

Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de suelos en talleres de automóviles, con potencial en biorremediación

Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from soils in automobile workshops, with potential for bioremediation

Jean Piere Quiliche-Duran ¹, Luis Alberto Huayna Dueñas ¹

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en talleres de automóviles. **Métodos:** Investigación exploratoria-cualitativa, se muestreo en 3 talleres de automóviles que presentaron suelos negros como característica fundamental, se usó una suspensión de suelo extraído en agua para luego realizar una serie de sembrados en medios de cultivo comunes, selectivos y pruebas bioquímicas. **Resultados:** De las muestras analizadas se aisló *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusión:** Existe presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en talleres de automóviles; se consiguió aislarla e identificarla.

Palabras clave: Biorremediación, hidrocarburo, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the presence of *Pseudomonas aeruginosa* in auto repair shops. **Methods:** Experimental research was sampling in 3 auto shops to present fundamental characteristic black soil, a soil suspension in water extracted and then make a series of mass planted in common, selective culture was used and biochemical tests were performed. **Results:** Of the samples, tested *Pseudomonas aeruginosa* was isolated. **Conclusion:** There presence of *Pseudomonas aeruginosa* in automobile workshops; it was possible to isolate and identify.

Keywords: Bioremediation, hydrocarbon, *Pseudomonas aeruginosa*.

¹ Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Huacho, Perú

INTRODUCCIÓN

La contaminación con hidrocarburos en diferentes ecosistemas se ha incrementado en los últimos años debido al aumento en la actividad de exploración y producción de la Industria Petrolera. En la actualidad los suelos contaminados con estos compuestos representan el 70% del total de los ecosistemas impactados (Swannell, Lee y Mc Donagh, 1996).

Los componentes del petróleo que tienen efectos más nocivos, son los hidrocarburos aromáticos, puesto que algunos actúan como tóxicos agudos y otros, como el benzopireno tienen actividad carcinogénica (Cisneros, 1996).

La biodegradación de hidrocarburos en suelos, es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías del petróleo (Morry, 1998).

Los microorganismos se consideraron como fuente biológica para la degradación de hidrocarburos. Tanto in situ como en los procesos de tratamiento de sitio descomponer peligrosos contaminantes ambientales orgánicos evitan lo económico y desventajas técnicas (Ahlert y Kosson, 1983).

La biorremediación es la capacidad que tienen los microorganismos de crecer a partir de la utilización de sustancias recalitrantes al medio ambiente (Shmaefsky, 1999).

Algunos de ellos les permite degradar estos compuestos hasta dióxido de carbono, sales, agua y otros productos inocuos al medio ambiente (Advanced BioTech, 2000) los cuales se integran posteriormente a los ciclos biogeoquímicos naturales (Mack Kay, 2001). Esta técnica permite tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación (Molnaa y Grubbs, 1989).

La *P. aeruginosa*, es uno de los microorganismos más usados y estudiados en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos. Lamentablemente, también es conocida por ser un patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en

personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística (Rockne, et al, 2000).

Estudios con relación al desempeño metabólico de la *P. aeruginosa* ha permitido identificarla como degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias, y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos, así como del pireno en estudios in vitro.

Merino (1998), llevó a cabo un estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo, indicando que los microorganismos con mayor capacidad emulsificantes y degradativas, fueron las cepas: *P. aeruginosa* KT1-1 y *Serratia rubidae* BT5-4.

La hipótesis fue: en el suelo de los talleres de reparación de automóviles se desarrolla *P. aeruginosa* y como objetivo se evaluó la presencia de *P. aeruginosa* en talleres de automóviles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestreó en 3 talleres de automoviles de la zona de Huacho, distrito de Huaura, Lima donde se observó suelos de color negro causado por hidrocarburos, lo primero que se hizo fue medir la longitud de la zona de muestreo y se extrajo a partir de la base del suelo a una profundidad de 5 cm. en un intervalo de tiempo de 5 a 15 minutos obteniendo 5 gramos de la muestra colectadas en una bolsa de polietileno hasta llegar al laboratorio de Biología donde se realizó el trabajo de investigación.

En el aislamiento se suspendió, 5 gramos de tierra en agua destilada estéril, se sembró en un medio de caldo nutritivo. Se incubó las muestras hasta 48 horas. Transcurrido el tiempo para el aislamiento de bacterias se procedió a sembrar por estrías en placas que contenían Agar nutritivo a partir de Caldo nutritivo. Se incubó las placas a 30 °C por 48 horas. Transcurridas las 48 horas, se procedió a sembrar las cepas en el medio selectivo de Agar Cetrimide para verificar su pureza e incubarlas nuevamente a 30 °C por 48 horas. Se realizaron resiembras para obtener la *P. aeruginosa* pura.

Luego se prosiguió a realizar pruebas para identificación de la bacteria tales como la de sensibilidad a la temperatura, prueba de motilidad en medio sólido, prueba de producción de pirocianina en agar Cetrimide, prueba de catalasa, siembra en agar Mac

Conkey, siembra en agar citrato de Simons, siembra en agar urea, siembra en agar TSI y también se aplicó tinciones simple con azul de metileno y Gram. (Figura 1)

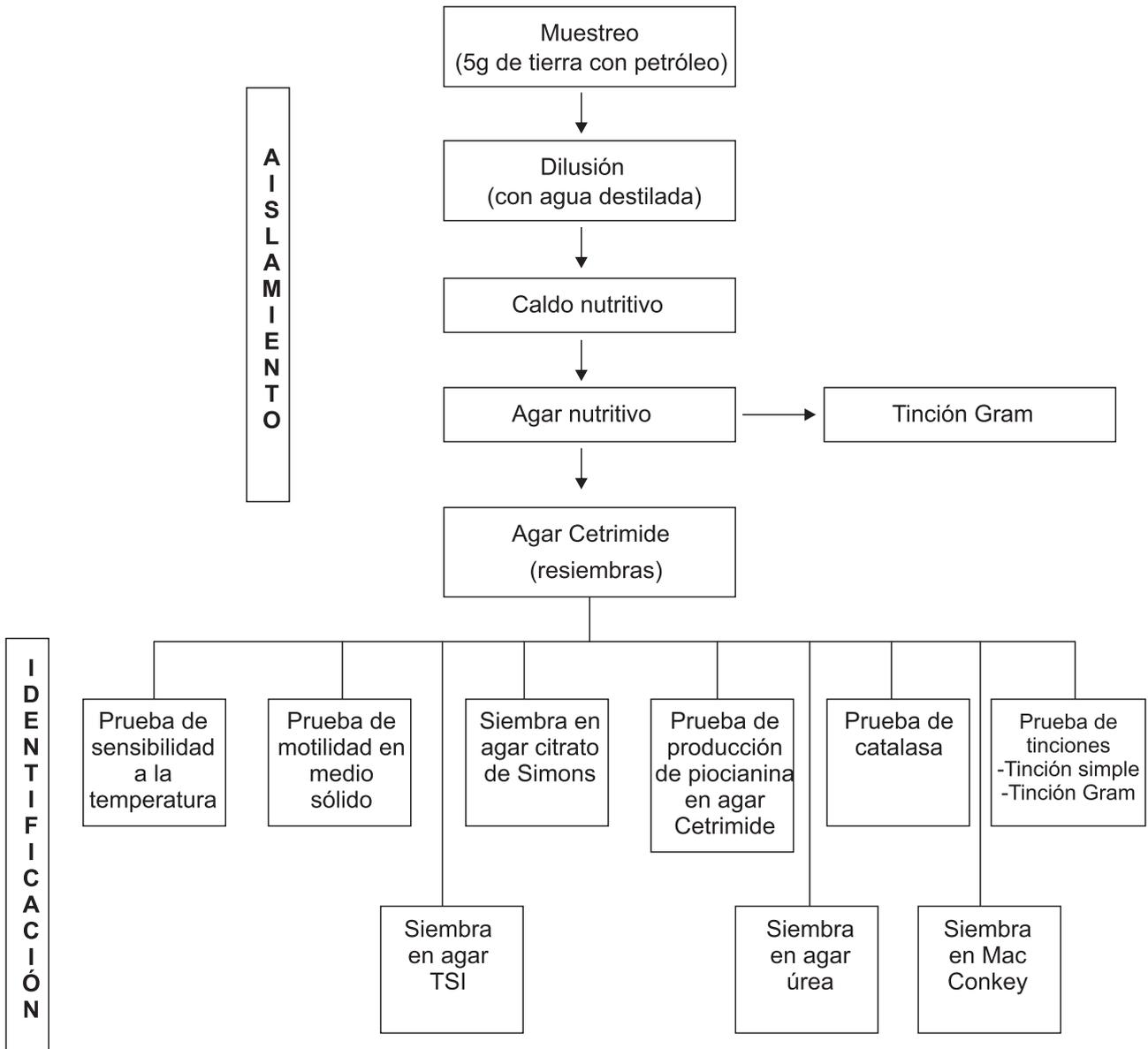


Figura 1. Diagrama de flujo para el aislamiento e identificación de Pseudomona aeruginosa.

RESULTADOS

Aislamiento:

De las 3 muestras recogidas se encontró en uno de los talleres de automóviles presencia de *P. aeruginosa*, con las características propias.

Identificación:

Las pruebas bioquímicas para su identificación fueron consideradas las que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomona aeruginosa*

Ensayos	Resultados
Prueba de sensibilidad a la temperatura	Es tolerante a temperatura de 42 °C lo cual si hubo crecimiento bacteriano.
Prueba con agar urea	Salió positivo debido a que la bacteria presenta un cambio en el viraje de color de un amarillo a un rosado oscuro.
Prueba de motilidad en medio solido	Se observa movimiento por la presencia de flagelo en la bacteria debido a eso el agar mostro un crecimiento en zigzag.
Prueba de producción de piocianina	En el medio selectivo de agar Cetrimide se observa que torna un color verde por la presencia de la piocianina y con luz ultravioleta presentara fluorescencia debido a que presenta también fluoresceína.
Prueba de catalasa	Se observa burbujeo debido a la liberación de oxígeno.
Siembra en agar Mac Conkey	Hubo crecimiento y desarrollaron colonias de color blanco con pigmento de medio color amarillo debido a que son Gram negativos no fermentadores de lactosa.
Siembra en agar citrato de Simons	Se observo que la bacteria si utilizo el citrato y hubo un cambio de color desde un verde que tuvo al inicio a un azul intenso que tuvo al final. Por lo tanto nuestra interpretación es positiva.
Siembra en agar TSI	Se observó la superficie alcalina y la profundidad alcalina (pico rojo y fondo rojo) (K/K); esto se debe a que la bacteria no es fermentador de azúcares.
Tinción Gram	Se identificó bacteria Gram negativa debido a la coloración fucsia además, se observó forma bacilo recto o ligeramente curvado, aislado, agrupado en parejas o cadenas cortas.
Tinción simple	Se observan bacterias en forma de bacilos.

DISCUSIÓN

Merino (1998), planteó un método de aislamiento y purificación para *P. aeruginosa* lo cual se logra empleando una serie de caldos pre enriquecidos como el acetato mineral y Palleroni, también consideró un medio selectivo como es el agar King B.

Se tuvo que modificar esta metodología debido a que no se contaba con los medios adecuados tomando en cuenta que se reemplazó por medios que posean composición semejante como Agar nutritivo, caldo nutritivo y sean selectivos como el agar Cetrimide se obtuvo resultados esperados la cepa se aisló e identificó como *P. aeruginosa*

Bailón (2003), planteó en su libro “Pruebas bioquímicas para bacteria” pruebas bioquímicas propias para el género *Pseudomonas* entre todas ellas nos faltó realizar dos pruebas típicas para el reconocimiento de este género que fue la prueba de licuefacción de la gelatina y prueba de la oxidasa, teniendo en cuenta que las otras pruebas para identificarlas si se realizaron y se obtuvieron los resultados esperados.

Pérez (2008), en su artículo titulado “Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo” realizó una serie de métodos de identificación. Por lo cual se remarcó que las pruebas de Gram, Mac Conkey, motilidad, catalasa y crecimiento a 42 °C coinciden con las de Pérez, (2008) calificándola como *P. aeruginosa*.

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento al docente de la Escuela Profesional de Biología con mención en Biotecnología José Luis Romero Bozzetta por su constante apoyo en el transcurso de este proyecto de investigación y también a la Facultad de Medicina Humana - Laboratorio de Microscopía por los servicios prestados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Advanced BioTech, (2000). “Why add microbes?” California, USA. Recuperado de http://www.adbio.com/bioreem/why_add_microbes.htm

Ahlert, R.C. & Kosson, D.S. (1983). In situ and

on-site biodegradation of industrial landfill leachate. Report to Department. Of the Interior, Washington, DC.

Bailón, L., Gonzales, M. & Cervantes, S. (2003). *Atlas de pruebas bioquímica para identificación de bacterias*. Zaragoza: Universidad Nacional autónoma de México.

Cisneros, E. (1996). *Manual de Química Ambiental*. Programa de Educación ambiental. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.

Mac Kay, N.I. (2001). Biorremediación. Recuperado de: <http://www.ambiente.news.htm>. 1-4.

Merino, F. (1998). *Estudio de microorganismos nativos productores de Emulsificantes de Petróleo*. Tesis para optar al título de Magister. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Molnaa, B. A. & Grubbs, R. B. (1989). Bioremediation of petroleum contaminated soils using a microbial consortia as inoculum. In E. J. Calabrese, & P. T. Kosteeke (Eds.), *Petroleum contaminated soils* (Vol. 2, 219-232). Lewis Publishers.

Morry, M. F. (1998). *Manual de Prevención de la Contaminación Industrial*. Editorial Mac Graw Hill. Interamericana.

Pérez, S.R., Camacho, P.M., Gómez M.J., Ábalos, R.A., Viñas, M. & Cantero, M.D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1), 44-51.

Swannell, R. P. Lee K. & Mc Donagh M. (1996). "field evaluations of marine oil spill bioremediation," *microbiological, review*, vol. 60(2), 342-365.

Rockne, K. Chee-Sanford, J., Sanford, R., Brian, P., James, T. & Staleyand, S. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1595-1601.

Shmaefsky, B. (1999). Bioremediation: Panacea or fad? Access Excellence. The National Health. Museum. <http://www.accessexcellence.org/LC/S T/st3bg.htm>

Correo electrónico:
jean_19_2014@hotmail.com

Revisión de Pares:
Recibido: 15-10-2015
Aceptado: 07-12-2015