

Efecto de la concentración de jabón doméstico a diferentes temperaturas sobre el desarrollo de *Pseudomonas aeruginosa* MBLAM-02, aislada del río Moche (Perú).

Effect of the concentration of laundry soap at different temperatures on the growth of Pseudomonas aeruginosa MBLMA-02 isolated from the Moche river (Peru).

Guevara-González, Juan

RESUMEN

Se ha evaluado el efecto de dos concentraciones de jabón Bolívar a cinco temperaturas de incubación, en un medio mínimo de sales, sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de aguas del río Moche de Trujillo. Se realizaron tres repeticiones y, aplicando un diseño factorial de 2x5, se combinaron las concentraciones de 400 y 800 mg/L de jabón Bolívar con las temperaturas de: 20, 25, 30, 35 y 40 °C. Las soluciones de jabón fueron puestas en volúmenes de 500 mL en 10 biorreactores aireados y agitados de 1L de capacidad. Cada biorreactor fue inoculado con 1 mL de suspensión de células de *P. aeruginosa* a 3.97×10^6 UFC/mL, incubándose hasta por ocho días y contándose el número de células viables cada dos días. Se ha encontrado un elevado incremento en el número de células en las dos concentraciones de jabón y en las cinco temperaturas a los dos días de incubación. La tasa de crecimiento desde el cuarto al octavo día se ha mantenido lenta y constante. Sólo se han determinado diferencias significativas entre la temperatura de 40°C con las de 20, 25, 30 y 35°C respectivamente a la concentración de 800 mg/L del jabón.

Palabras clave: Temperatura, concentración, jabón, desarrollo, *Pseudomonas*.

ABSTRACT

In minimal medium of salts, It has been evaluated the effect of two concentrations of Bolivar soap at five incubation temperatures on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fresh water of Moche river of Trujillo. Three replicates were performed using a 2x5 factorial design with 400 and 800 mg/L of Bolívar soap and temperatures of 20, 25, 30, 35 and 40°C. The 500 ml-soap solutions were dispensed in each of 10 aerated and agitated 1Lt-bioreactors. Each bioreactor was inoculated with 1 ml of cell suspension of *P. aeruginosa* at 3.97×10^6 CFU/mL, incubated up to 8 days and counted the viable cell number every two days. On the second day of incubation, it was found a high increment of cell number in both soap concentrations and every assayed temperature. However, the growth rate from the fourth to the eight day was kept a low constant rate. It was only determined a significant difference between the temperature of 40°C and 20, 25, 30 and 35°C respectively, at 800 mg/L of soap concentration.

Key words: Temperature, concentration, soap, growth, *Pseudomonas*.

Presentado el 10 de noviembre de 2010, Aceptado el 20 de diciembre de 2010.

Docente del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la UNT-Perú.

compuestos orgánicos e inorgánicos, reduciéndolos hasta metabolitos que pueden ser fácilmente removidos del ambiente².

INTRODUCCIÓN

La contaminación antropogénica se incrementa aceleradamente en nuestro planeta; hidrocarburos, pesticidas, fertilizantes, aerosoles, plásticos, pinturas, solventes, jabones, detergentes, etc., causan considerable contaminación del suelo y del medio acuático, originando diversos problemas de salud como resultado de su persistencia, toxicidad o transformación en metabolitos difíciles de degradar¹. Al mismo tiempo, la utilización de microorganismos (especialmente bacterias) en ambientes contaminados, crece cada día en virtud de su gran capacidad para degradar una diversidad de

Las aguas residuales domésticas son descargadas en alcantarillados como disposición final y otras veces son puestas en tanques para su tratamiento y eliminación adecuada; esto propicia condiciones especiales para que ecosistemas microbianos encuentren condiciones favorables para su crecimiento; así, se encuentran bacterias del género *Pseudomonas*, que tienen alta adaptabilidad a utilizar una gran variedad de sustancias químicas como fuentes de carbono y energía³. Esta adaptación es un proceso catabólico que implica la producción de enzimas codificadas por genes adquiridos por procesos de transferencia horizontal, característica muy

común en bacterias Gram negativas, y en donde interviene el DNA extracromosomal (plásmidos) o mecanismos genómicos como los transposones^{3,4,5}. Los jabones y detergentes domésticos constituyen una importante fuente de sustancias orgánicas e inorgánicas descargadas por sistemas de evacuación de aguas residuales urbanas e industriales, por lo que se produce una amplia dispersión de los mismos en el entorno acuático⁶.

La producción mundial de tensoactivos sobrepasa los 16 millones de toneladas, de las cuales el 56% son jabones⁷. Después de miles de años de amplio consumo del jabón, su aceptabilidad medio-ambiental está fuera de duda tanto para especies de la cadena trófica: microorganismos, algas, peces, etc., como para el hombre⁸. No se han reportado casos de toxicidad o bioacumulación debidos a la presencia de jabón en el medio ambiente. Las bacterias se encargan de metabolizar el compuesto químico y convertirlo en productos menos complejos por una serie de reacciones enzimáticas⁹. El género *Pseudomonas* adquiere mucha importancia por su gran aplicación en la degradación de sustancias químicas peligrosas^{10,11}. *P. aeruginosa* es la bacteria más importante por su habilidad de crecer hasta 42°C, utiliza una gran variedad de compuestos orgánicos como sustrato para su crecimiento y ha sido aislada de ambientes tan inhóspitos como: combustible Diesel, kerosene, soluciones de clorhexidina y el jabón. *P. aeruginosa* tiene especial importancia para el hombre tanto por causar problemas de salud, como por ser útil en procesos de biorremediación de aguas y suelos contaminados con diversos productos naturales y sintéticos que contaminan el medio ambiente¹².

P. aeruginosa puede ser aislada de una gran variedad de ambientes tanto acuáticos como terrestres, por lo que es considerada ubicua¹³. Esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Produce biosurfactantes útiles para la limpieza de suelos contaminados con compuestos orgánicos^{14,15}. Las bacterias para utilizar los tensoactivos como fuente de carbono y de energía requieren de condiciones fisicoquímicas y nutricionales óptimas (Nitrógeno inorgánico, fósforo, azufre, vitaminas y otros¹⁶). El crecimiento bacteriano en presencia de tensoactivos se cuantifica por diversas técnicas como:

recuento en placa, espectrofotometría y otros¹⁷. El recuento en placa determina microorganismos viables presentes en una muestra utilizando un medio de cultivo y condiciones de incubación adecuadas¹⁸.

Considerando que en nuestro entorno no existen trabajos relacionados con la influencia de la temperatura y la concentración del jabón sobre su utilización y desarrollo por *P. aeruginosa*, ni sobre su participación en biorremediación de aguas residuales contaminadas con desechos de jabón; y siendo necesario conocer cómo afectan la variación de la temperatura y la concentración del jabón en la utilización del mismo y en el desarrollo de *P. aeruginosa*, con el propósito de obtener datos que apoyen el diseño posterior de un sistema de tratamiento de aguas contaminadas con jabón, el presente trabajo tuvo por finalidad determinar: el efecto de las concentraciones de 400 y 800 mg/L del jabón Bolívar en combinación con las temperaturas de 20, 25, 30, 35 y 40°C sobre el desarrollo de *P. aeruginosa* aislada del río Moche.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material:

Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* MBLAM-02, aislada de agua del río Moche, de la ciudad de Trujillo. Identificada y coleccionada en Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo. Además se utilizó una barra de jabón "Bolívar" blanco, comprada en el mercado Mayorista de Trujillo.

Procedimiento:

El cultivo caracterizado de *P. aeruginosa* fue purificado por resiembra en caldo glutamato, después fue resembrado en agar glutamato más jabón Bolívar al 1%; luego, varias colonias se resembraron en frasquitos con agar blando glutamato para su conservación. Todas las incubaciones se hicieron a 37 °C por 18 ò 24 horas.

Construcción de biorreactores:

Se utilizó diez frascos anchos de vidrio de 1L de capacidad, con cuatro deflectores de 1.2 x 8 cm en cada frasco. Se confeccionaron diez tapas de jebes con tres orificios de 12 mm de diámetro. Se adaptaron diez motorcitos de seis voltios y 3,000 RPM, diez rayitos como eje para las hélices. Se acopló mangueritas para la distribución del aire a cada biorreactor. Los biorreactores fueron lavados con solución

de hipoclorito de sodio al 10%, enjuagado con agua destilada estéril y luego esterilizado por exposición a luz "UV" de 240 a 280 nm por dos horas a 30 cm de distancia.

Los diez biorreactores se dispusieron en cinco pares, cada par para dos concentraciones de jabón y una temperatura; además, un transformador, un motor aireador y una botella trampa con CuSO_4 al 3%; luego, cada par fue colocado en una canastilla para ser incubados en estufa.

Medio Mínimo de Sales (MMS) y solución de jabón:

Se preparó 5L de un medio mínimo de sales (MMS), utilizando KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , CINH_4 y asparragina; se ajustó el pH a 7,0. Luego, a 2,5L se añadió 2.0g de jabón Bolívar obteniendo la concentración de 800 mg/L; y a los otros 2,5L se añadió 1.0 g de jabón obteniendo 400 mg/L, luego fueron esterilizados en autoclave.

Preparación del inóculo e inoculación:

Se sembró el cultivo puro de *P. aeruginosa* en agar nutritivo inclinado y se incubó por dieciocho horas a 35°C. Luego, se hizo una suspensión en 10 mL de SSF y se estandarizó a la concentración del tubo N° 2 del Nefelómetro de Mac Farland (6×10^6 UFC/ mL). Se colocó en cada biorreactor 500 mL del MMS a las concentraciones correspondiente del jabón y se inoculó 1 mL de suspensión de *P. aeruginosa*; luego, se sembró 0.1 mL de la misma suspensión en superficie de agar nutritivo para su conteo inicial, el cual se obtuvo como promedio 3.97×10^6 UFC/mL. Luego, los cinco pares de frascos se incubaron a 20, 25, 30, 35 y 40°C según correspondía.

Monitoreo de muestras de los biorreactores:

Cada dos días se extrajo de los biorreactores 0.5 mL y se realizó diluciones decimales hasta 10^6 , esta última dilución se sembró en placa por superficie. Se incubó por 24 a 48 horas a 35°C y luego se contaron las colonias desarrolladas.

RESULTADOS

Con relación al efecto de la concentración del jabón Bolívar a 400 mg/L y a las cinco temperaturas de experimentación se observó un aumento considerable de *P. aeruginosa* a los dos días de incubación y en las cinco temperaturas; sin embargo, el

mayor desarrollo se muestra a los 35°C ($6,63 \times 10^8$), que equivale a un aumento de $6,59 \times 10^8$ células, y el menor desarrollo se produce a 20°C ($4,23 \times 10^8$), que equivale a un aumento de 4.19×10^8 células. El incremento bacteriano desde los cuatro hasta los ocho días y a las cinco temperaturas ha sido lento y constante. Tomando en consideración el tiempo total de incubación de 8 días y comparando el menor desarrollo producido a los 20°C ($4,55 \times 10^8$) y 40°C ($4,47 \times 10^8$) con el mayor desarrollo que fue a los 35°C ($6,78 \times 10^8$) no se encontraron diferencias significativas entre dichas temperaturas. (Tabla 1)

Con relación al efecto del jabón Bolívar a la concentración de 800 mg/L y a las cinco temperaturas de experimentación, se observó que también hay un aumento considerable de *P. aeruginosa* a los dos días y en las cinco temperaturas. El mayor desarrollo se muestra a los 35°C ($6,87 \times 10^8$), con un aumento de $6,83 \times 10^8$ células; mientras que el menor desarrollo se produjo a los 40°C ($5,32 \times 10^8$) con un aumento celular de $5,28 \times 10^8$ bacterias. Del mismo modo, el crecimiento a partir de los cuatro hasta los ocho días muestra un incremento lento en el número de células, aunque siempre el mayor desarrollo se produjo a los 35°C ($7,87 \times 10^8$) y el menor desarrollo fue a los 40°C ($2,28 \times 10^8$) encontrándose diferencias significativas entre las temperaturas de 20, 25, 30 y 35°C con la de 40°C. (Tabla 2)

DISCUSIÓN

Los resultados indican que *P. aeruginosa* desarrolla eficazmente en las soluciones del jabón "Bolívar" a las dos concentraciones (400 y 800 mg/L) y a las cinco temperaturas (20, 25, 30, 35 y 40°C); esto es debido a su capacidad enzimática inducida por lo cual degrada parcialmente la estructura del jabón y lo utiliza como única fuente de energía y de carbono, que pasaría a formar parte de la estructura bacteriana; esto se ve reflejado en el acelerado incremento en el número de células obtenido a los dos días de inoculación, período en que se produjo mayormente la fase logarítmica; luego, el desarrollo se torna lento y constante hasta los ocho días de la evaluación, manteniéndose en fase estacionaria por la acumulación de metabolitos no favorables para el desarrollo óptimo de los

microorganismos³. Por otro lado, *P. aeruginosa* tiene la habilidad de crecer en un rango amplio de temperatura, más aun, si es nativa de ambientes acuáticos¹²; esto ha sido corroborado en el presente trabajo, pues *P. aeruginosa*, que ha sido aislada del río Moche ha desarrollado abundantemente desde los 20 hasta los 40°C. Se han reportado algunos trabajos de *Pseudomonas* sp. como biodegradador potencial de diversos compuestos xenobióticos, entre los cuales están los detergentes y jabones^{19,20}.

Las bacterias sometidas a limitación de nutrientes, como lo es en presencia de tensioactivos, pueden experimentar fenómenos de tolerancia hacia el compuesto, esto les permite sobrevivir por algún tiempo empleando sólo su metabolismo basal y las reservas carbonadas de su propia estructura; pero luego de este período que se presenta en las primeras horas (fase lag), comienza la producción abundante de enzimas para la degradación de los tensioactivos^{16,18}. Este fenómeno de tolerancia explica el poco aumento en el desarrollo bacteriano antes de las 24 horas de incubación en los primeros ensayos realizados. Al mismo tiempo, las bacterias necesitan una fuente de energía adicional para metabolizar sustratos complejos, por ello el crecimiento microbiano en sustratos sencillos es más rápido y mayor que en los complejos. Como el jabón "Bolívar" forma parte de los sustratos complejos, se observa un crecimiento notable de *P. aeruginosa*, al término de las 48 horas, lo que supone una degradación inicial parcial que le brindaría suficiente fuente de carbono para el incremento acelerado en este período^{21,22}.

El aumento considerable registrado a los dos días podría deberse a que después que cesa el fenómeno de tolerancia, que es a menos de 24 horas, empieza una formación abundante de enzimas que lo lleva a una degradación alta del jabón y que luego se hace constante a partir de los cuatro días, debido a que también se producen por el metabolismo degradativo, sustancias tóxicas que neutralizan la producción de enzimas, además de los sistemas de autorregulación enzimática de los cultivos, después que han alcanzado su fase logarítmica y sólo se mantiene una

fase estacionaria hasta el agotamiento del sustrato¹⁸.

Según los resultados obtenidos, hasta los ocho días de incubación y a la concentración de 400 mg/L del jabón el menor crecimiento que se observa a los 20 y a los 40°C es debido a que la baja temperatura disminuye el metabolismo bacteriano y, por el contrario, las altas temperaturas aceleran los procesos de autólisis^{23,24}; sin embargo, aplicando la prueba de análisis de varianza no alcanzan diferencias significativas. En cambio, el crecimiento de *P. aeruginosa* hasta los ocho días y a la concentración de 800 mg/L sí muestra diferencias significativas entre las temperaturas de 20, 25, 30 y 35°C con la de 40°C; esto se debería a que la mayor concentración de jabón proporciona mayor opción a utilizar el sustrato como fuente de carbono por las células.

CONCLUSIONES

P. aeruginosa MBLMA-02, aislada de las aguas del río Moche:

- Incrementa significativamente su desarrollo a los dos días a las concentraciones de 400 y 800 mg/L del jabón Bolívar y a las temperaturas de 20 a 40°C.
- Presenta un crecimiento significativamente mayor a 800 mg/L y a 20, 25, 30 y 35°C que a 400 mg/L y a 40°C.
- Es posible utilizarla eficazmente en los procesos de biorremediación de aguas contaminadas con jabón doméstico a las temperaturas de 20 a 35°C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHAUDRY G, CHAPALAMADUGU S. Microbiological Reviews. 1991.
2. MONTICELLO D, The molecular biology of dibenzothiophene desulfurization. The Seven International IGT Symposium of Gas, Oil and Environmental Microbiology. 1994. pp. 1-15.
3. RITTMANN B, MAC CARTY P. Biotecnología del Medio Ambiente, principios y aplicaciones. España: Mc Graw-Hill. 2001.

Tabla 1. Desarrollo de *P. aeruginosa* en solución de jabón Bolívar a 400 mg/L y a cinco temperaturas durante 8 días de incubación en biorreactores aireados y agitados.

Días	Temperaturas de incubación				
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
0	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶
2	4,23x10 ⁸	5,71x10 ⁸	5,20x10 ⁸	6,63x10 ⁸	4,53x10 ⁸
4	4,02x10 ⁸	5,80x10 ⁸	5,26x10 ⁸	7,03x10 ⁸	2,78x10 ⁸
6	3,05x10 ⁸	4,03x10 ⁸	4,85x10 ⁸	5,69x10 ⁸	5,32x10 ⁸
8	4,55x10 ⁸	5,98x10 ⁸	6,26x10 ⁸	6,78x10 ⁸	4,47x10 ⁸

(Promedio de tres repeticiones)

Con P < 0.05, no se encuentran diferencias significativas entre las temperaturas.

Tabla 2. Desarrollo de *P. aeruginosa* en solución de jabón Bolívar a 800 mg/L y a cinco temperaturas durante 8 días de incubación en biorreactores aireados y agitados.

Días	Temperaturas de incubación				
	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
0	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶	3,97x10 ⁶
2	6,04x10 ⁸	6,39x10 ⁸	6,07x10 ⁸	6,87x10 ⁸	5,32x10 ⁸
4	6,07x10 ⁸	6,76x10 ⁸	6,84x10 ⁸	6,62x10 ⁸	2,47x10 ⁸
6	3,87x10 ⁸	4,48x10 ⁸	5,31x10 ⁸	6,51x10 ⁸	2,22x10 ⁸
8	6,15x10 ⁸	6,69x10 ⁸	6,14x10 ⁸	7,87x10 ⁸	2,28x10 ⁸ *

Nota: Promedio de tres repeticiones.

* Con P < 0.05, Se encuentran diferencia significativas entre las temperaturas de 20, 25, 30, y 35°C con la de 40°C

- BOYE M, MOLIN S. Application of a strain Specific rRNA oligonucleotide probe targeting *Pseudomona fluorescens* Ag1 in a mesocosm study of bacterial release into the environment. App Environ Microbiol 1995; 61(4): 1384 - 1390.
- MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J, Brock. Biología de los Microorganismos. 10^{ma} ed. España: Edit. Prentice Hall. 2004.
- BIRCH R, GLEDHILL W, LARSON R, NIELSEN M. El papel de la biodegradabilidad anaeróbica en la aceptabilidad ambiental de los detergentes materiales. 3^{ra} ed. CESIO International Surfactants Congress & Exhibition - A World and Mercado, Proceedings Sección E. 1992. 26-33.
- CEE. Directiva del Consejo 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991. Tratamiento de las aguas residuales urbanas. 1991. D.O.L135 de 30.5.91.
- FERNANDEZ F, GARCIA P. Depuración anaerobia de aguas residuales. Bases y parámetros de operación. RETEMA. 1993; 36:75-83.
- HEINZE J, BRITTON L. Anaerobic biodegradation: environmental relevance. American Oil Chemist Society (AOCS). 3rd World Conference and Exhibition on Detergent. Montreux, Switzerland, 1993. September 26-30.
- MERCK "Manual de Microbiología". E. Merck, Darmstadt. Alemania. 2000.
- KONEMAN E. Diagnóstico Microbiológico. 5^{ta} ed. Buenos Aires, Argentina: Edit. Panamericana. 1999.
- HARDALO C, EDBERG SC. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. Crit Rev Microbiol 1997;23: 47-75
- COSTERTON J. *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease: In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa*: the organism, diseases it causes and their treatment. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland. 1980. p 15-24.

14. SCHAEFFER TL, CANTWELL SG, BROWN JL, WATT DS, FALL RR. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. 1979. Appl. Environ. Microbiol. 38: 742-746.
15. SOBERÓN-CHÁVEZ G, LÉPINE F, DÉZIEL E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appt Microbiol Biotechnol 2005; 68: 718-725.
16. ATLAS R, BARTHA R. Ecología y Microbiología Ambiental. Madrid-España: Edit. Pearson Addison Wesley. 2002.
17. PORTER MR, Handbook of surfactants. 2nd ed. Blackie Academic & Professional. Glasgow. 1994.
18. STANIER R, ADELBERG E, INGRAHAM J. Microbiología. Versión Española actualizada de "The Microbial World". 4ª ed. Barcelona-España: Edit. Revertè, S.A., 1986.
19. BRACHO M, DÍAZ L, SOTO L. Crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de dibenzotiofeno y en función de nitrógeno y fósforo. Ciencia 2004; 12(3): 125-131.
20. CANTINI L, DÍAZ L, DÁVILA S, SOTO L. Crecimiento a diferentes concentraciones de fósforo y nitrógeno de un cultivo puro de bacterias degradadoras de fenantreno. Ciencia 2004; 9 (2): 207-216.
21. Van OVERBEEK L, EBERL S, GIVSKOV L, MOLIN M, van ELSAS JD. Survival of, and induced Stress resistance in, Carbon-Starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. Appl Environ Microbiol 1995; 61(12): 4202 - 4208.
22. VEGA JC. Manejo de residuos de la industria química y afín. 2º ed. Alfaomega. 1999.
23. VARO GALVAN J. Contribución al estudio sobre el comportamiento ambiental y degradación de jabones. Tesis doctoral, Universidad de Alicante, 1996. España.
24. RHEINHEIMER G. Aquatic Microbiology, 4th ed. Wiley, Chichester. 1991.

Correspondencia: Juan José Guevara
González

Dirección: Mz. B Lote 12 Urb. COVIDUNT

Teléfono: (044) 290134

E-mail: jjdguevara@yahoo