



Artículo de investigación

<https://doi.org/10.61767/mjte.003.1.2134>

Baltazar-Quezada et al., 2024

Recibido: 24-11-2023

Revisado: 09-01-2024

Aceptado: 24-03-2024

Publicado: 05-05-2024

Acumulación de metales pesados por protozoarios ciliados de vida libre y pedunculados

Accumulation of heavy metals by free-living and pedunculated ciliated protozoa

M. Baltazar-Quezada¹, S. García-Hernández², F. J. Martínez-Valdez¹ y M. Quezada-Cruz^{1*}

¹ Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Universidad Tecnológica de Tecámac, Km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca. Col. Sierra Hermosa, C.P. 55740, Estado de México, México.

² División Económico Administrativas, Universidad Tecnológica de Tecámac, Km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca. Col. Sierra Hermosa, C.P. 55740, Estado de México, México.

* Corresponding author: mquezadac@uttecamac.edu.mx

Resumen

El estudio se enfocó en determinar la capacidad que tiene el protozoario ciliado de vida libre *Tetrahymena* sp. y un consorcio de protozoarios ciliados pedunculados (*Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* y *Epistylis* sp.) para acumular metales pesados. Se probaron tres medios de cultivo (trigo, avena, BE) para obtener el mejor crecimiento de *Tetrahymena* sp. El estudio se realizó en presencia de cuatro metales (cadmio, cobre, hierro y plomo) en una concentración de 50 mg/L, en presencia de dos fuentes de carbono diferentes, glucosa y el hidrolizado de la degradación de plumas de pollo. Los protozoarios se mantuvieron a 100 rpm, en oscuridad y a 19-24 °C. El mejor medio de cultivo para el crecimiento de *Tetrahymena* sp. fue el de trigo con una densidad de 3.55×10^4 protozoarios/100mL. Los protozoarios pedunculados identificados fueron *Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* y *Epistylis* sp. En el caso de *Tetrahymena* sp. se observó un bajo porcentaje de acumulación de metales (7.15+/-3.87 y 6.84+/-2.50). Los protozoarios pedunculados tuvieron la capacidad acumular Co>Cd>Fe>Pb en presencia de glucosa y Cd>Pb>Co>Fe en presencia de hidrolizado de la degradación de plumas de pollo. La acumulación de los metales pesados fue factible, de tal manera que la máxima cantidad de metal acumulado fue de 48.25+/-3.66 % por el consorcio de protozoarios peritricos en presencia de cadmio con el hidrolizado como fuente de carbono.

Palabras clave: metales pesados, *Tetrahymena* sp., *Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria*, *Epistylis* sp.



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

Abstract

The study aimed to determine the capacity of the free-living ciliated protozoan *Tetrahymena* sp. and a consortium of pedunculated ciliated protozoa (*Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria*, and *Epistylis* sp.) to accumulate heavy metals. Three culture media (wheat, oat, BE) were tested to obtain the best growth of *Tetrahymena* sp. The study was conducted in the presence of four metals (cadmium, copper, iron, and lead) at a concentration of 50 mg/L, with two different carbon sources, glucose, and hydrolyzate chicken feather degradation. The protozoa were maintained at 100 rpm, in darkness, and at 19-24 °C. The best culture medium for *Tetrahymena* sp. growth was wheat with a density of 3.55×10^4 protozoa/100mL. The pedunculated ciliated protozoa identified were *Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria*, and *Epistylis* sp. *Tetrahymena* sp. showed a low percentage of metal accumulation (7.15+/-3.87 and 6.84+/-2.50). The pedunculated ciliated protozoa could accumulate Co>Cd>Fe>Pb in the presence of glucose and Cd>Pb>Co>Fe in the presence of hydrolyzate chicken feather degradation. Accumulation of heavy metals was feasible, with the maximum amount of accumulated metal being 48.25+/-3.66% by the peritrichous protozoa consortium in the presence of cadmium with hydrolyzed feathers as a carbon source.

Keywords: Heavy metals, *Tetrahymena* sp., *Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria*, *Epistylis* sp.

1. Introducción

En la actualidad, industrias como la tecnológica, agropecuaria y automotriz, día con día producen y desechan una gran cantidad de contaminantes al ambiente como los metales pesados. En los procesos que se trabajan con metales pesados se encuentra el galvanizado, la plomería, minería, pintura y reparación de baterías, todos muy comunes (Rodríguez, 2017). Estos elementos causan problemas como la esterilidad de suelos, intoxicación de mantos acuíferos, daños a la flora y fauna de ecosistemas y desarrollo de enfermedades en los seres humanos (Brutti *et al.*, 2018). Otro ejemplo es la industria de la nanotecnología, que ha creado productos innovadores en bastas áreas como la biología, química, medicina y física (Bundschuh *et al.*, 2018), sin embargo, su impacto en el medio ambiente así como en el ser humano es un factor que llama mucho la atención, ya que algunas nanopartículas están hechas o contienen metales como arsénico, zinc, cobre y titanio, entre otros (Zou *et al.*, 2013; Mortimer *et al.*, 2010; Mosquera *et al.*, 2015) y a largo plazo podrían causar problemas graves.

En México, dada su toxicidad y abundancia los metales más contaminantes son mercurio, arsénico, plomo y cromo; entre los sitios más afectados por las altas concentraciones de estos metales pesados en suelos se encuentran los estados de Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí (Covarrubias y Peña, 2016). Además, el país ha sido uno de los principales productores de plata a nivel mundial, no obstante, esta actividad causa daños de gran impacto por la cantidad de metales que contienen, así como la ausencia de tratamiento de los mismos (Moreno-Trovar *et al.*, 2012; Covarrubias y Peña, 2016).

Para dar solución a lo anterior, se ha registrado el uso de diversos organismos y microorganismos como remediadores de contaminación por metales pesados, algunos de ellos son *Heliantus annus* (Girasol) y *Sea mays* (Maíz), que han presentado capacidad de absorber grandes cantidades de uranio, cadmio y plomo respectivamente (Mojiri, 2011; Delgadillo- López *et al.*, 2011), bacterias como *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas* sp. han sido utilizadas para el



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

tratamiento de mercurio, plomo, cadmio, níquel, cobre y zinc (Wei et al., 2019; Kamika y Momba, 2013; Munive et al., 2020, Orji et al., 2021), algas como *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis* y *Dunaliella* sp. han presentado capacidad de acumulación de zinc, cobre, cadmio y cobalto (Khatiwada et al., 2020; Chiellini et al., 2020). También, algunos hongos han presentado capacidad para acumular metales pesados (Akpoy y Muchie, 2010). Algunos protozoarios flagelados y de vida libre como *Peranema* sp., *Tetrahymena thermophila*, *Aspidisca* sp., *Trachelophyllum* sp. y *Paramecium caudatum* cuentan con la capacidad de acumular metales pesados como el cobre, cadmio, zinc, cobalto, cromo, níquel y plomo (Kumar et al., 2017; Liu et al., 2017). Sin embargo, existe poca información de los protozoarios, en específico ciliados peritricos pedunculados, y su habilidad como bioacumuladores de metales pesados en comparación con las algas, hongos y bacterias (Kamika y Momba, 2015). Por lo anterior, el trabajo se enfoca en determinar la capacidad que tiene un protozoario ciliado de vida libre (*Tetrahymena* sp.) y un consorcio de protozoarios como *Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* (pedunculados solitarios) y *Epistylis* sp. (pedunculado colonial) para acumular metales pesados como el cadmio, cobre, hierro y plomo en presencia de glucosa o hidrolizado de la degradación de plumas de pollo como dos probables fuentes de carbono. Adicionalmente, se probaron medios de cultivo con trigo, avena y un medio BE para determinar la mejor opción para el crecimiento de protozoarios ciliados de vida libre (*Tetrahymena* sp.).

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento y crecimiento de protozoarios

Ciliados de vida libre. Para el crecimiento de los protozoarios ciliados de vida libre se probaron tres medios de cultivo (avena, trigo y medio BE). En el caso del medio con avena y de trigo, se trituraron por separado 25 granos de avena y 25 granos de trigo y se colocaron en matraces de 500 mL, se adicionaron 200 mL de agua destilada y se esterilizaron en una autoclave vertical marca EVAR modelo EV-30 a 121 °C, 15 lb/in² por 15

minutos. El medio BE se preparó de acuerdo con Fried et al. (2002), se adicionaron a 250 mL de agua destilada, 25.8 mg de acetato de sodio, 50.0 g de peptona, 15.8 mg de sulfato de amonio, 11.0 mg de fosfato de potasio KH₂PO₄, 3.5 g de KCl y 0.8 g de extracto de levadura; la mezcla se esterilizó a 121 °C, 15 lb/in² por 15 minutos. En un recipiente de plástico se recolectaron 500 mL de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales del Parque Estatal Sierra Hermosa, Tecámac, Edo. Méx. Se tomaron 50 ml de la muestra y se filtraron en papel Whatman de 0.45 μm y el sólido retenido (microorganismos) en el filtro se adicionó a cada uno de los medios de cultivo con agua destilada. El pH se midió con un potenciómetro HANNA modelo pH211 y se mantuvo en 7.5. Los matraces con medios de cultivo y protozoarios se dejaron en oscuridad a 21-25°C y se agitaron 3 veces al día de manera manual. El medio de cultivo se cambió cada 3 días en zona estéril reemplazando el 90% del medio de cultivo. Para determinar el crecimiento (densidad) de los protozoarios ciliados de vida libre se utilizó una cámara de Neubauer (Mortimer et al., 2010), se tomaron 25 μL del cultivo y se adicionaron 25 μL de lugol al 0.1% para inmovilizar los protozoarios. El conteo se llevó a cabo a los 0, 2, 4, 7 y 10 días en un microscopio marca Nikon ECLIPSE Ni-U a 40x. El cálculo de la densidad se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{No. de células}}{\text{No. de cuadros contados}} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{\text{LAP mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times \text{FD}$$

DONDE:

L= Longitud de la cámara de Neubauer

A= Ancho de la cámara de Neubauer

P= Profundidad de la cámara de Neubauer

FD= Factor de dilución

Ciliados pedunculados. Para el crecimiento de los protozoarios ciliados peritricos pedunculados coloniales y solitarios se inoculó un reactor por lote secuencial o también conocido como Secuencing Batch Reactor (SBR) empacado con



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

tezontle; el inóculo fue el lodo obtenido de la planta de tratamiento de lodos activados Sierra Hermosa, Tecámac, Edo. de México y fue alimentado cada 24 horas con agua residual del lavado de la sección de conejos de la empresa "Alimentos BALTA" ubicada en Temascalapa, México. La concentración de oxígeno fue siempre >2 mg/L (se midió con un medidor digital de oxígeno Smart Sensor). El biorreactor tuvo un volumen útil de 2.8 L y funcionó con ciclos típicos de alimentación (1.8 L de agua residual) cada 24 horas, aeración-reacción, sedimentación (20 minutos) y descarga. La temperatura se mantuvo de 19-24° C y el pH en 7.5. El SBR tuvo buenas eficiencias de remoción de materia orgánica medida como carbono orgánico total (COT) en promedio de 80.92% y la concentración de nitrógeno amoniacal del efluente fue de 0.02 a 0.2 mg/L. El COT y el nitrógeno amoniacal se midió en un analizador Shimadzu TOC-VSN modelo TOC-UVCSN. Después de un mes de funcionamiento del reactor, se sacaron tres tezontles y se enjuagaron tres veces con agua destilada. Posteriormente, se despegaron los protozoarios pedunculados con un pincel de pelo de camello y se colocaron en vasos de precipitado.

2.2 Identificación de protozoarios pedunculados

Una vez que se obtuvo el crecimiento de los protozoarios en los medios de cultivo y en el SBR, se realizó su identificación a partir de técnicas micrográficas y de tinción de acuerdo con Rivas-Castillo *et al.*, (2022). Para lo anterior, se tomaron 25 μ L de cada muestra y se extendieron con una pipeta Pasteur acostada y girandola en círculos en un portaobjetos (previamente lavado con dextrán, enjuagado con ácido nítrico al 10% y enjuagado con agua destilada). Después, se observaron las muestras en zig zag con los objetivos de 20 y 40x en un microscopio Nikon Eclipse Ni-U. Se marcaron con un plumón de punto fino los bordes del portaobjetos donde se encontraba algún protozoario para observar tamaño, forma y movimiento. Posteriormente, para fijar las muestras en el portaobjetos se dejaron secar al aire durante dos horas. Las dos tinciones realizadas a los protozoarios fueron la

MFD (Hematoxilina Delafield y Fijador de Morrison) y FD (Hematoxilina Delafield) (Rivas-Castillo *et al.*, 2022). Ambas técnicas resaltaron características importantes de los protozoarios ciliados pedunculados solitarios y coloniales como los núcleos, pedúnculos, estriaciones y espasmonema.

2.3 Acumulación de metales pesados

Se preparó agua sintética con la mezcla de cuatro metales pesados; cadmio, cobre, hierro y plomo (en forma de sales de sulfato, CdSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 y PbSO_4) en una concentración de 50 mg/L en 150 mL de agua destilada en matraces Erlenmeyer de 200 mL. Es decir, una concentración de 230, 310, 320 y 160 μ M de Cd, Cu, Fe y Pb respectivamente. A todos los matraces se les adicionó una solución de nutrientes cuya composición fue (g/L): 0.5 de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 0.18 de nitrato de potasio (KNO_3) (Akport *et al.*, 2008). Se probaron dos diferentes fuentes de carbono: D-glucosa anhidro estéril (2.5 g/L) y el hidrolizado (sedimento) de la degradación biológica de plumas de pollo esterilizado en concentración de 2.5 g/L (Pahua-Ramos *et al.*, 2017). La solución de metales se inoculó con un ciliado de vida libre (*Tetrahymena* sp.) en una concentración de 1×10^3 protozoarios/mL o con un consorcio de protozoarios pedunculados (*Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* y *Epistylis* sp.) en una concentración de 1×10^3 protozoarios/mL. Se realizó una cinética de crecimiento de protozoarios, de tal manera que en la fase exponencial (día 4-10) se tomaron 3 muestras (triplicado) y se realizó el conteo de protozoarios presentes en cada mililitro. Posteriormente se adicionó la cantidad de mililitros necesarios en cada matraz para poder llegar a la cantidad de microorganismos deseada (1×10^3 protozoarios/mL). Se adicionó una mezcla de antibióticos de tetraciclina y estreptomycin (100 μ g/mL) para eliminar infecciones por bacterias y hongos. Los matraces se pusieron en un agitador orbital marca BARNSTEAD International LAB/LINE modelo SHKA200 a 100 rpm, en un lugar oscuro a 19-24 °C. Un matraz con la mezcla de metales y



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

sin inóculo se utilizó como control. Todo el estudio se realizó por triplicado.

2.4 Determinaciones analíticas

En todos los matraces se midió el pH con un potenciómetro HANNA modelo pH211 al inicio y al final de la experimentación. Asimismo, se midió la temperatura durante todo el proceso con un termómetro de mercurio marca Brannan.

Para determinar la concentración de metales pesados en el medio de cultivo, se separó la biomasa (protozoarios) del líquido por centrifugación a 3000 rpm durante 7 min en una centrífuga digital marca HERMLE modelo Z300, el sobrenadante se recogió y se filtró en una membrana de 0.22 μm para eliminar todas las células como lo indica Martín-González *et al.*, (2006). Las muestras se digirieron en una solución de ácido sulfúrico (99%):ácido nítrico (70%) en partes iguales de acuerdo con el método descrito por APHA, AWWA y WCPF (2022). Después de las digestiones, las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica marca GBC Scientific Equipment modelo Savant AA. El flujo de gas que se utilizó fue de aire/acetileno y se verificó la sensibilidad del espectrofotómetro con una mezcla comercial de estándares de metales pesados marca SCP Science de 1000 ppm. Las muestras se pasaron por triplicado. El cálculo de la concentración de cada metal pesado en la muestra se realizó de acuerdo con el método descrito por APHA, AWWA y WCPF (2022). El cálculo de la acumulación de metales pesados en las células se determinó por la diferencia entre la concentración inicial de los metales y la concentración final obtenida por medio de absorción atómica como se indica en Martín-González *et al.*, (2006).

2.5 Estadísticos

El diseño experimental empleado fue completamente al azar. Para el crecimiento de protozoarios en los diferentes medios de cultivo (avena, trigo y medio BE) se calculó la densidad de microorganismos, posteriormente se realizó un ANOVA seguido de la prueba de Tukey para distinguir grupos con diferencias significativas;

ambas pruebas estadísticas se realizaron en el programa Real Statistics. Para distinguir grupos con diferencias significativas entre las fuentes de carbono y la acumulación de metales pesados se calculó la diferencia entre la concentración inicial y final, posteriormente se realizaron los mismos análisis estadísticos (ANOVA y Tukey), pero en esta ocasión se desarrolló en el programa R.

3. Resultados y discusión

3.1 Aislamiento y crecimiento de protozoarios

Ciliados de vida libre. Los protozoarios ciliados de vida libre crecieron en todos los medios de cultivo (avena, trigo y BE) (Figura 1) y la especie predominante fue *Thetrahymena* sp. (Figura 2); este protozoario se caracteriza por ser un ciliado eucariota unicelular (Nusblat *et al.*, 2017), tiene cuerpo piriforme con una pequeña abertura oral situada en el tercio anterior de la célula. Su tamaño es de 25-90 μm , tiene una vacuola pulsátil en el extremo posterior y un macronúcleo esférico (Isac, 2008). En todos los medios de cultivo, la etapa de adaptación estuvo comprendida entre los primeros siete días, posteriormente se dió una etapa de crecimiento con una densidad máxima de 3.25×10^4 , 2.910×10^4 y 1.46×10^4 protozoarios/100mL en medio trigo, avena y BE respectivamente; valores similares a los obtenidos por Marín (2017), cuyas densidades estuvieron comprendidas en un intervalo de 1.98×10^3 a 2.60×10^4 células /100 mL en una infusión de hojuelas de avena triturradas, granos de trigo y arroz cocido.

El análisis de varianza (Tabla1) indicó que hubo diferencia significativa del 1% al evaluar el crecimiento de los protozoarios con los diferentes medios de cultivo. La prueba de Tukey indicó que no hubo diferencia significativa en el crecimiento de los protozoarios en medio de avena o trigo, pero si hubo diferencia significativa al comparar cada medio de cultivo con el testigo.

La estrategia con medio de cultivo de trigo, presencia de luz, agitación manual tres veces al día y recambio del 80% de medio de cultivo por nuevo, de 3 a 4 días permitió los mejores



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

resultados del crecimiento de protozoarios de aguas residuales con respecto a la supervivencia y número de organismos. El medio trigo fue estratégico, ya que se menciona que para los protozoos bacterívoros, la forma más sencilla de enriquecer una muestra es agregar granos hervidos de cebada, trigo o arroz, que promueven el crecimiento de bacterias y, por lo tanto, producen una fuente de alimento para éstos microorganismos (Warren y Esteban, 2019).

Tetrahymena sp. con frecuencia se alimenta de los restos de organismos microscópicos como bacterias, que crecen en medio de trigo debido a sus alto contenido de nutrientes tales como, minerales (fósforo, zinc, selenio, potasio, hierro) y bajo contenido de sodio o sales minerales: elementos catalíticos, calcio, magnesio, sodio, potasio, cloro, azufre, silicio, zinc, manganeso, cobalto, cobre, yodo, arsénico, vitaminas A, B, E, K, D, PP y fermentos, del mismo modo, la humedad que guarda el medio es un factor que favorece la proliferación para dichos microorganismos (Hernández et al., 2002).

Los resultados reportados por Jacobsen (1988), indican que *Tetrahymena* sp. es capaz de aprovechar una variedad de fuentes de fosfato para su crecimiento y multiplicación, permitiendo el crecimiento del protozoario a un ritmo de más de 6 generaciones en 18 horas. En el medio BE del presente estudio, la fuente de fósforo que

aprovechó esta especie fue el fosfato monopotásico, mientras que en el estudio realizado por Jacobsen se utilizó fosfato dibásico hidratado. En el experimento de Jacobsen, para el día 5 y a pH constante de 7.5, *Tetrahymena* sp. había alcanzado una duplicación en su crecimiento, lo que coincide con el crecimiento obtenido en medio BE, pues a pH de neutro, para el día 5 el crecimiento fue aproximadamente 1×10^4 protozoarios/L.

Ciliados pedunculados. Las técnicas micrográficas y de tinción (Figura 3) permitieron identificar a tres ciliados pedunculados *Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* y *Epistylis entzii*.

Isac et al. (2008) menciona que los protozoarios indican parámetros de calidad de acuerdo con su abundancia en el sistema; en el caso del reactor SBR indicaron la buena calidad del agua pues la abundancia de *Vorticella* sp. se asocia con buenas condiciones de aireación y un adecuado funcionamiento en el reactor. Los protozoarios ciliados sésiles identificados como *Epistylis* sp. indican excelente calidad del efluente depurado y buen rendimiento en la depuración (a bajas descargas másicas, altos tiempos de retención celular, óptima oxigenación y nitrificación en el sistema) respectivamente.

Tabla 1. Crecimiento de protozoarios en tres medios de cultivo

Medio de cultivo	Crecimiento de <i>Tetrahymena</i> sp. $\times 10^3/100\text{mL}$)
Testigo	0 ^a
Avena	29.10 ^c
Trigo	31.55 ^c
BE	16.80 ^b



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

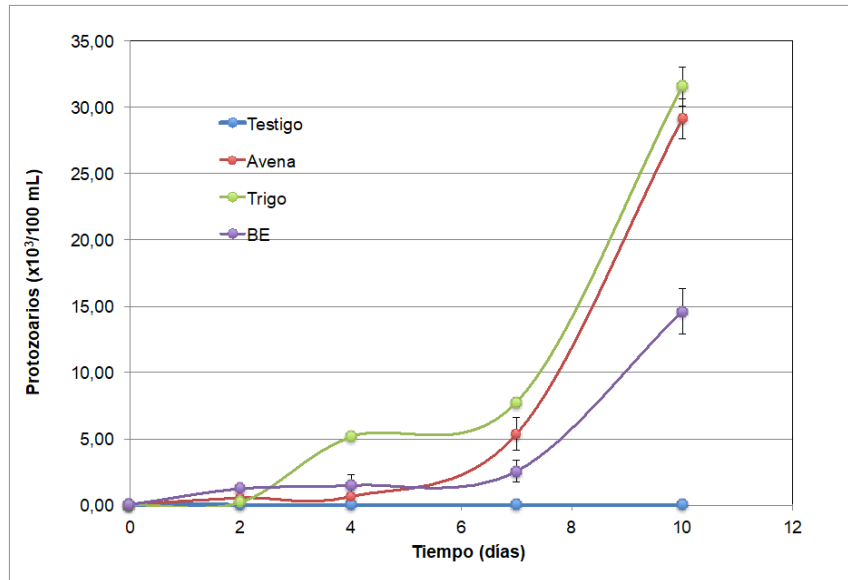


Figura 1. Crecimiento de *Tetrahymena* sp. en avena, trigo y medio BE.

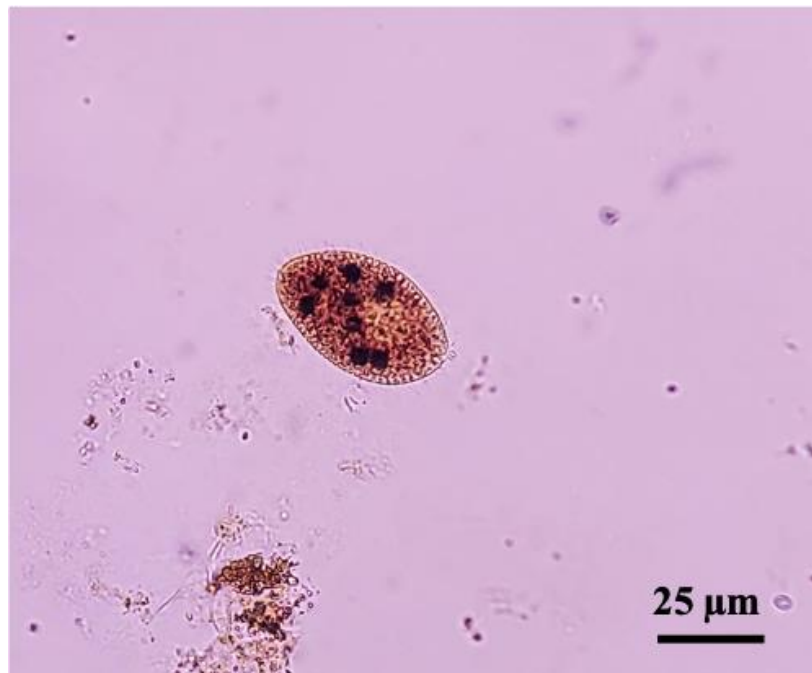


Figura 2. *Tetrahymena* sp. con Lugol al 0.05 %. Microscopía óptica a 20x.



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

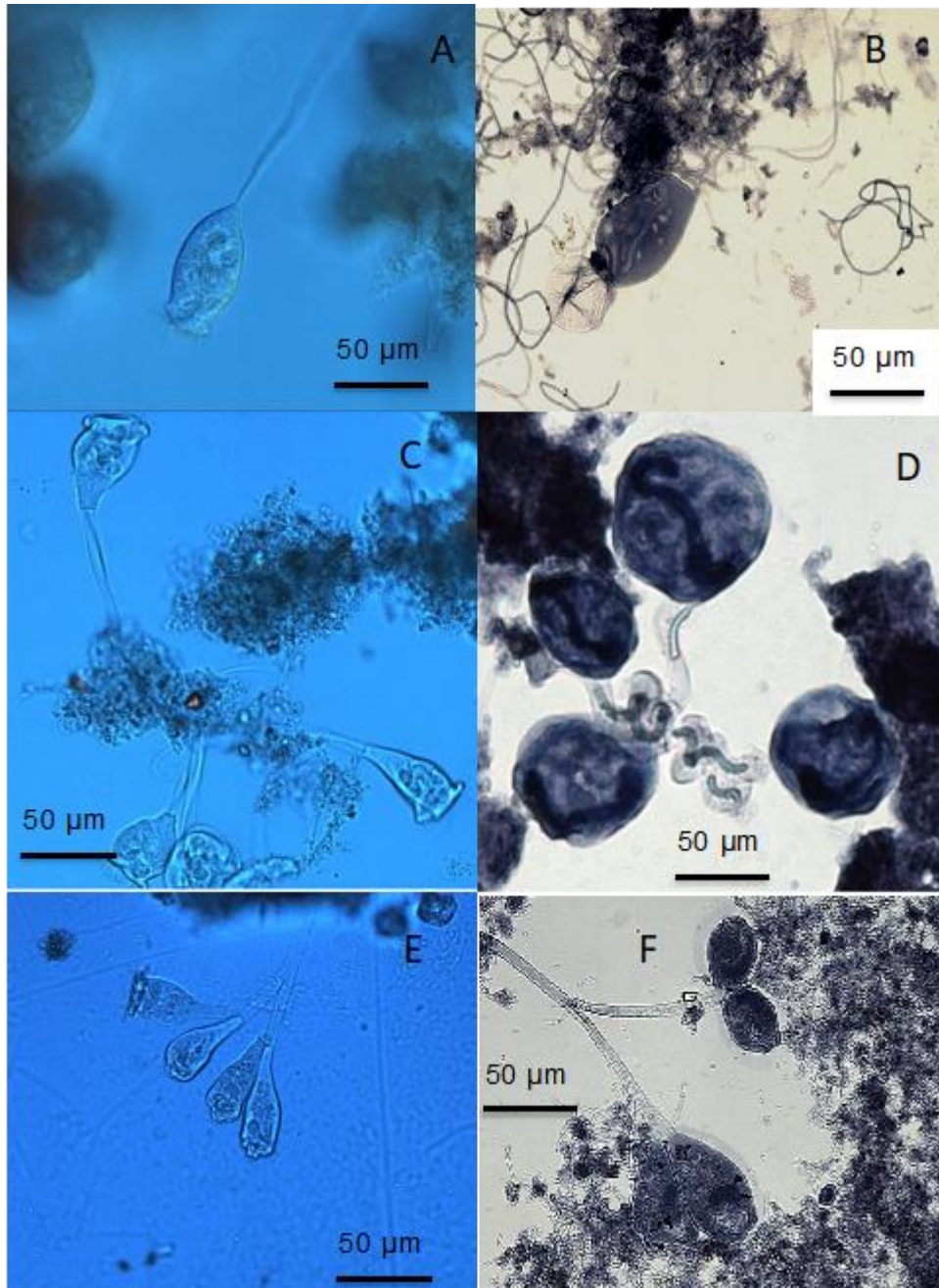


Figura 3. A) *Vorticella alpestris* *in vivo* (peritrico solitario) en técnica de Nomarski. B) *Vorticella alpestris* con tinción FMD (núcleo en forma de "J"). C) pseudocolonia de *Vorticella convallaria* (peritrico solitario) *in vivo* en técnica de Nomarski. D) pseudocolonia de *Vorticella convallaria* con tinción FD (núcleo en forma de "C"). E) *Epistylis* sp. *in vivo* (peritrico colonial) con técnica de Nomarski. F) *Epistylis entzii* con tinción con FD (núcleo en forma de "C").



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

3.2 Acumulación de metales pesados

El análisis de varianza indicó que hubo diferencia significativa en la acumulación de metales pesados tanto para *Tetrahymena* sp. como para el consorcio de protozoarios (*Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* y *Epistylis entzii*) al comparar las diferentes fuentes de carbono en presencia de los diferentes metales. Sin embargo, en el caso de *Tetrahymena* sp., la prueba de Tukey reveló que únicamente hubo diferencia significativa en dos casos, al comparar el testigo con cobre y glucosa y plomo con glucosa. La máxima acumulación de metal por el protozoario *Tetrahymena* sp. fue en presencia de cobre con glucosa, plomo con glucosa, cadmio con hidrolizado y hierro con hidrolizado (Figura 4) y los máximos porcentajes de acumulación estuvieron comprendidos entre 7.15 ± 3.87 y 6.84 ± 2.50 .

En el caso del consorcio de protozoarios pedunculados (*Vorticella alpestris*, *Vorticella convallaria* y *Epistylis entzii*), la prueba de Tukey

mostró que hay diferencia significativa al comparar el testigo con todas las condiciones de metales pesados y las dos diferentes fuentes de carbono, excepto en el caso de hierro con hidrolizado. Se destacan tres grupos, a saber, un primer grupo etiquetado con la letra a que contiene al testigo con ambas fuentes de carbono y la combinación hierro e hidrolizado; un segundo grupo etiquetado con la letra b que contiene las combinaciones glucosa con hierro y plomo; por último, el grupo c con las combinaciones cadmio y glucosa, cobre y glucosa, cadmio e hidrolizado, cobre e hidrolizado y plomo e hidrolizado. La máxima cantidad de metal acumulado por el consorcio de protozoarios fue en presencia de cadmio con hidrolizado de la degradación de plumas de pollo como fuente de carbono (Figura 5). En el caso del consorcio con glucosa como fuente de carbono, el máximo porcentaje de acumulación fue de 36.05 ± 0.58 y con hidrolizado fue de 48.25 ± 3.66 .

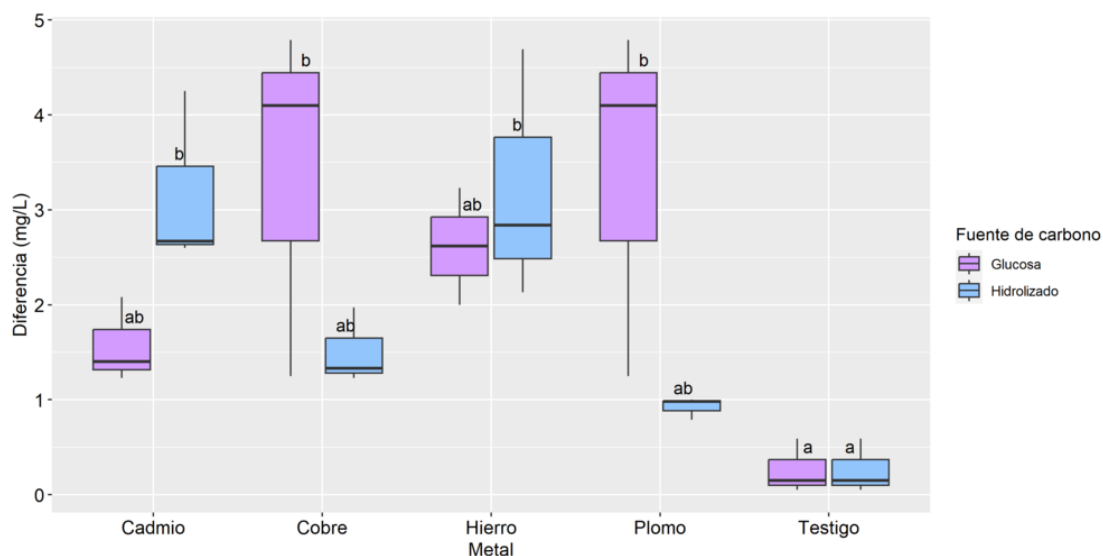


Figura 4. Acumulación de diferentes metales pesados por *Tetrahymena* sp. en presencia de glucosa e hidrolizado como fuente de carbono. Los valores de las letras a y b indican diferencias significativas entre los valores de los promedios, con intervalos de confianza del 99%, de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de comparación múltiple (Tukey).



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

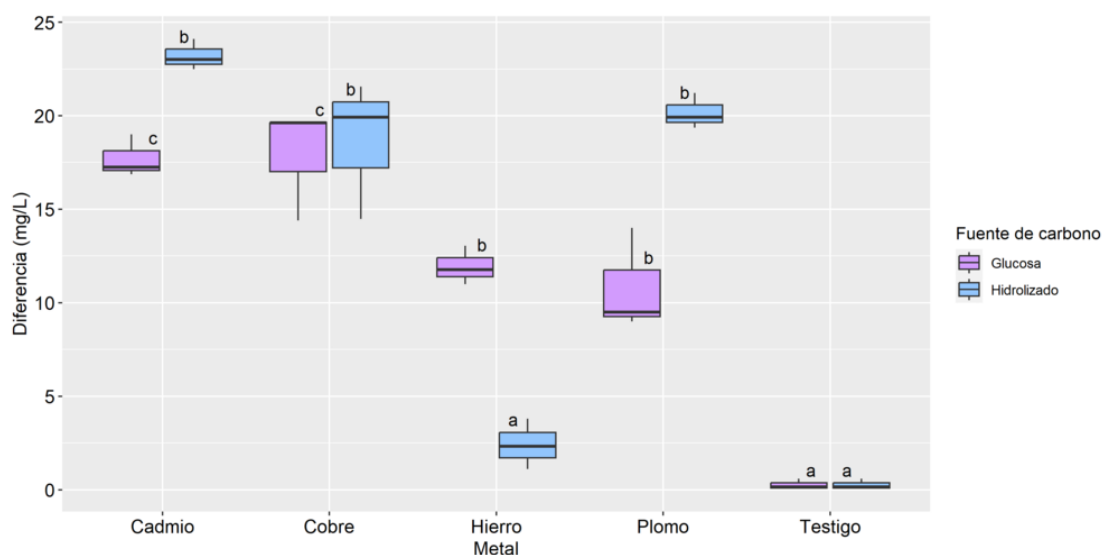


Figura 5. Acumulación de diferentes metales pesados por el consorcio en presencia de glucosa e hidrolizado como fuente de carbono. Los valores de las letras a, b y c indican diferencias significativas entre los valores de los promedios, con intervalos de confianza del 99%, de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis de comparación múltiple (Tukey).

Se ha observado que los patrones generales de toxicidad obtenidos para los protozoos ciliados como *Euplotes* sp. y *Oxytricha* sp. fueron $Cr^{3+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Cr^{6+} > Ni^{2+}$ y los de *Coleps* sp. y *Chilodonella* sp. fueron $Cr^{6+} > Cr^{3+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Ni^{2+}$ (Castro y Marín 2022), resultados similares en el presente trabajo, ya que *Tetrahymena* acumuló más cadmio que plomo. Los autores García-García et al. (2016) mencionan que esto se debe probablemente a varios tipos de adaptación de los protozoos, posiblemente inducida por diversas fuentes, niveles e incidentes de exposición a fuerte contaminación y a las condiciones fisicoquímicas prevaletes. Se ha observado una variedad de diferentes mecanismos desarrollados principalmente en bacterias, protistas y microalgas para acumular metales pesados, siendo los más relevantes aquellos que involucran la biosíntesis de fitoquelatinas y metalotioneínas; metabolismo de fosfato/polifosfato; compartimentación de complejos de metales pesados en vacuolas, cloroplastos y mitocondrias; y secreción de malato y otros ácidos orgánicos, incluso algunos autores mencionan que los miembros de los

géneros *Acanthamoeba* y *Dictyostelium* utilizan metales como zinc (Zn) y cobre (Cu), y posiblemente metaloides, para matar a sus presas bacterianas después de la fagocitosis (Yanshuang et al., 2023). También, se ha reportado que el principal mecanismo de defensa de protozoarios ciliados contra los metales pesados como el Cd, Cu y Zn es la producción de metalotioneínas (Díaz et al., 2006). Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas, ricas en cisteína capaces de unir metales a su estructura (Juárez-Rebollar et al., 2014). En el caso de *Tetrahymena* spp. se menciona que tienen algunas proteínas metalotioneínas que son las encargadas de neutralizar el efecto de los metales pesados Cd, Cu y Zn (Maurya y Pandey, 2020). Otros autores como Wang et al. (2023) mencionan que *Tetrahymena* sp. puede responder a las señales de cadmio y desintoxicarse expresando proteínas como la MT, GPX y GSH.

En un estudio realizado por Tyagi et al. (2012) acerca de la toxicidad por metales, de las 12 especies que identificaron en las aguas



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

residuales, solo los géneros *Vorticella* sp. y *Epistylis* sp. exhibieron la mayor tolerancia contra la toxicidad de metales pesados, además de que mostraron la mayor afinidad de adsorción de metales por Cu, seguido de Zn, Pb, Ni y Cd.

4. Conclusiones

La investigación revela un significativo avance en el entendimiento de *Tetrahymena* sp. y el consorcio de protozoarios como acumuladores de metales pesados. Con resultados notables, donde tres protozoarios del consorcio demostraron una gran capacidad, acumulando el 48.5% de Cadmio. Este estudio es importante porque es un terreno poco explorado, ya que la mayoría de las investigaciones se centran en bacterias acumuladoras de metales pesados y no en protozoarios. La presencia de glucosa y el hidrolizado de plumas de pollo contribuye en la comprensión de estos como fuentes de carbono útiles en el proceso de acumulación de metales, destacando su potencial aplicabilidad en el campo medioambiental y de remediación.

5. Agradecimientos

Se agradece el apoyo técnico del IBT. Cesar Gerardo Rivas Valladares por las determinaciones del crecimiento de los protozoarios ciliados de vida libre y el apoyo de la empresa "Alimentos BALTA" por proporcionarnos los materiales para la construcción del Sequencing Batch Reactor y por las facilidades para la toma de muestras del agua residual del lavado del Departamento de conejos. Se agradece el apoyo técnico de la IBT. Rocío Margarita Ahuatzí Rodríguez por su apoyo en la identificación de *Tetrahymena* sp.

6. Referencias

1. Akport OB, Momba NBM, Okkonkwo JO. The effects of pH and temperature on phosphate and nitrate uptake by wastewater protozoa. Afr. J. Biotechnol. 2008; 7(13): 2221-2226. <http://www.academicjournals.org/AJB>
2. American Public Health Association, American Water Works Association & Water

Environment Federation. 2022. Standard methods for the examination of water and wastewater. 24th Edition. American Public Health Association. Washington D.C, US. <https://doi.org/10.2105/AJPH.51.6.940-a>

3. Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M., Metreveli, G., Schaumann, G., Schulz, R., Wagner, E. (2018). Nanopartículas en el medio ambiente: ¿de dónde venimos, hacia dónde vamos?. Environmental Sciences Europe. 30(6):1-17. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
4. Brutti L., Beltrán M. y García de Salamone (2018) Biorremediación de los recursos naturales. Ed. 1ª. Ediciones INTA Instituto de Suelos, Centro de Investigación de Recursos Naturales Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. pp. 68-78, 386-389.
5. Castro, E. F. L. & Marín, L. J. C. (2022). Ecotoxicological effect of heavy metals in free-living ciliate protozoa of Lake Maracaibo, Venezuela. Journal of water and development. 101-116. <https://www.researchgate.net/publication/357888561>
6. Chiellini C, Guglielminetti L, Pistelli L, Ciurli A. Screening of trace metal elements for pollution tolerance of freshwater and marine microalgal strains: Overview and perspectives. Algal Res. 2020; 45: 101-751. <http://doi:10.1016/j.algal.2019.101751>
7. Covarrubias A, Peña CJ. Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. Rev. Int. de Contam. 2017; 33(1): 7-21. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.esp01.01>
8. Delgadillo- López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. Fitorremediación: una alternativa



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

- para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2011; 14: 597-612.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v14n2/v14n2a2.pdf>
9. Díaz, S., Martín-González, A., & Carlos Gutiérrez, J. (2006). Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. *Environment International*. 32(6):711–717.
<http://doi.10.1016/j.envint.2006.03.004>
 10. Fried J., Ludwig W., Psenner R. and Schleifer K. H. (2002). Improvement of Ciliate Identification and Quantification: a New Protocol for Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Combination with Silver Stain Techniques. *System. Applied Microbiology*. 25:555-571.
<http://www.urbanfischer.de/journals/sam>
 11. García-García J. D., Sánchez-Thomas R., Moreno-Sánchez R. (2016). Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnology Advances* 34:859–873.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.003>
 12. Hernández, A., Plana, R., Martín, G y Santander, J. (2002) Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el suelo ferralítico rojo” en Cultivos tropicales. 23 2):15-20.
<https://www.redalyc.org/pdf/1932/193218114003.pdf>
 13. Isac L., Rodriguez E., Salas L., Fernández N. (2008). Atlas of protists and metazoans present in activated sludge. Presentado en: Jornada Internacional de Tratamiento y Reutilización en Aguas Residuales. Grupo Bioindicación Sevilla. Sevilla, España. pp. 176.
<https://www.researchgate.net/publication/234842687> Atlas de protistas y metazoos presentes en fangos activos
 14. Jacobsen de Florín, M.O. (1988) Exoenzimas en *Tetrahymena*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Argentina. pp. 85.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n2511_JacobsendeFlorinChristensen.pdf
 15. Juárez-Rebollar, Méndez-Armenta, M. (2014). Aspectos funcionales de la metalotioneina en el sistema nervioso central. *Archivos de neurociencias*. 19(1):34-41.
<https://doi.org/10.31157/an.v19i1.28>
 16. Kamika I. and Momba M. NB. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiology*. 13(28):1-14.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/28>
 17. Kamika, I., & Momba, M. N. B. (2015). Effect of nickel on nutrient removal by selected indigenous protozoan species in wastewater systems. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(2):147–156.
<https://doi:10.1016/j.sjbs.2014.09.010>
 18. Khatiwada, B., Hasan, M., Sun, A., Kamath, K., Mirzaei, M., Sunna, A. y Nevalainen, H. (2020). Proteomic response of *Euglena gracilis* to heavy metal exposure—Identification of key proteins involved in heavy metal tolerance and accumulation. *Algal Research* 45:.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101764>
 19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology Evolution*. 33(7):1870-1874. Liu, C., Qu, G., Cao, M., Liang, Y., Hu, L., Shi, J., ... Jiang, G. (2017). Distinct toxicological



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

- characteristics and mechanisms of Hg 2+ and MeHg in *Tetrahymena* under low concentration exposure. *Aquatic Toxicology*, 193, 152–159. <http://doi:10.1016/j.aquatox.2017.10.01410.1016/j.aquatox.2017.10.014>
20. Liu, C., Qu, G., Cao, M., Liang, Y., Hu, L., Shi, J., Cai, J. and Jiang, G. (2017). Distinct toxicological characteristics and mechanisms of Hg 2+ and MeHg in *Tetrahymena* under low concentration exposure. *Aquatic Toxicology*, 193, 152–159. <http://doi:10.1016/j.aquatox.2017.10.01410.1016/j.aquatox.2017.10.014>
21. Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., Gutiérrez, J.C. (2006) Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research in Microbiolog.* 157(72). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.005>
22. Maurya, R., & Pandey, A. K. (2020). Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review. *Science of The Total Environment*, 741, 140058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140058>
23. Marín, J. C., Rincón, N., Diaz-Borrego, L., Morales, E. (2017). Cultivo de protozoarios ciliados de vida libre a partir de muestras de agua del Lago de Maracaibo. *Impacto Científico*. 12(1):157-170. <https://biblat.unam.mx/hevila/Impactocientifico/2017/vol12/no1/11.pdf>
24. Mojiri, A. (2011). The Potential of Corn (*Zea mays*) for Phytoremediation of Soil. Contaminated with Cadmium and Lead. *Journal of Biology Environmental Science*. 5(13):17-22. <https://uludag.edu.tr/dosyalar/jbes/13/mak04.pdf>
25. Moreno, T., R., Téllez, J., Monroy, M. G. (2012). Influencia de los minerales de los jales en la bioaccesibilidad de arsénico, plomo, zinc y cadmio en el Distrito Minero Zimapán, México. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*. 28(3): 203-218. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000300003
26. Mortimer M., Kasemets K., Khru A. (2010). Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophile*. *Toxicology*. 269:182–189. <http://doi:10.1016/j.tox.2009.07.007>
27. Mosquera E., Rosas N., Debut A., Guerrero V.H. (2015). Síntesis y aracterización de nanopartículas de dióxido de titanio obtenidas por el método de Sol-Gel. 36(3):1-7. https://www.researchgate.net/publication/283266714_Sintesis_y_Caracterizacion_de_Nano_particulas_de_Dioxido_de_Titanio_Obtenidas_por_el_Metodo_de_Sol-Gel
28. Munive. C. R., Gamarra S. G., Munive Y. Y., Puertas, R. F., Valdiviezo G. L., Cabello T. R. (2020). Lead and cadmium uptake by sunflower from co., Lorgio ntaminated soil and remediated with organic amendments in the form of compost and vermicompost. *Scientia Agropecuaria*. 11(2): 177–186. <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>
29. Nublant A. D., Sánchez G. M. L., MONTES M. G., Cid N. C., Nudel C. B. (2017). *Revista Farmacéutica*. 159(2):16-31. <https://www.anfyb.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/REVISTA-159-2-2017-Internet.pdf>
30. Orijí O. U., Awoke J. N., Aja P. M., Alope C., Obasi O. D., Alum E. U., Udum-Ibiam O. E. (2021). Halotolerant and metalotolerant bacteria strains with heavy metals bioremediation possibilities isolated from Uburu Salt Lake, Southeastern, Nigeri. *Heliyon*. 7(e07512):1-8.



Artículo de investigación

Baltazar-Quezada et al., 2024

- <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07512>
31. Pahlua-Ramos M. E., Hernández-Melchor D. J., Camacho-Pérez B., (2017). Galicia-García P.R., Cerón-Montes G. I. Degradation of chicken feathers by co-culture of *Alcaligenes* and *Brevundimonas*. *BioTechnology: An Indian Journal*. 3(6):1-11. <http://www.tsijournals.com/journals/archive/t/sbt-volume-13-issue-6-year-2017.html>
 32. Rivas-Castillo A. M., García-Barrera A. A., Garrido-Hernández A., Martínez-Valdez F. J., Cruz-Romero M. S. y Quezada-Cruz. (2022). Peritrichous Protozoa in a Tezontle-Packed Sequencing Batch Reactor as Potential Indicators of Water Quality. *Polish Journal of Microbiology*. 71(4): 539-551. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-049>
 33. Rodríguez H. MsC. D. (2017). Occupational poisoning due to heavy metals. *MEDISAN*. 21(12):3372. https://www.researchgate.net/publication/331013618_Occupational_poisoning_due_to_heavy_metals
 34. Tyagi, V., Bhatia, A., Gaur, R., Ali, M., Khan, A., Khursheed, A., y Kazmi, A. (2012). Effects of multi-metal toxicity on the performance of sewage treatment system during the festival of colors (Holi) in India. *Environmental Monitoring and Assessment*. 184(12):7517-29. <https://pesquisa.bvsalud.org/gim/resource/en/mdl-22270594>
 35. Yanshuang, Y., Yuan-Ping, L., Kexin, R., Xiuli, H., Chi Fru, E., Rønn, R., Rivera, W., Becker, K., Feng, R., Yang, J., Rensing, C. (2023). A brief history of metal recruitment in protozoan predation. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.11.008>
 36. Wang, R., Zhu, Z., Cheng, W., Chang, C., Song, X., & Huang, F. (2023). Cadmium accumulation and isotope fractionation in typical protozoa tetrahymena: A New Perspective on Remediation of Cd Pollution in Wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 454(131517):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131517>
 37. Warren, A., & Esteban, G. F. (2019). Protozoa. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Fourth Edition. Elsevier Inc. 9–42. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-385024-9.00002-2>
 38. Wei Y., Zhao Y., Zhao S., Gao X., Zhengb Y., Zuob H., Weia Z. (2019). Roles of different humin and heavy-metal resistant bacteria from composting on heavy metal removal. *Bioresource Technology*. 1-36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122375>
 39. Zou X.-Y., Xu B., Chang-Ping Y., Zhang H.-W. (2013). Combined toxicity of ferroferric oxide nanoparticles and arsenic to the ciliated protozoa Tetrahymena Pyriformis. *Aquatic Toxicology*. 134-135:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.006>