

Evaluación de un cepario aislado a partir de suelo de composta con la capacidad de crecer en presencia de ibuprofeno como única fuente de carbono

Luna Landa, Isabella

2022-12-02

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5573>

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

Evaluación de un cepario aislado a partir de suelo de composta con la capacidad de crecer en presencia de ibuprofeno como única fuente de carbono

Luna Landa Isabella (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)^{1,*} Ortíz Ríos Sigrid Paola (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Pérez López Mariana (tercer semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Morúa Álvarez Nora del Rocío (profesora responsable)¹ y López Cruz Lester Emmanuel (profesor asesor)².

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México

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

Resumen

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos químicos que pasan desapercibidos por la baja concentración en la que se encuentran en el medio ambiente, no obstante, empieza a destacar, pues generan impactos ecológicos negativos. El ibuprofeno se ha identificado como CE, porque su presencia en cuerpos de agua va de ng/L hasta ug/L; que, aunque es mínima, afecta a los organismos acuáticos, alterando su capacidad hormonal. La aplicación de microorganismos para la degradación de compuestos orgánicos es la pauta para los avances en el tratamiento de cualquier contaminante por lo que se realizó la evaluación de cepas aisladas de suelo de composta para valorar su capacidad de crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de ibuprofeno como única fuente de carbono. Un total de 39 cepas fueron aisladas del suelo, de las cuales todas fueron capaces de crecer en concentraciones de 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM de ibuprofeno.

Palabras clave: Ibuprofeno, contaminantes emergentes, cepario, biorremediación.

***Autor Corresponsal:** isabella.luna@iberopuebla.mx

Introducción

A inicios de los años 2000, el término contaminante emergente (CE) empezó a ser usado para nombrar a las sustancias químicas que presentan potenciales riesgos para los seres humanos y los sistemas ecológicos, incluida la alteración endócrina y la neurotoxicidad [1]. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente [2]. Estos contaminantes entran en el ambiente a través de diferentes vías, como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, residuos de las plantas de tratamiento, efluentes hospitalarios, actividades agrícolas y ganaderas [3-7]. Según la Información Farmacoterapéutica de la Comarca (INFAC) [8], de todos los contaminantes emergentes, los que posiblemente representan una mayor preocupación son los medicamentos, por lo que su estudio se halla entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental.

Dentro de los fármacos más consumidos a nivel mundial, encontramos a los antiinflamatorios, debido a su accesibilidad, de acuerdo con un relevamiento del Sindicato Argentino de Farmacéuticos y Bioquímicos (SAFYB), el 85% de los adultos utiliza analgésicos de venta libre, [9]. En esta clasificación encontramos el naproxeno, acetaminofén y el ibuprofeno, entre otros. El ibuprofeno (IB) es un fármaco

no esteroideo (AINEs) derivado del ácido propiónico con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, [10]. El IB supera por más del doble a los otros compuestos activos como el ácido acetilsalicílico y el paracetamol.

Por sus propiedades hidrofóbicas, biopersistentes y de baja adsorción a la materia orgánica es un compuesto de riesgo en el ambiente [11]. Se ha detectado su presencia en cuerpos de agua e incluso en agua potable, debido a la falta de un tratamiento efectivo para su eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales por métodos convencionales, encontrándose en efluentes finales en concentraciones de ng/L a ug/L [12] y llegando al suelo mediante actividades de riego [13, 14]. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, los metabolitos de este compuesto son capaces de permear hacia las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos, o bien quedar retenidas en el suelo y bioacumularse afectando al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica [15]. Este antiinflamatorio puede causar efectos adversos en organismos acuáticos, inhibiendo su crecimiento, alterando su capacidad hormonal, por lo cual se considera como un disruptor endocrino [16], además de afectar su sistema inmune. En los suelos, éste se acumula y causa efectos tóxicos sobre plantas, provocando la inhibición de la raíz [17].

Debido a la ineficiente remoción de este contaminante previo a la descarga final de las aguas residuales, es necesario generar alternativas de tratamiento para su degradación. El uso de microorganismos como herramienta de biorremediación ha sido empelada para la degradación de nuevos contaminantes, es decir, se los microorganismos y su

capacidad metabólica para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el ambiente [18]. En este proyecto se emplearon bacterias con la capacidad de crecer en presencia de IB en diferentes concentraciones en un medio restringido de nutrientes.

Metodología

Aislamiento de cepas bacterianas de suelo de composta

Se colectaron 40 g de una muestra de suelo de composta casera, la cual se preservó a 4 °C hasta su uso. Para el aislamiento bacteriano, se tomó 1 g de la muestra de composta y se disolvió en 10 mL de agua estéril mediante el uso de vórtex. A continuación, se realizó el aislamiento de las cepas a través de diluciones seriadas por triplicado en cajas Petri con medio de cultivo selectivo Ashby, papa dextrosa (PDA) y GYM por método de extensión e incubadas a 35 °C por 24 horas.

Para la obtención y purificación de las cepas aisladas, se hicieron resiembras en los medios de cultivo donde los microorganismos habían crecido incubándolas a 35°C por 24 horas. Este proceso se realizó hasta obtener un cepario axénico conformado de 39 cepas bacterianas.

Las cepas fueron resguardadas en glicerol de 1 mL a -80 °C en un ultracongelador Thermofisher ubicado en el laboratorio de biología molecular en las instalaciones del Instituto de Investigación Tecnológica (IDIT) hasta su posterior uso.

Caracterización microbiológica por tinción de Gram

Las 39 cepas aisladas se identificaron por tinción de Gram, mediante el uso de colorantes, iniciando con el cristal violeta por 45, se enaguó con agua destilada y se le agregó Lugol como mordiente durante 1 minuto; a continuación, se enaguó con acetona y finalmente se le adicionó safranina como contraste. Las cepas se observaron en un microscopio LeicaDM500 con el objetivo 100 × adicionando aceite de inmersión.

Ensayo de crecimiento por técnica de microcultivo de las cepas con ibuprofeno como fuente de carbono

Se realizó un inóculo de 1 mL en microtubos de 1.5 mL en medio de cultivo Luria Bertani (LB) por 24 horas a temperatura ambiente a 200 rpm, posteriormente, las células se lavaron dos veces, centrifugando a 8, 000 rpm, desechando el sobrenadante y resuspendiendo las bacterias en agua destilada estéril. Posteriormente se inoculó una placa de 96 pozos. con Medio Mínimo Mineral (MM9) utilizando concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mM de ibuprofeno (Estándar SigmaAldrich) y una razón de 1:10 de inóculo en el medio. Las cepas se incubaron en un orbital Thermocientific QMAX a 30 °C y 200 rpm por 96 horas (en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, BUAP). Posterior a las 96 horas de inoculación se realizó la cuantificación de UFC/mL por el método de Goteo en Placa por Sellado Masivo [19], con el uso de un replicador de placa de SigmaAldrich, las cepas fueron selladas en placas Petri con medio de cultivo MM9 + glucosa.

Resultados y Discusión

Purificación y selección de cepas bacterianas

Mediante resiembras por estriado en medios de cultivo selectivos, Ashby, PDA y GYM; se obtuvo un cepario con 39 aislados bacterianos puros, de las cuales 15 crecieron en medio GYM, 8 en medio Ashby y 16 en medio PDA.

Identificación microbiológica de las cepas por tinciones

A partir de las tinciones realizadas para cada una de las 39 cepas se obtuvieron que, de las 16 cepas sembradas en medio PDA, 14 corresponden a Gram negativas y 2 a Gram positivas (Tabla 1). De las 15 cepas cultivadas en medio GYM, 8 son Gram negativas y 11 Gram positivas (Tabla 2). Finalmente, de las 8 cepas crecidas en medio Ashby, 7 resultaron ser Gram negativas y 2 Gram positivas (Tabla 3).

Tabla 1: Identificación microbiológica por medio de tinción de Gram de cepas sembradas en medio PDA

Cepas	Tinciones de Gram	
	Positiva	Negativa
P 20.1		X
P 15.2		X
P 12.2.1b		X
P 1.2		X
P 12.2		X
P 13.2		X
P 15.2		X
P 7.1b		X
P 6.2		X
P 1.1	X	
P 12.2.1		X
P 19.1		X
P 16.1		X
P 10.1		X
P 11.1		X
P 7.1a	X	
P 7.1b		X

Tabla 2: Identificación microbiológica por medio de tinción de Gram de cepas sembradas en medio GYM

Cepas	Tinciones de Gram	
	Positiva	Negativa
G 10.2		X
G 1.1 C	X	
G 1.1 B	X	
G 3.1		X
G 1.1 A	X	
G 2.1		X
G 19.2		X
G 12.1 R 1 A		X
G 12.1 R 2 B		X
G 12.1 R 1 A		X
G 12.1 R 2 B		X

Tabla 3: Identificación microbiológica por medio de tinción de Gram de cepas sembradas en medio Ashby

Cepas	Tinciones de Gram	
	Positiva	Negativa
A 5b2		X
A 5b1		X
A 6.2	X	
A 16.1	X	
A 8.2		X
A 5a1		X
A 9.2		X
A 4.2		X
A 10.2		X

Escrutinio de las cepas aisladas por la técnica de microcultivo en MM9 + ibuprofeno a diferentes concentraciones

Las 39 cepas aisladas a partir del suelo de composta fueron evaluadas con tres diferentes concentraciones (0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM) de ibuprofeno con medio de cultivo MM9 en placas de 96 micropozos por 96 horas a 30 °C y 200 rpm; la finalidad de este ensayo fue conocer la concentración máxima tolerante de crecimiento de las cepas con el antiinflamatorio como su única fuente de carbono. Pasadas las 96 horas posteriores a la inoculación se realizó un sellado en placa Petri con MM9 + glucosa (250 mM) para descartar aquellas cepas que no pudieran crecer bajo estas condiciones de cultivo. Se pudo observar que las 39 cepas tienen la capacidad de crecer en diferentes concentraciones de ibuprofeno siendo este la única fuente de carbono disponible en el medio (Fig 1).

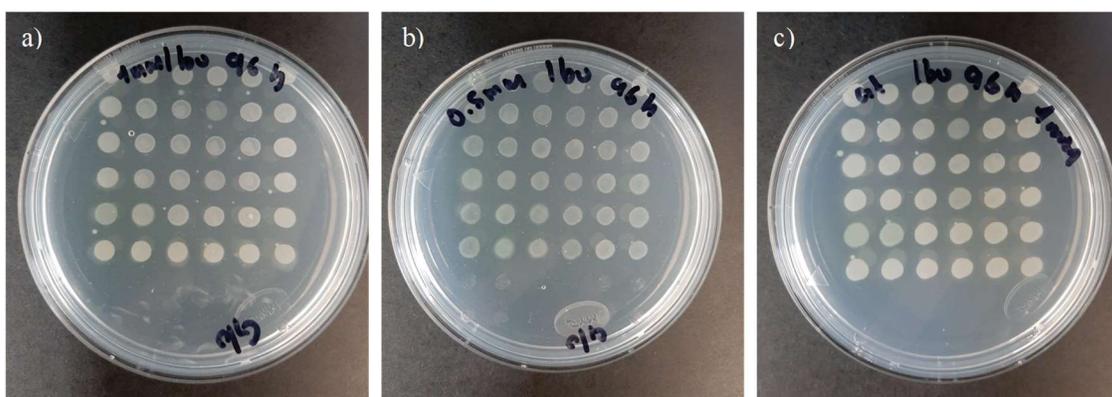


Fig 1: Cepas inoculadas por 96 horas en MM9 + ibuprofeno a) Concentración de 0.1 mM de ibuprofeno; b) Concentración de 0.5 mM de ibuprofeno y c) Concentración de 1 mM de ibuprofeno.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

La presencia del ibuprofeno en el ambiente es preocupante por su ecotoxicidad, generando un interés ecológico y de salud pública.

La capacidad que tienen las bacterias de degradar compuestos orgánicos es enorme y muy eficiente. Las cepas aisladas a partir de suelo de composta casera tuvieron la capacidad de crecer en presencia del antiinflamatorio ibuprofeno. Las cepas se evaluaron en tres concentraciones diferentes de ibuprofeno 0.1, 0.5 y 1 mM. Se esperaba que la concentración mínima de ibuprofeno fuera insuficiente para su crecimiento en el medio y que aquellas cultivadas en la concentración más alta de 1 mM resultaran intoxicadas e inhibidas en su crecimiento, sin embargo, todas las cepas aisladas mostraron tolerancia y posible uso del antiinflamatorio para la obtención de energía al ser su única fuente de carbono.

Referencias

1. R. U. Halden, "Epistemology of contaminants of emerging concern and literature meta-analysis", *Journal of Hazardous Materials*, vol. 282, pp. 2–9, enero de 2015. Accedido el 15 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.074>

El método de microcultivo en placa de 96 micropozos permite evaluar un gran número de cepas bacterianas a la vez, que disminuye tiempos de caracterización y uso de material, además de ser un método reproducible.

La investigación de métodos para la biorremediación de cuerpos de agua es de suma importancia pues el ambiente y seres vivos se verán beneficiados.

Finalmente, la caracterización microbiológica de las cepas tanto en su morfología y como en sus condiciones de crecimiento permitirá evaluar las cepas para conocer su crecimiento específico a través de la cuantificación de UFC/mL, y realizar la identificación de las cepas de interés mediante la técnica de PCR y la secuenciación del gen 16sARNr para establecer el género de estos microorganismos, en el futuro.

2. D. Barceló y M. J. López. "Contaminación y calidad química del agua: El problema de los contaminantes emergentes". Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. 2007.
3. M. Stuart, "Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater", *Science of the Total Environment*, vol. 416, p. 21, 2012.
4. C. Daughton, "Non-regulated water contaminants: Emerging research", *Environ Impact Asses*, vol. 24, 2004.
5. K. Fent, A. Weston y D. Caminada, "Ecotoxicology of human pharmaceuticals", *Aquat Toxicol*, vol. 76, p. 122, 2006.
6. D. Kolpin, "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance", *Environmental Science and Technology*, vol. 36, 2002.
7. K. Kummerer, "Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources da review", *Chemosphere*, vol. 45, 2001.
8. Información Farmacoterapéutica de la Comarca, Ed., *Farmacontaminación. Impacto ambiental de los medicamentos*, 10a ed. 2016. Accedido el 15 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: https://files.sld.cu/medicamentos/files/2017/01/INFAC_Vol_24_n_10_farmacontaminacion.pdfLutz
9. J. M. Costa, "Alertan por el crecimiento del consumo y el abuso de los analgésicos", *La nacion*, 21 de abril de 2018. Accedido el 14 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://www.lanacion.com.ar/sociedad/alertan-por-el-crecimiento-del-consumo-y-el-abuso-de-los-analgescicos-nid2127813/>
10. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. "Ficha tecnica ibuprofeno gineladius 600 mg comprimidos recubiertos con película efg". CIMA. https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/67069/FichaTecnica_67069.html
11. C. Magnatti, L. F. Gago y E. Vicentin, "Farmacontaminación: El lado b de los medicamentos", *Revista Argentina de Salud Pública*, vol. 13, pp. 101–110, 2021. Accedido el 1 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-810X2021000100101&lng=es&tlng=es.
12. A.-B. Muñoz-González, "Ibuprofen as an emerging pollutant on non-target aquatic invertebrates: Effects on *Chironomus riparius*", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 81, p. 103537, enero de 2021. Accedido el 17 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103537>
13. E. Cruz, "Presencia de antiinflamatorios no esteroideos en cuerpos de agua superficiales de tapachula, chiapas, méxico", *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, vol. 7, n.º 2, 2014.
14. D. Rede, "Ecotoxicological impact of two soil remediation treatments in *Lactuca sativa* seeds", *Chemosphere*, vol. 159, pp. 193–198, 2016.
15. M. J. Gil, "Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos", *Producción + Limpia*, vol. 7, n.º 2, pp. 52–73, 2012. Accedido el 15 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552012000200005&lng=en&tlng=es.
16. E. Geiger, R. Hornek-Gausterer y M. T. Sacan, "Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chorella vulgaris*", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 129, pp. 189–198, 2016.
17. K. González y V. Boltes, "Toxicity of ibuprofen and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments", *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 11, n.º 6, 2014.
18. Sewervac Ibérica. "BAC-ASILI: La biorremediación para el sector del tratamiento del agua". iAgua. <https://www.iagua.es/noticias/sewervac-iberica/bac-asili-biorremediacion-sector-tratamiento-agua#:~:text=La%20biorremediación%20es%20cualquier%20proceso,sustancias%20nocivas%20y%20materia%20orgánica>
19. A. Corral-Lugo, "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, 2012. Accedido el 1 de noviembre de 2022. [En línea]. Disponible: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77625401016>