

Capacidad degradadora de pseudomonas aeruginosa frente a metales pesados presentes en muestras de sedimentos del río Chibunga

David Omar Rojas Ramos, Luis Miguel Romero Echevarría

Universidad Nacional Tecnológica de Lima Sur, Villa el Salvador, Lima, Perú

Recibido el 14 de junio del 2024. Aceptado el 28 de septiembre del 2024. Publicado el 12 de febrero del 2024

Resumen

El presente estudio tiene por objetivo evaluar la capacidad de biodegradación de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* sobre lodos del Río Chibunga como sustrato específico. Para esto se seleccionaron 4 puntos a lo largo del río; se tomó en consideración la susceptibilidad a la contaminación y el impacto ambiental en base a un mapa de uso del suelo. Se realizó el muestreo en los puntos y se llevaron a laboratorio para ser analizados y determinar la concentración de metales pesados antes de iniciar con el tratamiento. Los metales evaluados incluyeron Al, Cu, Ba, Zn, Cd, Ni, Pb, Sr, Ti y Zn. Se determinó la capacidad de tolerancia a los metales pesados por parte de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y se realizaron ensayos de bioaumentación en las muestras recolectadas. Se obtuvo que la bacteria tolera concentraciones de 2 milimolares (mM) de todos los metales pesados, en el caso del Al, Zn y Cu puede resistir concentraciones más altas (5 y 10 mM). La bioaumentación con *Pseudomonas aeruginosa* en las muestras logró reducir la concentración de todos los metales pesados, especialmente Al, Ti y Zn, que disminuyeron hasta un 60% en comparación con las concentraciones iniciales.

Descriptores: *Pseudomona aeruginosa, metales pesados, bioaumentación, colonias bacterianas, biodegradación.*

Abstract

The objective of this study is to evaluate the biodegradation capacity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria on sludge from the Chibunga River as a specific substrate. For this, 4 points along the river were selected; Susceptibility to contamination and environmental impact were taken into consideration based on a land use map. Sampling was carried out at the points and taken to a laboratory to be analyzed and determine the concentration of heavy metals before starting the treatment. Metals evaluated include Al, Cu, Ba, Zn, Cd, Ni, Pb, Sr, Ti and Zn. The tolerance capacity to heavy metals by the *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was determined and bioaugmentation tests were carried out on the collected samples. It was found that the bacteria tolerate concentrations of 2 millimolar (mM) of all heavy metals, in the case of Al, Zn and Cu it can resist higher concentrations (5 and 10 mM). Bioaugmentation with *Pseudomonas aeruginosa* in the samples managed to reduce the concentration of all heavy metals, especially Al, Ti and Zn, which decreased up to 60% compared to the initial concentrations.

Keywords: *Pseudomona aeruginosa, heavy metals, bioaugmentation, bacterial colonies, biodegradation.*

1. Introducción

El río Chibunga nace de las vertientes ubicadas en las faldas del volcán Chimborazo y desciende por los páramos de "El Arenal" hasta llegar a las zonas agrícolas ubicadas en el sector "Parroquia San

Juan", como las comunidades: Chimborazo, Shobol Llinllin, entre otras con el nombre de Río Chimborazo, se une con el río Cajabamba a 3.238 msnm y toma el nombre de río Chibunga [8]. El cauce del Chibunga representa uno de los recursos hídricos con gran incidencia en el

desarrollo de Riobamba pues la atraviesa y a 25 comunidades cercanas [9]. Es importante que las aguas de este río sean descontaminadas por el peligro de intoxicación para los sectores que consumen el agua de manera directa, dichos sectores se encuentran vulnerables ante la contaminación por fertilizantes; además, la presencia de metales pesados es un asunto que vulnera a la población que consume agua de este río. La remoción de metales pesados sin tratamientos apropiados posee un gran impacto en la salud pública debido a su persistencia, biomagnificación y acumulación en la cadena alimenticia [10].

La remoción de contaminantes se presenta como una problemática para la salud pública, para dicha remoción se puede llevar a cabo un proceso en el que se emplea microorganismos conocida como biorremediación [11]. Esta técnica aplicada a los metales pesados es una estrategia que se mostró eficiente por su bajo costo, alta eficiencia, además de ser una solución de bajo impacto en el ambiente [12]. Este proceso implica lograr la transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos, usando enzimas microbianas dando como resultado compuestos poco solubles en agua o bien volátiles. En este caso, el género *Pseudomonas* sp. es uno de los más usados debido a los diversos mecanismos de remediación que posee [13].

El presente trabajo tiene como propósito emplear la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, para obtener la capacidad de estas para reducir las concentraciones de metales pesados presentes en los sedimentos de los alrededores del Río Chibunga, que son comunes y que se encuentran disueltos por la utilización de fertilizantes, pesticidas, abonos químicos y demás desechos de las anteriores actividades mencionadas

2. Metodología

2.1. Materiales

Los materiales utilizados para el muestreo de los sedimentos en campo fueron: Pala manual, Bolsas Ziploc de 5 Kg cada una, GPS, Cooler.

Para generación de mapas de uso de suelo y puntos georreferenciados: Software ArcGis

2.2. Método

Para los puntos de muestreo, se identificaron los puntos más sensibles al impacto generado por actividades: agrícola, agropecuario forestal, y agropecuario mixto y urbana, de donde se consideran los arrastres más grandes de estos

compuestos al agua del río Chibunga y sus alrededores. Según el objetivo de la investigación se realizó un muestreo puntual en cada punto, considerando que fuese la misma estación del año y en la misma fecha. Se consideraron 4 puntos relevantes que tienen una distancia de 4 km entre punto y punto.

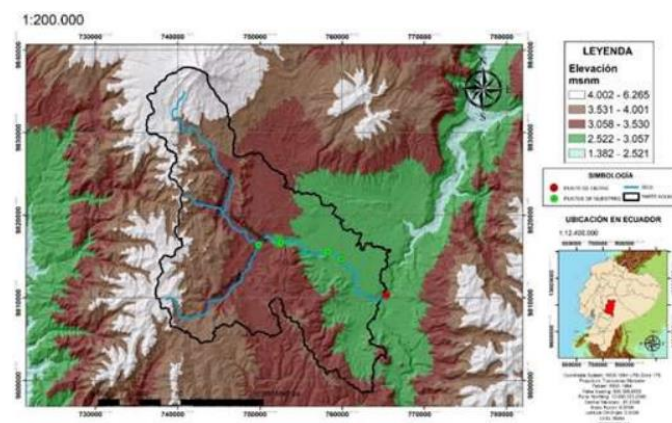


Figura 1: Mapa de ubicación de los puntos de muestreo de sedimentos. (2019)

Para las muestras, se tomaron 10 Kg de sedimentos por punto de muestreo, mismos que fueron almacenados en bolsas de plástico que luego fueron selladas, reduciendo la pérdida de humedad y los contaminantes que puedan afectar la muestra antes de llegar al laboratorio para su análisis.

Para la determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las muestras obtenidas del río Chibunga, se realizaron 4 diluciones seriadas con agua de peptona desde la 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, en donde en 4 matraces de 250ml se colocó 90 ml de agua de peptona dilución 10⁻¹ y se adicionó 10g de cada una de las muestras, luego se colocó en tubos 9 ml de agua de peptona y se adicionó 1 ml de la solución anterior así sucesivamente hasta obtener la dilución 10⁻⁸. Se prepararon 32 cajas de agar nutritivo en donde se sembraron por extensión en superficie las diluciones anteriores y se dejó a 35°C durante 24 horas y se contó las UFC.

La cepa con la que se trabajó es la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La identificación de la cepa se realizó a partir de la serie bioquímica (triple azúcar hierro agar, agar kligler, manitol, citrato, SIM, úrea y pruebas adicionales como catalasa y oxidasa).

Para determinar el nivel de tolerancia de *Pseudomonas aeruginosa* frente a metales pesados, se utilizaron 7 matraces de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo y cada uno con una solución de Na, Zn, Al, Ti, Cd, Cu, y Pb en una concentración de 0.1mg/100ml, para las pruebas se utilizó solo el

metal sin la bacteria, otro sin metal y sin bacteria. Las muestras se inocularon por triplicado y se incubaron a 35 C° durante 24 horas y se determinó el crecimiento por turbidez con la escala Macfarland. Bajo condiciones controladas se seleccionaron las cepas que sean capaces de crecer en caldo nutritivo con metales. Posteriormente fueron trasladadas a un medio mínimo para determinar la capacidad de crecimiento y resistencia a metales pesados. Se colocó el metal en diferentes concentraciones: 2,5, 5 y 10 mM, utilizando como control placas sin metal y se empieza a sembrar la bacteria por extensión en superficie y se determinó la presencia o ausencia de colonias.

También se debe determinar el índice de saturación de los sedimentos; para ello, se coloca a 170g de lodos aproximadamente un tubo con agujeros y en un cristalizador y se adiciono 20ml de agua durante 24 horas, donde después se midió con una probeta la cantidad de agua restante. Este método sirvió para poder colocar la cantidad de mililitros de bacterias en dilución a distintas concentraciones. Para la bioaumentación de sedimentos con *Pseudomonas aeruginosa* se utilizaron matraces de 250ml con 50ml de caldo nutritivo, enriquecido con glucosa, en donde se inoculó las bacterias con mayor cantidad de crecimiento de los metales y se dejó incubar en condiciones especiales de 35°C durante 24 horas, se comparó la turbidez con el estándar 0.5 McFarland, luego se realizaron diluciones seriadas 10-1 hasta 10-8 en agua de peptona y se sembraron por extensión en superficie de todas las diluciones y se dejó incubar durante 24horas a 35°C, y se contaron las UFC hasta que se puedan contar las colonias. Las diluciones que presentaron mayor crecimiento en masa bacteriana fueron seleccionadas para la inoculación de los sedimentos, usando diferentes concentraciones de acuerdo con el índice de saturación de cada muestra anteriormente obtenido. Los sedimentos inoculados fueron colocados en gavetas durante 30 días a temperatura ambiente, repitiéndose la inoculación bacteriana cada día hasta el fin del experimento.

En determinación de la cantidad de metales pesados en los lodos después de aplicar la bacteria se aplicó el método de determinación por espectrómetro de absorción atómica, el mismo que se aplicó al inicio del análisis para determinar la cantidad de metales obtenidos después de aplicar el tratamiento.

3. Resultados

El elemento que presentó una mayor concentración mg/Kg es el aluminio (Al), con un promedio de 12183 mg/Kg y el segundo elemento con mayor concentración en las muestras evaluadas fue el Titanio (Ti), con valores promedio de 566.1 mg/Kg; dichos valores en todas las muestras de suelo. Metales como El Cd y el Pb mostraron los valores más bajos, con concentraciones de <0.25 y <0.10 respectivamente.

Tabla 1: Concentración de metales presentes en suelo antes del tratamiento (mg/Kg)

Muestras	Al	Ti	Cd	Pb
1	12020.00	694.00	<0.25	<0.10
2	10755.00	607.00	<0.25	<0.10
3	13120.00	314.80	<0.25	<0.10
4	1284.00	648.50	<0.25	<0.10

Sobre la saturación de agua en el suelo, se sabe que depende de forma directa de su textura y estructura, siendo los suelos arenosos los que muestran un drenaje más rápido en comparación con suelos más compactos o arcillosos [14]. Los resultados presentados en la siguiente tabla, nos indican que la muestra de suelo 2, presentó el menor volumen de saturación y la muestra 1 que presentó el índice más alto. Esto nos sugiere que una de las zonas estudiadas es más propensa a la pérdida de agua, lo que disminuye la capacidad de absorción del suelo y la capacidad de este para mantener materia orgánica en condiciones, esto es necesario para que el suelo sea apto para la agricultura.

Tabla 2: Índice de saturación de las muestras del Río Chibunga.

Muestras	Masa (g)	Volumen de Saturación (mL)
1	176,82	16
2	167,79	8
3	170,19	11
4	173,78	12

Las pruebas realizadas para la identificación de la especie *Pseudomonas aeruginosa* mostró resultados positivos en 8 de 9 pruebas bioquímicas realizadas, confirmando los criterios de identificación usados para este tipo de bacteria. La característica de la *Pseudomona aeruginosa* con respecto a las otras especies del género, es que puede desarrollarse de manera eficaz tanto en agua

como en suelo con bajo requerimiento nutricional e incluso en ecosistemas hostiles; donde las concentraciones de metales pesados pueden llegar a puntos altos de saturación. Este es de los principales motivos por el que se emplea esta bacteria en el proceso de biorremediación.

Tabla 3: Pruebas bioquímicas para la confirmación de especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Prueba		Criterio de Aceptación	Resultado
TSI		Amarillo	+
Kliger		Rojo	+
Manitol		-	V
Urea		-	V
Citrato		Azul	+
SIM	Indol	Anillo Rojo	
	Movilidad	Turbidez	+
Catalasa		Reacción	+
Oxidasa		Reacción	+
Proteasa		Reacción	+
Lactasa		Reacción	-

+: positivo -: negativo V: variante

También se evaluaron tres medios de cultivo para el crecimiento de la especie empleada: un medio mínimo y dos medios enriquecidos con glucosa y una concentración mínima de Agar Tripticasa Soya (TSA) respectivamente.

Tabla 4: Composición de medios de cultivo para la siembra de *Pseudomonas aeruginosa*.

FORMULACIONES	Compuesto	Masa (g)
FORMULACIÓN 1	K2HPO4	0,165
	KH2PO4	0,018
	MgSO4 7H2O	0,042
	KCl	0,03
	Extracto de levadura	0,0078
	Agar	0,9
FORMULACIÓN 2	K2HPO4	0,03
	NH4Cl	0,06
	Na2SO4	0,12
	KNO3	0,12
	MgSO4 7H2O	0,012
	TSA	0,60
	Agar	0,9
FORMULACIÓN 3	Glucosa	0,60

	NH4SO4	0,3
	MgSO4 7H2O	0,12
	K2HPO4	0,12
	FeSO4 7H2O	0,0006
	Agar	0,9

En la siguiente tabla se muestran los resultados del crecimiento de la bacteria en las 3 formulaciones, sin embargo, el crecimiento fue mucho mayor en la formulación 2 y 3 debido a la presencia de nutrientes como la glucosa

Tabla 5: Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en las diferentes formulaciones.

RESULTADO		DETALLE
Formulación 1	+	Nutrientes mínimos
Formulación 2	+++	Nutrientes TSB
Formulación 3	++	Nutrientes a base de glucosa

+ Poco crecimiento ++ Crecimiento moderado
+++ Crecimiento abundante

Para medir la resistencia de la pseudomona, se probó el crecimiento de la bacteria en diferentes concentraciones de metales: 2mM, 5mM y 10mM. Se emplea el símbolo (+) para poco crecimiento, (++) para crecimiento moderado y (+++) para crecimiento abundante.

En la formulación 1, la bacteria presento bajo crecimiento en la mayoría de metales. Solo en el caso del Al y Ti, la bacteria fue capaz de resistir la mínima concentración de ensayo.

Tabla 6: Crecimiento bacteriano en la formulación 1 con diferentes metales.

	Na	Zn	Al	Ti	Cd	Cu	Pb
2mM	+	+	+	+	+	+	+
5mM	+	+	-	-	+	+	+
10mM	+	+	-	-	+	+	+

En la formulación 2, la bacteria mostró ser más resistente a los metales; siendo frente al Zn donde mostró mayor eficiencia.

Tabla 7: Crecimiento bacteriano en la formulación 2 con diferentes metales.

	Na	Zn	Al	Ti	Cd	Cu	Pb
2mM	++	++	++	++	+	++	++
5mM	-	++	++	-	-	-	++
10mM	-	++	--	--	--	--	-

En la formulación 3, también se visualiza alta resistencia a los metales siendo sobresaliente en las concentraciones de Al y Cu. mostró mayor eficiencia.

Tabla 8: Crecimiento bacteriano en la formulación 3 con diferentes metales.

	Na	Zn	Al	Ti	Cd	Cu	Pb
2mM	++	++	+	++	+	++	++
5mM	-	--	+	-	-	+	--
10mM	-	--	+	--	--	+	--

Todo culmina en la inoculación bacteriana en el suelo. Los datos de concentraciones de metales pesados antes del tratamiento y después del tratamiento, no se considera el Pb y el Cd debido a que las concentraciones en el suelo estaban por debajo de los límites de intervención.

Tabla 9: Concentración de metales antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa*.

Muestra	1		2		3		4	
	A	D	A	D	A	D	A	D
Al mg/Kg	12020	6010	10755	5654	13120	6700	12840	6300
Cu mg/Kg	25.94	18.15	23.85	16.69	27.61	19.33	21.36	14.95
Ba mg/Kg	84.95	62.03	74.80	52.08	103.50	84.50	96.70	73.20
Ni mg/Kg	14.59	10.54	16.03	12.00	18.15	15.15	13.90	9.8
Sr mg/Kg	77.25	57.15	67.20	47.20	70.00	50.50	79.00	59.03
Ti mg/Kg	694.00	329.00	607.00	306.00	314.80	14.80	648.50	328.00
Zn mg/Kg	56.60	26.60	57.40	27.25	108.20	89.50	<0.50	<10

4. Conclusiones

El estudio destaca la capacidad de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* para degradar metales pesados en los sedimentos del Río Chibunga. La comparación de propiedades físico-químicas y concentraciones de metales antes y después de la inoculación bacteriana fue esencial. Se observó una reducción significativa en la concentración de metales pesados, con una disminución promedio del 20-40%, siendo más notable en aluminio y titanio, con reducciones superiores al 50%. Aunque una cepa bacteriana comercial fue efectiva, se sugiere que una cepa nativa podría ser más eficaz. Esto indica una dirección prometedora para futuras investigaciones en biorremediación. Además, el estudio establece las bases para investigaciones posteriores, especialmente en el área del Río Chibunga en la provincia de Chimborazo, donde

podrían realizarse ensayos con consorcios bacterianos que incluyan cepas comerciales y nativas, lo que podría abordar la contaminación de metales pesados de manera más eficiente.

Referencias

- [1] D. Vullo, "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente.", *Química Viva*, vol. 2, no. 3, 93-102, noviembre-2003.
- [2] D. Lujan, "Uso de *Pseudomonas aeruginosa* en biorremediación.", *BioTecnología*, vol. 23, no. 1, 32-37, 2019.
- [3] K. Paredes, L. Santillan & M. Viteri, "Capacidad degradadora de *pseudomonas aeruginosa* frente a metales pesados presentes en muestras de sedimentos del río Chibunga.", *Polo del Conocimiento*, vol. 6, no. 5, 497-514, mayo-2021.
- [4] O. Gutiérrez, L. Navarro, P. Loeza, O. Rodríguez & R. Jiménez, "Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola." *Nova Scientia*, vol. 9, no. 2, 98-110, julio-2017. <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.957>
- [5] L. Yucheng, T. Wenwen, C. Mingyan, M. Lili, B. Yang, L. Qingling & C. Yuayuan, "Un método inducido por el mejillón para fabricar membranas de nanotubos de halloysita/ óxido de grafeno reducido para aplicaciones multifuncionales en la purificación de agua y separación de aceite.", 2017
- [6] N. Veloz & C. Carbonel, "Evaluación de la calidad del agua de la microcuenca del río Chibunga-Ecuador en variaciones estacionales, periodo 2013-2017." *Revista Del Instituto De investigación De La Facultad De Minas, Metalurgia Y Ciencias geográficas*, vol. 21, no. 42, 13-26, diciembre-2018.
- [7] N. Veloz, "Estudio de los factores condicionantes de contaminación que afectan la calidad del agua de la microcuenca del río Chibunga – Chimborazo.", junio-2018.
- [8] A. Arellano, "Manual Técnico del Parque Temático Ricpamba. paseo ambiental. Riobamba, Ecuador.", 2010
- [9] Ilustre Municipio de Riobamba, "Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Riobamba 2015-2030.", *Riobamba, Ecuador: Consejo Cantonal*, 2015.

- [10] F. Fu & Q. Wang, "Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review." *Journal of Environmental Management*, vol. 92, no. 3, 407-418, noviembre-2011.
- [11] H. Liu, F. Xu, Y. Xie, C. Wang, A. Zhang, L. Li, & H. Xu, "Effect of modified coconut shell biochar on availability of heavy metals and biochemical characteristics of soil in multiple heavy metals contaminated soil.", *Science of the Total Environment*, vol. 645, 702-709, diciembre-2018.
- [12] S. Wasi, S. Tabrez, & M. Ahmad, "Suitability of immobilized *Pseudomonas fluorescens* SM1 strain for remediation of phenols, heavy metals and pesticides from water." *Water, Air and Soil Pollution*, vol. 220, 88-99, enero-2011.
- [13] A. Agnello, M. Bagard, E. Hullebusch, G. Esposito, & D. Huguenot, "Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons cocontaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation.", *Science of the Total Environment*, vol. 563, 693-703, septiembre-2016.
- [14] L. Zotarelli, Y. Dukes & T. Morgan, "Interpretación del Contenido de la Humedad del Suelo para Determinar Capacidad de Campo y Evitar Riego Excesivo en Suelos Arenosos Utilizando Sensores de Humedad.", *The Institute of Food and Agricultural Sciences*, vol. 2013, no. 2, enero-2013, <https://doi.org/10.32473/edis-ae496-2013>