

Adaptación de cepas del género Pseudomonas provenientes de composta para la degradación de naproxeno sódico

Romero García, Ximena

2022-12-02

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5575>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Adaptación de cepas del género *Pseudomonas* provenientes de composta para la degradación de naproxeno sódico

Jiménez Vargas Samantha (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Labra López Leillany (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Romero García Ximena (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)^{1,*}, Ramírez Rodríguez Rocío (profesor responsable)¹, López Cruz Lester Emmanuel (profesor asesor)^{1,2}

Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México¹
Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.²

Resumen

Los contaminantes emergentes representan un peligro para el ecosistema, las plantas de tratamiento de aguas residuales no los procesan eficientemente y remanecen en los cuerpos de agua, además no existen legislaciones ni normativas que regulen su uso, estos compuestos son llamados contaminantes emergentes, el naproxeno sódico pertenece a ellos. Ante esta problemática, el uso de microorganismos en los procesos de biorremediación es una posible solución. El objetivo fue generar un cepario, del cual se seleccionaron y aislaron cepas del género *Pseudomonas*. Posteriormente se seleccionaron 4 de las 40 cepas originales que presentaron fluorescencia en medio King B. Las cepas fueron inoculadas en medio mínimo mineral (MM9) con una concentración inicial de 0.3 mM de naproxeno sódico como única fuente de carbono, se cuantificaron las UFC/ml en los tiempos de crecimiento de 0 y 24 horas de los inóculos. Las cepas Ps7, A10, Ps12 crecieron bajo estas condiciones y serán utilizadas para los procesos de adaptación posteriores hasta alcanzar concentraciones mayores de 1-2 mM de naproxeno sódico. En conclusión, se logró el crecimiento de las cepas seleccionadas como posibles *Pseudomonas* en un medio de cultivo restringido utilizando al naproxeno sódico como única fuente de carbono, cuantificando el aumento de las UFC/mL en 3 de las 4 cepas evaluadas.

Palabras clave: antiinflamatorios no esteroideos, biorremediación, contaminantes emergentes, ecotoxicología, microorganismos

***Autor Corresponsal:** 194438@iberopuebla.mx

Introducción

Dentro de la gravedad de la contaminación ambiental de la que ya se tiene conocimiento, se encuentran los riesgos que existen al usar aguas procesadas con porcentajes de contaminantes aún presentes [1]. Las plantas de depuración de aguas residuales convencionales no son eficientes para la remoción de nuevos contaminantes, como los fármacos, las hormonas, los microplásticos, los nanomateriales, entre otros compuestos, que no se consideran dentro de los procesos de tratamiento del agua, y por lo tanto remanecen en ella, entrando en el ciclo del agua del ecosistema [2].

Los compuestos anteriores son conocidos como contaminantes emergentes, los cuales comprenden compuestos químicos que representan un peligro potencial para la salud humana y el medioambiente [1]. La presencia de estos contaminantes en sistemas acuáticos era desconocida hasta hace unos años, por lo tanto, no se preveían las consecuencias de su aparición a mayor escala, estos compuestos han sido detectados en concentraciones de nanogramos sobre litro (ng/L) y microgramos sobre litro (mg/L) lo que hace necesaria una pronta regulación que limite la descarga final de estos compuestos [2].

Dentro de estos efectos podemos encontrar daño directo al sistema inmune, pérdida de peso, crecimiento y cambios en los hábitos alimenticios de algunos organismos acuáticos por su ingesta, a causa de su capacidad bioacumulable. La reducción de fecundidad en algunas especies de peces, o en el ser humano, la afectación a órganos y glándulas como la tiroides, la próstata, los testículos y causando resistencia

bacteriana y microbiana son parte de consecuencias, aumentando las incidencias de alergias, desarrollo de tumores y alteraciones endocrinas [3].

En el estado de Puebla, el río Atoyac posee compuestos químicos contaminantes dentro de su cauce, la mayoría son compuestos volátiles, como benceno, cloroformo y cloruro de vinilo, entre otros. Asimismo, en el río Nexapa se han identificado en sus aguas cafeína, diversos colorantes, productos de cuidado personal, compuestos hormonales y antiinflamatorios no esteroideos como el naproxeno. Esto afecta a más de un millón de personas por su constante exposición siendo un potencial problema de salud pública. [4], [5].

Los fármacos, en especial los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs), como los analgésicos y antipiréticos que reducen la fiebre, la inflamación y alivian dolores, se consideran como contaminantes emergentes. El naproxeno se ha detectado en sistemas acuáticos y es considerado un potencial disruptor hormonal en peces [2].

Derivado de la pandemia de COVID-19, el consumo de AINEs aumentó, el naproxeno sódico fue uno de los fármacos más empleados debido a que se comercializa en venta libre, es decir, sin receta médica [6].

De acuerdo con el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) el naproxeno sódico ha afectado a diversos cuerpos de agua ubicados en México, Colombia, Ecuador y Brasil [1]. Niveles de naproxeno sódico como el reportado en el agua en el Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo en México superan el 1 µg/L en el cause [4].

Este compuesto presenta una vida en los ecosistemas que se define como media-larga, pues perdura en él [4]. Debido al escaso número de investigaciones sobre el tema no existen datos suficientes que determinen el tiempo preciso de vida, por su estructura química es un compuesto inalterable durante varios años, lo cual representa su presencia en lagos, ríos, arroyos, e inquietantemente, en agua potable. Otra de sus características es que es bioacumulable, generando su paso entre organismos a través de la cadena trófica, lo cual significa una mayor toxicidad durante el transcurso del tiempo, incrementándose, aunque de igual manera estas pequeñas concentraciones representan un impacto grande en la salud, principalmente si existe una exposición crónica a estas concentraciones [4].

La presencia del naproxeno tiene efectos tóxicos en organismos acuáticos causando alteraciones bioquímicas y genéticas, estrés oxidativo, problemas endocrinos, inhibición del crecimiento, efectos mutagénicos y, teratogénicos, efectos adversos en la fertilidad y en el sistema inmunológico, sin embargo, sus efectos a largo plazo y ecotoxicidad crónica, y las posibles afectaciones a la salud humana no se han estudiado a fondo [5].

Dentro de las soluciones que se consideran para la eliminación de los contaminantes emergentes se encuentra la biorremediación. Este un proceso que usa diferentes organismos ya sea plantas, levaduras, hongos, bacterias, entre otros, para absorber, degradar o transformar contaminantes para que su efecto en el medio ambiente sea casi nulo. La biorremediación bacteriana, como se puede entender por su nombre, hace uso de bacterias para remediar los sitios contaminados. Dentro de los microorganismos más estudiados para estos procesos se encuentran los géneros de las *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Serratia*, debido a que cuentan con la capacidad de producir biosurfactantes que aumentan la biodisponibilidad de los hidrocarburos en suelo o agua para su degradación [7].

El género *Pseudomonas* es posible encontrarlo habitando en suelos y cuerpos de agua como lagos, ríos, etc. Este género Actúa en el ciclo del carbono, del nitrógeno, la biodegradación y en la descomposición de diversos compuestos. También tienen una gran diversidad metabólica; contienen información genética para la producción de vías enzimáticas responsables de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono, las cuales le permiten desarrollarse y tener un crecimiento óptimo. Asimismo, tienen una gran tolerancia a condiciones ambientales desfavorables, lo que las convierte en herramientas útiles para fines de biorremediación [8]. Por ello, el objetivo del proyecto es adaptar cepas aisladas del género *Pseudomonas*, obtenidas de una muestra de composta casera, utilizando el naproxeno sódico como su única fuente de carbono en el medio de cultivo.

Metodología

Aislamiento de cepas bacterianas del suelo de composta

Se colectó una muestra de 40 gramos de composta casera, la cual se transportó en tubos cónicos estériles y se preservó a 4 °C hasta su uso. Se tomó 1 gramo de suelo de composta y

se disolvió en 10 mL de agua destilada estéril. Se llevo a cabo un aislamiento bacteriano en medios de cultivo especializados.

Se hicieron diluciones seriadas con una concentración de 10-3 µL y se inocularon 100 µL en placas de medio de cultivo Ashby, Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Glucosa-Levadura-Extracto de Malta (GYM) por método de extensión, el proceso se realizó por triplicado, esto con el fin de poder encontrar diversidad microbiana. Las placas fueron incubadas a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, se conformó un cepario de 39 aislados bacterianos. Las cepas se resguardaron en 1mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) más glicerol al 30% a -80 °C en un ultracongelador Thermofisher del laboratorio de biología molecular del IDIT hasta su uso.

Las cepas congeladas se reactivaron para realizar nuevas resiembras, la selección de los aislados del género *Pseudomonas* se realizó mediante la inoculación en medio selectivo King B y LB con cloranfenicol (100 µg/mL) a 35 °C por 24 horas.

Ensayos de adaptación con naproxeno sódico como fuente de carbono

Del cepario, se seleccionaron a los aislados nombrados como Ps6, P7.1, P12 y A10.2 que fueron evaluadas en medio mínimo mineral (MM9) + 0.3 mM de naproxeno sódico (SigmaAldrich Reagent 98-102%). Las cepas se inocularon por separado en medio LB por 12 horas a 30 °C y 180 rpm. A continuación, las células bacterianas fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril por centrifugación a 3500 rpm por 8 minutos para retirar los residuos del medio. Las cepas Ps6, P7.1, P12 y A10.2 fueron inoculadas en matraces con 100 mL de MM9 + 0.3 mM de naproxeno sódico a 30 °C y 180 rpm. Se monitoreó el crecimiento de las cepas a las 0 y 24 horas, cuantificando las UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonia) por el método de Goteo en Placa por Sellado Masivo (GSPM) [8]. Las células fueron recuperadas y cuantificadas en placas Petri MM9 + citrato (250 mM).

Resultados y Discusión

Identificación y selección de las cepas bacterianas del género Pseudomonas

A partir de un cepario de 40 aislados bacterianos obtenidos del suelo de composta se seleccionaron 6 cepas presuntamente del género *Pseudomonas*. Para este propósito se analizó la morfología de cada cepa y la producción de pigmentos como la pioverdina en medio agar selectivo King B, además de su resistencia al antibiótico cloranfenicol. A partir de la presencia de fluorescencia bajo luz UV, característica primordial de muchas especies de *Pseudomonas*, se logró determinar la presencia de 6 posibles cepas del género *Pseudomonas* (Tabla 1.). Posteriormente, para las pruebas de adaptación, únicamente se emplearon 4 de las 6 cepas que presentaron mayor luminiscencia y mejor crecimiento en medio LB + cloranfenicol (100 µg/mL).

Adaptación de las cepas aisladas del género Pseudomonas a naproxeno sódico como única fuente de carbono en el medio

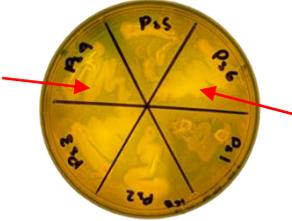
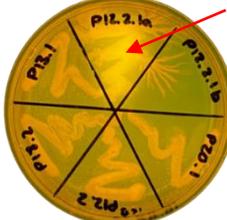
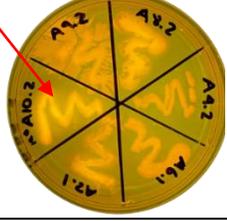
Se evaluaron 4 cepas identificadas microbiológicamente como parte del género bacteriano *Pseudomonas*, para saber si las cepas podían utilizar el naproxeno sódico como parte de su metabolismo catabólico se realizaron pruebas de crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo restringido como el MM9, este medio solo posee sales y minerales traza y al cuál es posible incorporar una fuente de carbono específica, en este caso, el naproxeno sódico. Previo a la inoculación, las cepas fueron crecidas en un pre inoculo de LB a partir de una asada microbiológica con la finalidad de obtener biomasa bacteriana. Los lavados celulares con agua se realizaron para retirar todo nutriente del medio LB y evitar interferencias. Las 4 cepas de *Pseudomonas* fueron inoculadas en 100 mL de MM9 + 0.3 mM de naproxeno sódico y se cuantificó el crecimiento de cada una a las 0 horas

y 24 horas. A partir de la cuantificación de UFC/mL en placa Petri realizadas por el método de GSPM [8], se comparó el crecimiento de las cepas aisladas (Figura 1).

A las 24 horas posteriores de la inoculación, la cepa Ps6 (figura 1b) no creció y disminuyó el número de UFC/mL con respecto a las demás cepas evaluadas. Las tres cepas A10.2, P7.1 y P12 demuestran tener tolerancia y posible uso del naproxeno como su única fuente energética.

Se pudo comprobar que el crecimiento de la cepa A10.2 aumentó a 6.75 LogUFC/mL con respecto a la cuantificada en el tiempo inicial que fue 5.79 LogUFC/mL; la cepa P7.1 aumentó de 6.47 LogUFC/mL en tiempo inicial a 6.58 LogUFC/mL; la cepa P12 aumentó el número de colonias, cuantificándose al inicio 5.41 LogUFC/mL para llegar finalmente a 6.69 LogUFC/mL a las 24 horas; por el contrario, la cepa Ps6 decreció, de 6.45 LogUFC/mL a las 0 horas a 6.22 LogUFC/mL en las 24 horas.

Tabla 1: Crecimiento de posibles bacterias del género *Pseudomonas* en placas de agar King B y su fluorescencia bajo la luz UV. Las flechas rojas indican los aislados del cepario que presentan fluorescencia por la producción del pigmento pioverdina.

Crecimiento de posibles <i>Pseudomonas</i>	Posibles <i>Pseudomonas</i> bajo luz UV
	
	
	

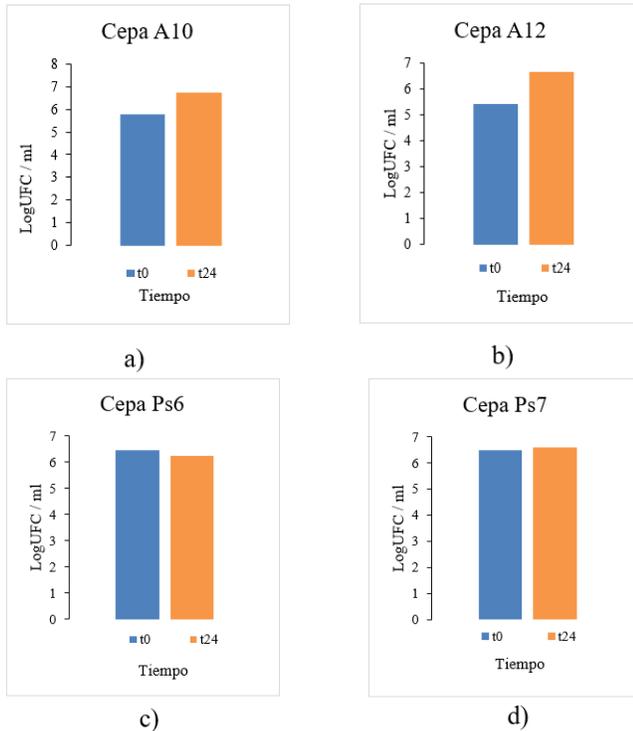
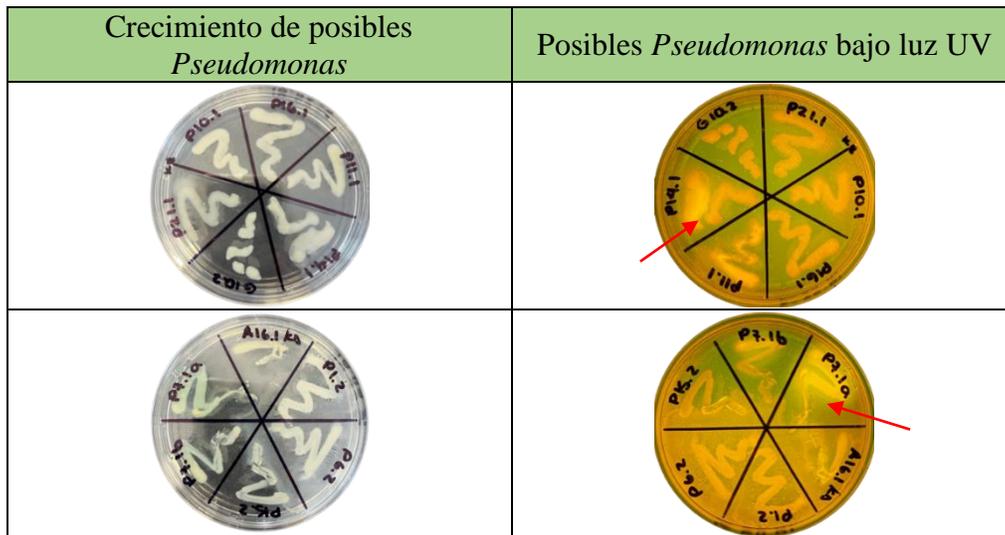


Fig. 1. Crecimiento de las cepas aisladas del género *Pseudomonas* en MM9 + naproxeno [0.3mM]

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

A partir de una estandarización experimental se logró el crecimiento de las cepas seleccionadas como posibles *Pseudomonas* en un medio restringido y con una única fuente de carbono no convencional en el metabolismo de estos microorganismos.

Fue posible cuantificar el aumento de las UFC/mL en 3 de las 4 cepas evaluadas, esto, es una aproximación importante para saber que estas bacterias pueden utilizar el naproxeno sódico para su crecimiento en el medio, debido a que no existe ningún otro compuesto que pueda ser metabolizado para la obtención de energía celular.

Estos experimentos realizados son el primer paso de adaptación en un sistema *in vitro* de cepas con capacidad de degradar contaminantes emergentes sin utilizar co-metabolismo, es decir, sin el uso de alguna fuente de carbono primaria más asimilable como la glucosa o el citrato.

Se realizarán posteriores ensayos aumentando gradualmente la concentración a 0.6, 1 y hasta 2 mM de naproxeno sódico en los medios de cultivo para conocer el límite de crecimiento de las cepas y su efectividad en la degradación del compuesto. Los siguientes ensayos de adaptación se realizarán mediante la re-inoculación de las células crecidas en MM9 + 0.3 mM de naproxeno sódico, las cuáles fueron guardadas a -80°C en un ultracongelador Thermofisher en 1mL de medio de cultivo MM9 más glicerol al 30% para mantener la presión selectiva de la primera adaptación de las tres cepas.

Referencias

1. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. "El desafío de los contaminantes emergentes". gob.mx. <https://www.gob.mx/imta/articulos/el-desafio-de-los-contaminantes-emergentes>
2. Remtavares. "Una nueva forma de eliminar naproxeno de las aguas residuales mediante oxidación húmeda catalítica con catalizadores basados en metales nobles soportados sobre nanoesferas de carbono. - el agua". El Agua. [https://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2021/04/30/133962#:~:text=El%20naproxeno%20\(NPR\)%20es%20uno,humanos,%20entre%20otros%20efectos%20adversos](https://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2021/04/30/133962#:~:text=El%20naproxeno%20(NPR)%20es%20uno,humanos,%20entre%20otros%20efectos%20adversos)
3. "Contaminantes emergentes y su impacto en la salud", *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca*, vol. 35, n.º 2, 2017. [En línea]. Disponible: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/medicina/article/view/1723>
4. I. Moreno, "Degradación electroquímica de contaminantes emergentes de un efluente de la industria farmacéutica", tesis de maestría, Benemérita Universidad Autónoma De Puebla, Puebla, 2017. [En línea]. Disponible: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/599>
5. Herrera, J.A. (2016). *Evaluación de la remoción de contaminantes emergentes de aguas superficiales utilizando humedales de tratamiento* [Tesis de doctorado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional de la BUAP.
6. J.C. Lancharos, C.A. Madera-Parra, A. Caselles-Osorio, W.A. Torres-López, X.M. Vargas-Ramírez, Ibuprofen and Naproxen removal from domestic wastewater using a horizontal subsurface flow constructed wetland coupled to ozonation, *Ecol. Eng.*, vol. 135, pp. 89-97, 2019.
7. L. Obregón. "El naproxeno y su comportamiento como contaminante emergente en el medioambiente - Newsletter | Investigación y Desarrollo". Newsletter | Investigación y Desarrollo - Newsletter | Investigación y Desarrollo. <https://newsletter.cuc.edu.co/2022/04/19/el-naproxeno-y-su-comportamiento-como-contaminante-emergente-en-el-medioambiente/>
8. R. T. Castillo Rogel, F. J. More Calero, M. Cornejo La Torre, J. N. Fernández Ponce y E. L. Mialhe Matonnier, "Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en condorcanqui – amazonas – Perú.", *Revista De Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, vol. 22, n.º 3, pp. 2015–225, julio de 2020. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.18271/ria.2020.656>
9. Reuter. "Biorremediación con *Pseudomonas*". AMEREX - Microbiología aplicada a la industria. <http://www.labamerex.com/novedad027.htm>
10. A. Corral-Lugo, Y. E. Morales-García, L. A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R. D. Martínez-Contreras y J. Muñoz-Rojas, "Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo"", *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, n.º 2, pp. 147–156, 2012. [En línea]. Disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77625517016.pdf>