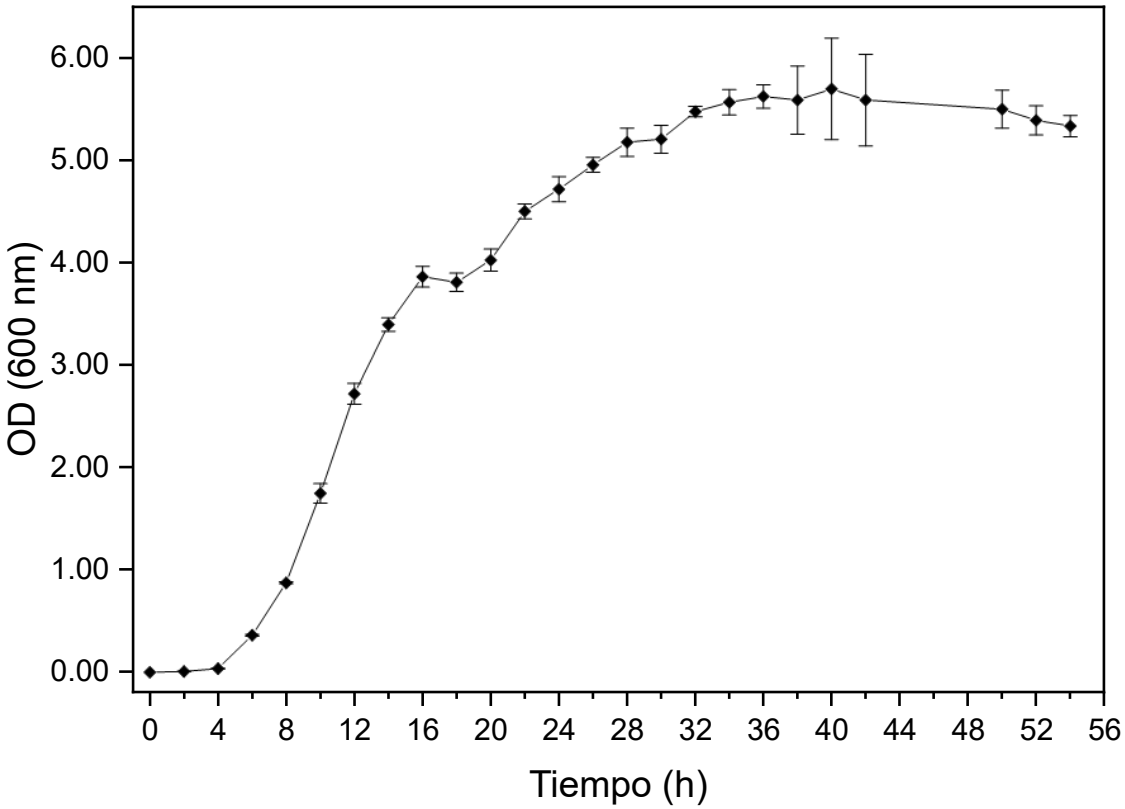

Figura D-2. Curva de crecimiento para *Bacillus* sp. 92g2 en medio M1 a 30 °C y 120 rpm.

E. Anexo E: Evidencia fotográfica del muestreo de suelo

Figura E-1. Fotografías tomadas el 28 de agosto de 2023 en el Centro Agropecuario Marengo durante la recolección de suelo.

F. Anexo F: Caracterización del suelo

RESULTADOS									
Código	**Lote**	**pH**	**NT**	**CT**	**Ca**	**Mg**	**K**	**Na**	**CIC**
545	Pedro Filipe	5,41	0,36	4,05	9,28	3,08	0,79	1,38	29,1

Código	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Cdd
545	71,5	0,98	119	1,90	11,1	0,25	0,28

Nota: Estos resultados son válidos unicamente para las muestras entregadas por el usuario al laboratorio

MÉTODOS			
Nombre Variable	**Método**	**Determinación**	**Unidades**
pH	Suspensión suelo:agua (relación peso:volúmen 1:1)	Potenciometría	-
NT: Nitrógeno total	Análisis elemental - Dumas	-	%
CT: Carbono total	Análisis elemental	-	%
Ca, K, Mg, Na: Bases intercambiables	Extracción con acetato de amonio 1M pH 7	Absorción atómica - Llama	meq/100g
CIC: Capacidad de intercambio catiónico	Extracción con acetato de amonio 1M pH 7	Volumetría	meq/100g
P: Fósforo disponible	Bray II	Colorimetría	mg/kg
Cu, Fe, Mn, Zn: Microelementos	Extracción con DTPA	Absorción atómica - Llama	mg/kg
B: Boro extraíble	Extracción con fosfato monocálcico	Colorimetría	mg/kg
Cdd: Cadmio disponible	Extracción con DTPA	Absorción atómica - Llama	mg/kg

Figura F-1. Reporte de la caracterización de la muestra de suelo por parte del Laboratorio de Aguas y Suelos de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

G. Anexo G: Protocolo de extracción de plomo en suelo

- Extracción de Pb pseudototal

El protocolo de extracción hace referencia a la fracción pseudototal del metal en el suelo ya que no se alcanza a disolver la fracción unida a los silicatos presentes naturalmente en el suelo y se basa en la Norma Técnica Colombiana 3838 y 3934 (ICONTEC, 1996, 2003). Para esta extracción se pesa 1 g de suelo seco y macerado en un tubo digestor de fondo plano (DigiTUBEs, PerkinElmer, Estados Unidos) y se adicionan 8 mL de agua regia (HCl/HNO_3 3:1). Los tubos se colocan en un bloque digestor en una rampa de calentamiento de 30 minutos hasta llegar a 120 °C, y se deja 2 horas a esa temperatura. Las muestras son agitadas manualmente cada 30 minutos verificando que haya volumen suficiente del extractante para evitar que se seque la muestra. Pasadas las 2 horas se dejan enfriar los tubos a temperatura ambiente y se pasa el contenido por un papel filtro (banda azul grado 5893, Whatman Schleicher & Schuell, Alemania) sobre un tubo de fondo plano previamente pesado. Se hacen 3 lavados con HNO_3 2% (v/v) recuperando el sobrenadante de la misma forma y procurando dejar el tubo y la tapa completamente limpios. Cada muestra se lleva a una masa final con agua desionizada antes de hacer las diluciones respectivas.

H. Anexo H: Cuantificación de Pb(II) pseudototal en el suelo contaminado

Tabla H-1. Resultados de Pb(II) pseudototal para el suelo agrícola luego de 3 meses de contaminación, y el material de referencia.

Suelo	Promedio Pb(II) mg/kg suelo	Desviación estándar	%recuperación
Centro Agropecuario Marengo	101,29	3,920	-
NCS DC 73319a	327,060	19,953	96,478

I. Anexo I: Montaje experimental en el laboratorio del ensayo en suelo

Figura H-1. Montaje experimental del ensayo en suelo donde se muestran las cajas con suelo cubiertas por un angeo, y un termohigrómetro para monitoreo de temperatura.

Referencias

Achal, V., Pan, X., Zhang, D., & Fu, Q. (2012). Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(2), 244–247. https://doi.org/10.4014/jmb.1108.08033

Adarme-Duran, C.A. (2024) Mitigación de Cadmio en suelos cacaoteros mediante bacterias ureolíticas.[Universidad Nacional de Colombia]. Tesis aún no publicada.

Adarme-Duran, C.A., Castillo, E., Brandão, P.F.B. (2024) Removal o cadmium by ureolytic bacteria isolated from Theobroma cacao L. rhizosphere soils. World Journal of Microbiology and Biotechnology, in press.

Alloway, B. J. (2012). Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. En Heavy metals in soils (Third Edition). Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1016/s0165-9936(96)90032-1

Alvarez, P. J., & Illman, W. A. (2006). Bioremediation and Natural Attenuation. John Wiley and Sons Inc.

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (Theobroma cacao L.) in major cacao growing regions in Peru. Science of the Total Environment, 605–606(2017), 792–800. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122

Ashraf, U., Kanu, A. S., Deng, Q., Mo, Z., Pan, S., Tian, H., & Tang, X. (2017). Lead (Pb) toxicity; physio-biochemical mechanisms, grain yield, quality, and Pb distribution proportions in scented rice. Frontiers in Plant Science, 8, 259. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00259

Atici, Ö., Ağar, G., & Battal, P. (2005). Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress. Biologia Plantarum, 49(2), 215–222. https://doi.org/10.1007/s10535-005-5222-9

Azabou, S., Mechichi, T., & Sayadi, S. (2006). Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.08.008

Azcón, R., del Carmen Perálvarez, M., Roldán, A., & Barea, J. M. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi, Bacillus cereus, and Candida parapsilosis from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. Microbial Ecology, 59(4), 668–677. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9618-5

Azulay, D. N., Abbasi, R., Ben Simhon Ktorza, I., Remennik, S., Reddy, A. M., & Chai, L. (2018). Biopolymers from a Bacterial Extracellular Matrix Affect the Morphology and Structure of Calcium Carbonate Crystals. En Crystal Growth and Design (Vol. 18, Número 9). https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00888

Bai, J., Yang, X., Du, R., Chen, Y., Wang, S., & Qiu, R. (2014). Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by Bacillus subtilis DBM in a multi-metal-contaminated soil. Journal of environmental sciences (China), 26(10), 2056–2064. https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.015

Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. En Frontiers in Pharmacology (Vol. 12). https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972

Blanco, A., Salazar, M. J., Vergara Cid, C., Pignata, M. L., & Rodriguez, J. H. (2017). Accumulation of lead and associated metals (Cu and Zn) at different growth stages of soybean crops in lead-contaminated soils: food security and crop quality implications. En Environmental Earth Sciences (Vol. 76, Número 4). https://doi.org/10.1007/s12665-017-6508-x

Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., & Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from

northeastern Colombia. Journal of Applied Microbiology, 124(5), 1175–1194. https://doi.org/10.1111/jam.13698

Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. En Heliyon (Vol. 6, Número 9). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691

Brink, H. G., Hörstmann, C., & Peens, J. (2020). Microbial Pb(II)-precipitation: the influence of oxygen on Pb(II)-removal from aqueous environment and the resulting precipitate identity. International Journal of Environmental Science and Technology, 17(1), 409–420. https://doi.org/10.1007/s13762-019-02502-4

Cai, G., Chen, S. F., Liu, L., Jiang, J., Yao, H., Xu, A. W., & Yu, S. H. (2010). 1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N′,N′-tetraacetic acid stabilized amorphous calcium carbonate: Nucleation, transformation and crystal growth. CrystEngComm, 12(1), 234–241. https://doi.org/10.1039/b911426m

Cao, R., Zhang, Y., Ju, Y., Wang, W., Zhao, Y., Liu, N., Zhang, G., Wang, X., Xie, X., Dai, C., Liu, Y., Yin, H., Shi, K., He, C., Wang, W., Zhao, L., Jeon, C. O., & Hao, L. (2023). Exopolysaccharide-producing bacteria enhanced Pb immobilization and influenced the microbiome composition in rhizosphere soil of pakchoi (Brassica chinensis L.). Frontiers in Microbiology, 14(March), 1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117312

Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. Frontiers in Materials, 6(June), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126

Chakraborty et al. (2017). Metals and their toxic effects, and introduction to noxious elements. En S. Das. & H. Ranjan (Ed.), Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation (pp. 3-17). CRC Press, Taylor & Francis Group

Chen, H., Xu, J., Tan, W., & Fang, L. (2019). Lead binding to wild metal-resistant bacteria analyzed by ITC and XAFS spectroscopy. Environmental Pollution, 250, 118–126. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.123

Chen, M., Li, Y., Jiang, X., Zhao, D., Liu, X., Zhou, J., He, Z., Zheng, C., & Pan, X. (2021). Study on soil physical structure after the bioremediation of Pb pollution using microbial-induced carbonate precipitation methodology. Journal of Hazardous Materials, 411(January), 125103. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125103

Chen, S., Lian, Z., Li, S., Kim, J., Li, Y., Cao, L., & Liu, Z. (2017). The environmental burdens of lead-acid batteries in China: Insights from an integrated material flow analysis and life cycle assessment of lead. Energies, 10(12). https://doi.org/10.3390/en10121969

Chen, X., & Achal, V. (2019). Biostimulation of carbonate precipitation process in soil for copper immobilization. Journal of Hazardous Materials, 368(August 2018), 705–713. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.108

Chen, X. X., Liu, Y. M., Zhao, Q. Y., Cao, W. Q., Chen, X. P., & Zou, C. Q. (2020). Health risk assessment associated with heavy metal accumulation in wheat after long-term phosphorus fertilizer application. Environmental Pollution, 262, 114348. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114348

Cheng, C., Han, H., Wang, Y., He, L., & Sheng, X. (2020). Metal-immobilizing and urease-producing bacteria increase the biomass and reduce metal accumulation in potato tubers under field conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety, 203(July), 111017. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111017

Cheraghi, M., Lorestani, B., Merrikhpour, H., & Rouniasi, N. (2013). Heavy metal risk assessment for potatoes grown in overused phosphate-fertilized soils. Environmental Monitoring and Assessment, 185(2), 1825–1831. https://doi.org/10.1007/s10661-012-2670-5

Cheriton, L. W., & Gupta, J. (2005). Building materials. Encyclopedia of Analytical Science, 304–314.

Chong, K. Y., Chia, C. H., & Zakaria, S. (2014). Polymorphs calcium carbonate on temperature reaction. AIP Conference Proceedings, 1614(September), 52–56. https://doi.org/10.1063/1.4895169

Chrastný, V., Šillerová, H., Vítková, M., Francová, A., Jehlička, J., Kocourková, J., Aspholm, P. E., Nilsson, L. O., Berglen, T. F., Jensen, H. K. B., & Komárek, M. (2018). Unleaded gasoline as a significant source of Pb emissions in the Subarctic. Chemosphere, 193, 230–236. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.031

Coblentz Society Inc. (s/f). Libro del Web de Química del NIST. En P. Linstrom & W. Mallard (Eds.), NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology. https://doi.org/10.18434/T4D303

Commission Regulation (EU) 2015/1005 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of lead in certain foodstuffs. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1005&from=EN

Correia, A. A. S., Matos, M. P. S. R., Gomes, A. R., & Rasteiro, M. G. (2020). Immobilization of heavy metals in contaminated soils-performance assessment in conditions similar to a real scenario. Applied Sciences (Switzerland), 10(22), 1–18. https://doi.org/10.3390/app10227950

Cuaxinque-Flores, G., Aguirre-Noyola, J. L., Hernández-Flores, G., Martínez-Romero, E., Romero-Ramírez, Y., & Talavera-Mendoza, O. (2020). Bioimmobilization of toxic metals by precipitation of carbonates using Sporosarcina luteola: An in vitro study and application to sulfide-bearing tailings. Science of the Total Environment, 724, 138124. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138124

Cuaxinque-Flores, G., Talavera-Mendoza, O., Aguirre-Noyola, J. L., Hernández-Flores, G., Martínez-Miranda, V., Rosas-Guerrero, V., & Martínez-Romero, E. (2024). Molecular and

geochemical basis of microbially induced carbonate precipitation for treating acid mine drainage: The case of a novel Sporosarcina genomospecies from mine tailings. Journal of Hazardous Materials, 476. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135005

Dayton, E. A., Basta, N. T., Payton, M. E., Bradham, K. D., Schroder, J. L., & Lanno, R. P. (2006). Evaluating the contribution of soil properties to modifying lead phytoavailability and phytotoxicity. Environmental Toxicology and Chemistry, 25(3), 719–725. https://doi.org/10.1897/05-307R.1

Decree 214/2007 [Ministry of the Environment]. Government Decree on the Assessment of Soil Contamination and Remediation Needs. March 1, 2007.

Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. Toxicology Reports, 5, 156–163. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025

Diez-Marulanda, J. C. (2022). Estudio de la bioprecipitación de cadmio por bacterias ureolíticas aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia [Universidad Nacional de Colombia]. https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84073

Diez-Marulanda, J. C., & Brandão, P. F. B. (2023). Isolation of urease-producing bacteria from cocoa farms soils in Santander, Colombia, for cadmium remediation. 3 Biotech, 13(3), 98. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03495-1

Diez-Marulanda, J. C., & Brandão, P. F. B. (2024). Potential use of two Serratia strains for cadmium remediation based on microbiologically induced carbonate precipitation and their cadmium resistance. Environmental science and pollution research international, 31(4), 5319–5330. https://doi.org/10.1007/s11356-023-31062-x

Falster, G., Delean, S., & Tyler, J. (2018). Hydrogen Peroxide Treatment of Natural Lake Sediment Prior to Carbon and Oxygen Stable Isotope Analysis of Calcium Carbonate.

Geochemistry, Geophysics, Geosystems, 19(9), 3583–3595. https://doi.org/10.1029/2018GC007575

FAO. (2021). Standard operating procedure for soil pH determination. https://doi.org/10.18356/9789210018289c230

Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., & Babalola, O. O. (2020). Heavy Metal Immobilization Potential of Indigenous Bacteria Isolated from Gold Mine Tailings. International Journal of Environmental Research, 14(1), 71–86. https://doi.org/10.1007/s41742-019-00240-6

Godelitsas, A., Astilleros, J. M., Hallam, K., Harissopoulos, S., & Putnis, A. (2003). Interaction of calcium carbonates with lead in aqueous solutions. Environmental Science and Technology, 37(15), 3351–3360. https://doi.org/10.1021/es020238i

Greipsson, S. (2011). Phytoremediation. Nature Education Knowledge, 3(10):7(January 2011).

Hassan, A., Periathamby, A., Ahmed, A., Innocent, O., & Hamid, F. S. (2020). Effective bioremediation of heavy metal–contaminated landfill soil through bioaugmentation using consortia of fungi. Journal of Soils and Sediments, 20(1), 66–80. https://doi.org/10.1007/s11368-019-02394-4

Huang, D. L., Zeng, G. M., Jiang, X. Y., Feng, C. L., Yu, H. Y., Huang, G. H., & Liu, H. L. (2006). Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with Phanerochaete chrysosporium and straw. Journal of Hazardous Materials, 134(1–3), 268–276. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.021

Huang, W. J., & Lo, J. S. (2004). Synthesis and efficiency of a new chemical fixation agent for stabilizing MSWI fly ash. Journal of Hazardous Materials, 112(1–2), 79–86. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.04.006

Huang, X., Zhang, R., Cui, M., & Lai, H. (2022). Experimental Investigation on Bioremediation of Heavy Metal Contaminated Solution by Sporosarcina pasteurii under Some Complex Conditions. Water (Switzerland), 14(4). https://doi.org/10.3390/w14040595

Hunt, A. (2016). Relative bioaccessibility of Pb-based paint in soil. Environmental Geochemistry and Health, 38(4), 1037–1050. https://doi.org/10.1007/s10653-015-9789-6

Jacobson, A. D., & Wu, L. (2009). Microbial dissolution of calcite at T = 28 °C and ambient pCO2. Geochimica et Cosmochimica Acta, 73(8), 2314–2331. https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.01.020

Jalilvand, N., Akhgar, A., Alikhani, H. A., Rahmani, H. A., & Rejali, F. (2020). Removal of Heavy Metals Zinc, Lead, and Cadmium by Biomineralization of Urease-Producing Bacteria Isolated from Iranian Mine Calcareous Soils. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 20(1), 206–219. https://doi.org/10.1007/s42729-019-00121-z

Javier Perez-Vazquez, F., Flores-Ramirez, R., Catalina Ochoa-Martinez, A., Teresa Orta-Garcia, S., Hernandez-Castro, B., Carrizalez-Yañez, L., Pérez-Maldonado, I. N., Perez-Vazquez, F. J., Flores-Ramirez, R., Ochoa-Martinez, A. C., Orta-Garcia, S. T., Carrizalez-Yañez, L., & Pérez-Maldonado, I. N. (2015). Concentrations of persistent organic pollutants (POPs) and heavy metals in soil from San Luis Potosí, México. Environ Monit Assess, 187, 4119. https://doi.org/10.1007/s10661-014-4119-5

Jiang, N. J., Liu, R., Du, Y. J., & Bi, Y. Z. (2019). Microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Pb contaminants: Toxic effects on bacterial activity and immobilization efficiency. Science of the Total Environment, 672, 722–731. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.294

Kandeler, E., Poll, C., Frankenberger, W. T., & Ali Tabatabai, M. (2015). Nitrogen Cycle Enzymes. En R. P. Dick (Ed.), Methods of Soil Enzymology (pp. 211–245). https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c10

Khadim, H. J., Ammar, S. H., & Ebrahim, S. E. (2019). Biomineralization based remediation of cadmium and nickel contaminated wastewater by ureolytic bacteria isolated from barn horses soil. Environmental Technology and Innovation, 14. https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100315

Khan, M. U., Malik, R. N., & Muhammad, S. (2013). Human health risk from Heavy metal via food crops consumption with wastewater irrigation practices in Pakistan. Chemosphere, 93(10), 2230–2238. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.067

Kicińska, A., Pomykała, R., & Izquierdo-Diaz, M. (2022). Changes in soil pH and mobility of heavy metals in contaminated soils. European Journal of Soil Science, 73(1), 1–14. https://doi.org/10.1111/ejss.13203

Kim, Y., Kwon, S., & Roh, Y. (2021). Effect of Divalent Cations (Cu, Zn, Pb, Cd, and Sr) on Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation and Mineralogical Properties. Frontiers in Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.646748

Kinuthia, G. K., Ngure, V., Beti, D., Lugalia, R., Wangila, A., & Kamau, L. (2020). Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in Nairobi, Kenya: community health implication. Scientific Reports, 10(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65359-5

Kumar, A., Kumar, A., Cabral-Pinto, M., Chaturvedi, A. K., Shabnam, A. A., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Gupta, D. K., Malyan, S. K., Kumar, S. S., Khan, S. A., & Yadav, K. K. (2020). Lead toxicity: Health hazards, influence on food Chain, and sustainable remediation approaches. En International Journal of Environmental Research and Public Health (Vol. 17, Número 7). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijerph17072179

Kumar, S., Prasad, S., Yadav, K. K., Shrivastava, M., Gupta, N., Nagar, S., Bach, Q. V., Kamyab, H., Khan, S. A., Yadav, S., & Malav, L. C. (2019). Hazardous heavy metals contamination of vegetables and food chain: Role of sustainable remediation approaches - A review. En Environmental Research (Vol. 179). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108792

Kumari, D., Pan, X., Lee, D. J., & Achal, V. (2014). Immobilization of cadmium in soil by microbially induced carbonate precipitation with Exiguobacterium undae at low temperature. International Biodeterioration and Biodegradation, 94, 98–102. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.007

Kumari, S., & Das, S. (2019). Expression of metallothionein encoding gene bmtA in biofilm-forming marine bacterium Pseudomonas aeruginosa N6P6 and understanding its involvement in Pb(II) resistance and bioremediation. Environmental Science and Pollution Research, 26(28), 28763–28774. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05916-2

Lafuente, B., Downs, R., Yang, H., & Stone, N. (2015). The power of databases: the RRUFF project. En T. Armbruster & R. Danisi (Eds.), Highlights in Mineralogical Crystallography (pp. 1–30).

Lai, H. J., Cui, M. J., & Chu, J. (2023). Effect of pH on soil improvement using one-phase-low-pH MICP or EICP biocementation method. Acta Geotechnica, 18(6), 3259–3272. https://doi.org/10.1007/s11440-022-01759-3

Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., & Han, W. (2019). A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques. En Soil and Sediment Contamination (Vol. 28, Número 4, pp. 380–394). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1592108

Li, S., Li, M.-Y., Sun, H.-J., Li, H.-B., & Ma, L. (2020). Lead bioavailability in different fractions of mining- and smelting-contaminated soils based on a sequential extraction and mouse kidney model. Environmental Pollution, 262, 114253. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114253

Li, T., Di, Z., Yang, X., & Sparks, D. L. (2011). Effects of dissolved organic matter from the rhizosphere of the hyperaccumulator Sedum alfredii on sorption of zinc and cadmium by different soils. Journal of Hazardous Materials, 192(3), 1616–1622. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.086

Li, X., Peng, W., Jia, Y., Lu, L., & Fan, W. (2016). Bioremediation of lead contaminated soil with Rhodobacter sphaeroides. Chemosphere, 156, 228–235. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.098

Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W., & Yao, H. (2017). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.023

Lin, P. Y., Wu, H. M., Hsieh, S. L., Li, J. S., Dong, C., Chen, C. W., & Hsieh, S. (2020). Preparation of vaterite calcium carbonate granules from discarded oyster shells as an adsorbent for heavy metal ions removal. Chemosphere, 254. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126903

Liu, X., Zhang, S., Wu, W., & Liu, H. (2007). Metal sorption on soils as affected by the dissolved organic matter in sewage sludge and the relative calculation of sewage sludge application. Journal of Hazardous Materials, 149(2), 399–407. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.003

Liu, Y., Tie, B., Li, Y., Lei, M., Wei, X., Liu, X., & Du, H. (2018). Inoculation of soil with cadmium-resistant bacterium Delftia sp. B9 reduces cadmium accumulation in rice (Oryza sativa L.) grains. Ecotoxicology and Environmental Safety, 163(July), 223–229. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.081

Lizarazo, M. F., Herrera, C. D., Celis, C. A., Pombo, L. M., Teherán, A. A., Piñeros, L. G., Forero, S. P., Velandia, J. R., Díaz, F. E., Andrade, W. A., & Rodríguez, O. E. (2020). Contamination of staple crops by heavy metals in Sibaté, Colombia. Heliyon, 6(7). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04212

Lu, K., Yang, X., Gielen, G., Bolan, N., Ok, Y. S., Niazi, N. K., Xu, S., Yuan, G., Chen, X., Zhang, X., Liu, D., Song, Z., Liu, X., & Wang, H. (2017). Effect of bamboo and rice straw biochars on the mobility and redistribution of heavy metals (Cd, Cu, Pb and Zn) in contaminated soil. Journal of Environmental Management, 186, 285–292. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.068

Luo, K., Zhou, J. X., Huang, Z. L., Wang, X. C., Wilde, S. A., Zhou, W., & Tian, L. (2019). New insights into the origin of early Cambrian carbonate-hosted Pb-Zn deposits in South China: A case study of the Maliping Pb-Zn deposit. Gondwana Research, 70, 88–103. https://doi.org/10.1016/J.GR.2018.12.015

Mahanty, B., Kim, S., & Kim, C. G. (2013). Assessment of a Biostimulated or Bioaugmented Calcification System with Bacillus pasteurii in a Simulated Soil Environment. Microbial Ecology, 65(3), 679–688. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0137-4

Mangayil, R., Santala, V., & Karp, M. (2011). Fermentative hydrogen production from different sugars by Citrobacter sp. CMC-1 in batch culture. International Journal of Hydrogen Energy, 36(23), 15187–15194. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.08.076

Mansouri, B., Rezaei, A., Sharafi, K., Azadi, N., Pirsaheb, M., Rezaei, M., & Nakhaee, S. (2024). Mixture effects of trace element levels on cardiovascular diseases and type 2 diabetes risk in adults using G-computation analysis. Scientific Reports, 14(1), 5743. https://doi.org/10.1038/s41598-024-56468-6

Masindi, V., & Muedi, K. L. (2018). Environmental Contamination by Heavy Metals. En Heavy Metals. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.76082

McBride, M. B. (2013). Arsenic and lead uptake by vegetable crops grown on historically contaminated orchard soils. Applied and Environmental Soil Science, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/283472

Mclaughlin, M. J., Smolders, E., Degryse, F., & Rietra, R. (2011). Dealing with Contaminated Sites. En Dealing with Contaminated Sites. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9757-6

Mo, T., Jiang, D., Shi, D., Xu, S., Huang, X., & Huang, Z. (2022). Remediation mechanism of “double-resistant” bacteria—Sedum alfredii Hance on Pb- and Cd-contaminated soil. Ecological Processes, 11(1). https://doi.org/10.1186/s13717-021-00347-9

Montaño-Salazar, S. M., Lizarazo-Marriaga, J., & Brandão, P. F. B. (2018). Isolation and Potential Biocementation of Calcite Precipitation Inducing Bacteria from Colombian Buildings. Current Microbiology, 75(3), 256–265. https://doi.org/10.1007/S00284-017-1373-0/METRICS

Montoya, C., Márquez, M. A., María López, J., & Cuervo, C. (2005). Caracterización de cristales de calcita bioprecipitada por un aislamiento nativo de Bacillus subtilis. Revista Colombiana de Biotecnología.

Mukhopadhyay, S., Masto, R. E., Tripathi, R. C., & Srivastava, N. K. (2018). Application of Soil Quality Indicators for the Phytorestoration of Mine Spoil Dumps. En Phytomanagement of Polluted Sites: Market Opportunities in Sustainable Phytoremediation. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813912-7.00014-4

Naik, M. M., & Dubey, S. K. (2013). Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. Ecotoxicology and Environmental Safety, 98, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.039

Oliveira, M. L. S., Valença, G. O., Pinto, D., Moro, L. D., Bodah, B. W., de Vargas Mores, G., Grub, J., Adelodun, B., & Neckel, A. (2023). Hazardous Elements in Sediments Detected in Former Decommissioned Coal Mining Areas in Colombia: A Need for Environmental Recovery. Sustainability (Switzerland), 15(10). https://doi.org/10.3390/su15108361

Oliveira, R., Hammer, P., Guibal, E., Taulemesse, J. M., & Garcia, O. (2014). Characterization of metal-biomass interactions in the lanthanum(III) biosorption on Sargassum sp. using SEM/EDX, FTIR, and XPS: Preliminary studies. Chemical Engineering Journal, 239, 381–391. https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.042

Peng, D., Qiao, S., Luo, Y., Ma, H., Zhang, L., Hou, S., Wu, B., & Xu, H. (2020). Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and

soil. Journal of Hazardous Materials, 400(June), 123116. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123116

Peng, J., & Liu, Z. (2019). Influence of temperature on microbially induced calcium carbonate precipitation for soil treatment. PLoS ONE, 14(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218396

Qiao, S., Zeng, G., Wang, X., Dai, C., Sheng, M., Chen, Q., Xu, F., & Xu, H. (2021). Multiple heavy metals immobilization based on microbially induced carbonate precipitation by ureolytic bacteria and the precipitation patterns exploration. Chemosphere, 274. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129661

Qin, S., Zhang, H., He, Y., Chen, Z., Yao, L., & Han, H. (2023). Improving radish phosphorus utilization efficiency and inhibiting Cd and Pb uptake by using heavy metal-immobilizing and phosphate-solubilizing bacteria. Science of the Total Environment, 868(November 2022). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161685

Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. Environment International, 125, 365–385. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067

Ramos-Zúñiga, J., Gallardo, S., Martínez-Bussenius, C., Norambuena, R., Navarro, C. A., Paradela, A., & Jerez, C. A. (2019). Response of the biomining Acidithiobacillus ferrooxidans to high cadmium concentrations. Journal of Proteomics, 198(September 2018), 132–144. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.013

Remick, K. A., & Helmann, J. D. (2023). The elements of life: A biocentric tour of the periodic table. En Advances in Microbial Physiology (Vol. 82, pp. 1–127). https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2022.11.001

Rigoletto, M., Calza, P., Gaggero, E., Malandrino, M., & Fabbri, D. (2020). Bioremediation methods for the recovery of lead-contaminated soils: A review. En Applied Sciences (Switzerland) (Vol. 10, Número 10, p. 17). https://doi.org/10.3390/app10103528

Rodriguez-Blanco, J. D., Shaw, S., & Benning, L. G. (2011). The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, via vaterite. Nanoscale, 3(1), 265–271. https://doi.org/10.1039/c0nr00589d

Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K. Ben, & Gonzalez-Muñoz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by Myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization. Applied and Environmental Microbiology, 69(4), 2182–2193. https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003

Rodríguez, O. E., Hernández, D. R., Andrade, W. A., Celis, C. A., Pombo, L. M., Teherán, A. A., Forero, S. P., Velandia, J. R., & Díaz, F. E. (2022). Effect of Sample Sources on Heavy Metal Concentration Measured in Beta Vulgaris Organs. Journal of Environmental and Public Health, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/4968739

Rucińska-Sobkowiak, R., Nowaczyk, G., Krzesłowska, M., Rabeda, I., & Jurga, S. (2013). Water status and water diffusion transport in lupine roots exposed to lead. Environmental and Experimental Botany, 87, 100–109. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.09.012

Salles, F. J., Diaz-Quijano, F. A., Luz, M. S., de Almeida, G. A., Akiba, N., de Oliveira, A. P., Elias, A. de C., Rogero, M. M., & Olympio, K. P. K. (2024). Low levels of potentially toxic elements in workers are associated with self-reported health outcomes. Science of the Total Environment, 947(January), 174510. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174510

Saran, A., Fernandez, L., Cora, F., Savio, M., Thijs, S., Vangronsveld, J., & Merini, L. J. (2020). Phytostabilization of Pb and Cd polluted soils using Helianthus petiolaris as pioneer aromatic plant species. International Journal of Phytoremediation, 22(5), 459–467. https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1675140

Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehim, A., & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. En Chemosphere (Vol. 171, pp. 710–721). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116

Sharma, S., Tiwari, S., Hasan, A., Saxena, V., & Pandey, L. M. (2018). Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. 3 Biotech, 8(4). https://doi.org/10.1007/s13205-018-1237-8

Sheng, M., Peng, D., Luo, S., Ni, T., Luo, H., Zhang, R., Wen, Y., & Xu, H. (2022). Micro-dynamic process of cadmium removal by microbial induced carbonate precipitation. Environmental Pollution, 308. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119585

Shi, J., Xu, Q., Zhou, Z., Wu, X., Tong, J., Cai, Q., Wu, Q., & Shi, J. (2021). Controlling Factors and Prediction of Lead Uptake and Accumulation in Various Soil–Pepper Systems. Environmental Toxicology and Chemistry, 40(5), 1443–1451. https://doi.org/10.1002/etc.4997

Shilpa, O., Anupama, K. P., Antony, A., & Gurushankara, H. P. (2021). Lead (Pb) induced Oxidative Stress as a Mechanism to Cause Neurotoxicity in Drosophila melanogaster. Toxicology, 462(June), 152959. https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152959

Shu, X., Yin, L. Y., Zhang, Q. F., & Wang, W. B. (2012). Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of Jatropha curcas L. Environmental Science and Pollution Research, 19(3), 893–902. https://doi.org/10.1007/s11356-011-0625-y

Sim, C. S. F., & Ting, A. S. Y. (2017). Metal removal from multi-metal solutions by metal-tolerant Stenotrophomonas maltophilia isolated from river sediment. Desalination and Water Treatment, 68, 267–273. https://doi.org/10.5004/dwt.2017.20330

Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2014). Fundamentals of analytical chemistry (9th ed.). Cengage - Brooks/Cole.

Song, M., Ju, T., Meng, Y., Han, S., Lin, L., & Jiang, J. (2022). A review on the applications of microbially induced calcium carbonate precipitation in solid waste treatment and soil

remediation. Chemosphere, 290, 133229. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133229

Strock, J. S. (2008). Ammonification. En Encyclopedia of Ecology (pp. 162–165). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00256-1

Sun, S., Chen, J., Wang, Y., Leng, F., Zhao, J., Chen, K., & Zhang, Q.-C. (2021). Molecular mechanisms of heavy metals resistance of Stenotrophomonas rhizophila JC1 by whole genome sequencing. Archives of Microbiology, 203(5), 2699–2709. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02271-0

Sun, Y., Kokko, M., & Vassilev, I. (2023). Anode-assisted electro-fermentation with Bacillus subtilis under oxygen-limited conditions. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 16(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s13068-022-02253-4

Sun, Y., Li, Y., Xu, Y., Liang, X., & Wang, L. (2015). In situ stabilization remediation of cadmium (Cd) and lead (Pb) co-contaminated paddy soil using bentonite. Applied Clay Science, 105–106, 200–206. https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.12.031

Tamayo-Figueroa, D. P., Castillo, E., & Brandão, P. F. B. (2019). Metal and metalloid immobilization by microbiologically induced carbonates precipitation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35(4), 1–10. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2626-9

Tamayo Figueroa, D. P. (2023). Reparación de grietas en materiales base cemento empleando cultivos bacterianos axénicos y mixtos [Universidad Nacional de Colombia]. https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/85319

Tan, S. C., Zhou, J. X., Li, B., & Zhao, J. X. (2017). In situ Pb and bulk Sr isotope analysis of the Yinchanggou Pb-Zn deposit in Sichuan Province (SW China): Constraints on the origin and evolution of hydrothermal fluids. Ore Geology Reviews, 91(September), 432–443. https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2017.09.012

Tang, C. S., Yin, L. yang, Jiang, N. jun, Zhu, C., Zeng, H., Li, H., & Shi, B. (2020). Factors affecting the performance of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) treated soil: a review. Environmental Earth Sciences, 79(5). https://doi.org/10.1007/S12665-020-8840-9

Teng, Z., Shao, W., Zhang, K., Huo, Y., Zhu, J., & Li, M. (2019). Pb biosorption by Leclercia adecarboxylata: Protective and immobilized mechanisms of extracellular polymeric substances. Chemical Engineering Journal, 375(May), 122113. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122113

Tessier, A., Campbell, P. G. C., & Bisson, M. (1979). Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. Analytical Chemistry, 51(7), 844–851. https://doi.org/10.1021/ac50043a017

Thums, C. R., Farago, M. E., & Thornton, I. (2008). Bioavailability of trace metals in brownfield soils in an urban area in the UK. Environmental Geochemistry and Health, 30(6), 549–563. https://doi.org/10.1007/s10653-008-9185-6

Trujillo-González, J. M., Torres-Mora, M. A., Serrano-Gómez, M., Castillo-Monroy, E. F., Ballesta, R. J., & Rodrigo-Comino, J. (2022). Mapping Potential Toxic Elements in Agricultural and Natural Soils of the Piedemonte Llanero in Colombia. Water, Air, and Soil Pollution, 233(4). https://doi.org/10.1007/s11270-022-05550-8

Trushina, D. B., Bukreeva, T. V., Kovalchuk, M. V., & Antipina, M. N. (2014). CaCO3 vaterite microparticles for biomedical and personal care applications. Materials Science and Engineering C, 45, 644–658. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.050

Udovic, M., & Lestan, D. (2009). Pb, Zn and Cd mobility, availability and fractionation in aged soil remediated by EDTA leaching. Chemosphere, 74(10), 1367–1373. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.013

Vázquez, A., & Peña De Ortiz, S. (2004). Lead (Pb+2) impairs long-term memory and blocks learning-induced increases in hippocampal protein kinase C activity. Toxicology and Applied Pharmacology, 200(1), 27–39. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.03.011

Veerasingam, S., & Venkatachalapathy, R. (2014). Estimation of carbonate concentration and characterization of marine sediments by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Infrared Physics and Technology, 66, 136–140. https://doi.org/10.1016/j.infrared.2014.06.005

Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., & Dekkers, E. M. J. (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. Water Research, 12(6), 399–402. https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0

Vimalnath, S., & Subramanian, S. (2018). Studies on the biosorption of Pb(II) ions from aqueous solution using extracellular polymeric substances (EPS) of Pseudomonas aeruginosa. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 172(August), 60–67. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.024

Wang, C., Lu, J., Zhang, S., Wang, P. F., Hou, J., & Qian, J. (2011). Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte Vallisneria natans. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(5), 1297–1303. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.005

Wang, L., Yu, K., Li, J. S., Tsang, D. C. W., Poon, C. S., Yoo, J. C., Baek, K., Ding, S., Hou, D., & Dai, J. G. (2018). Low-carbon and low-alkalinity stabilization/solidification of high-Pb contaminated soil. Chemical Engineering Journal, 351(June), 418–427. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.118

Wei, T., Yashir, N., An, F., Imtiaz, S. A., Li, X., & Li, H. (2022). Study on the performance of carbonate-mineralized bacteria combined with eggshell for immobilizing Pb and Cd in water and soil. Environmental Science and Pollution Research, 29(2), 2924–2935. https://doi.org/10.1007/s11356-021-15138-0

Wong, C. S. C., & Li, X. D. (2004). Pb contamination and isotopic composition of urban soils in Hong Kong. Science of the Total Environment, 319(1–3), 185–195. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00403-0

Woo, J., Choi, M., & Song, Y. (2023). Spatio-temporal accumulation and sources of anthropogenic Pb in Ulleung Basin sediments, East/Japan Sea, based on stable Pb isotope ratios. Environmental Science and Pollution Research, 30(38), 89442–89458. https://doi.org/10.1007/s11356-023-28773-6

Wu, Z., Zheng, R., Liu, G., Liu, R., Wu, S., & Sun, C. (2021). Calcium protects bacteria against cadmium stress via reducing nitric oxide production and increasing iron acquisition. Environmental Microbiology, 23(7), 3541–3553. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15237

Xie, Y. X., Cheng, W. C., Xue, Z. F., Rahman, M. M., & Wang, L. (2024). Deterioration phenomenon of Pb-contaminated aqueous solution remediation and enhancement mechanism of nano-hydroxyapatite-assisted biomineralization. Journal of Hazardous Materials, 470. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134210

Xue, Z. F., Cheng, W. C., Wang, L., & Hu, W. (2022). Effects of bacterial inoculation and calcium source on microbial-induced carbonate precipitation for lead remediation. Journal of Hazardous Materials, 426. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128090

Yan, X., Liu, X., Zhang, M., Wang, J., Zhong, J., Ma, D., Tang, C., & Hu, X. (2021). Lab-scale evaluation of the microbial bioremediation of Cr(VI): contributions of biosorption, bioreduction, and biomineralization. Environmental Science and Pollution Research, 28(18), 22359–22371. https://doi.org/10.1007/s11356-020-11852-3

Yang, J., Pan, X., Zhao, C., Mou, S., Achal, V., Al-Misned, F. A., Mortuza, M. G., & Gadd, G. M. (2016). Bioimmobilization of heavy metals in acidic copper mine tailings soil. Geomicrobiology Journal, 33(3–4), 261–266. https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1068889

Yang, Y., Li, G., Min, K., Liu, T., Li, C., Xu, J., Hu, F., & Li, H. (2022). The potential role of fertilizer-derived exogenous bacteria on soil bacterial community assemblage and network formation. Chemosphere, 287(P3), 132338. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132338

Yang, Z., Liu, Z., Zhao, F., Yu, L., Yang, W., Si, M., & Liao, Q. (2023). Organic acid, phosphate, sulfate and ammonium co-metabolism releasing insoluble phosphate by Klebsiella aerogenes to simultaneously stabilize lead and cadmium. Journal of Hazardous Materials, 443(November 2022). https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130378

Ye, J., Zhang, Q., Liu, G., Lin, L., Wang, H., Lin, S., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Q., Jia, X., & He, H. (2022). Relationship of soil pH value and soil Pb bio-availability and Pb enrichment in tea leaves. Journal of the Science of Food and Agriculture, 102(3), 1137–1145. https://doi.org/10.1002/jsfa.11450

Yu, H., Zhang, G., Cai, Y., & Dong, F. (2021). Altering the substituents of salicylic acid to improve Berthelot reaction for ultrasensitive colorimetric detection of ammonium and atmospheric ammonia. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 413(23), 5695–5702. https://doi.org/10.1007/s00216-021-03485-3

Zagorac, D., Müller, H., Ruehl, S., Zagorac, J., & Rehme, S. (2019). Recent developments in the Inorganic Crystal Structure Database: theoretical crystal structure data and related features. Journal of Applied Crystallography, 52(5), 918–925. https://doi.org/10.1107/S160057671900997X

Zeng, Y., Chen, Z., Lyu, Q., Wang, X., Du, Y., Huan, C., Liu, Y., & Yan, Z. (2022). Mechanism of microbiologically induced calcite precipitation for cadmium mineralization. Science of the Total Environment, 852. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158465

Zhang, C., Li, X., Lyu, J., & Li, F. (2020). Comparison of carbonate precipitation induced by Curvibacter sp. HJ-1 and Arthrobacter sp. MF-2: Further insight into the biomineralization process. Journal of Structural Biology, 212(2). https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107609

Zhang, J., Su, P., & Li, L. (2022). Bioremediation of stainless steel pickling sludge through microbially induced carbonate precipitation. Chemosphere, 298(March), 134213. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134213

Zhang, K., Xue, Y., Zhang, J., & Hu, X. (2020b). Removal of lead from acidic wastewater by bio-mineralized bacteria with pH self-regulation. Chemosphere, 241, 125041. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125041

Zhang, L., Wang, W., Yue, C., & Si, Y. (2024). Biogenic calcium improved Cd2+ and Pb2+ immobilization in soil using the ureolytic bacteria Bacillus pasteurii. Science of the Total Environment, 921. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171060

Zhang, N., Lin, M., Yamada, K., Kano, A., Liu, Q., Yoshida, N., & Matsumoto, R. (2020c). The effect of H2O2 treatment on stable isotope analysis (δ13C, δ18O and Δ47) of various carbonate minerals. Chemical Geology, 532(October 2019), 119352. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.119352

Zhou, X., Ye, L., & Wu, J. C. (2013). Efficient production of l-lactic acid by newly isolated thermophilic Bacillus coagulans WCP10-4 with high glucose tolerance. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(10), 4309–4314. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4710-7

Zhu, T., & Dittrich, M. (2016). Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review. En Frontiers in Bioengineering and Biotechnology (Vol. 4, Número JAN). https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00004

Zhu, X., Li, W., Zhan, L., Huang, M., Zhang, Q., & Achal, V. (2016). The large-scale process of microbial carbonate precipitation for nickel remediation from an industrial soil. Environmental Pollution, 219, 149–155. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.047

Zhu, Z., Wang, J., Liu, X., Yuan, L., Liu, X., & Deng, H. (2021). Comparative study on washing effects of different washing agents and conditions on heavy metal contaminated soil. Surfaces and Interfaces, 27, 101563. https://doi.org/10.1016/J.SURFIN.2021.101563

Zia, M. H., Codling, E. E., Scheckel, K. G., & Chaney, R. L. (2011). In vitro and in vivo approaches for the measurement of oral bioavailability of lead (Pb) in contaminated soils: A review. Environmental Pollution, 159(10), 2320–2327. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.043

Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Maqsood, M., Hussain, M., Ishfaq, M., Ahmad, M., & Anjum, M. Z. (2019). Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. Journal of Environmental Management, 250. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109557