

Evaluación de la Supervivencia de tres Especies Bacterianas Aisladas de Suelo ante la Presencia de Tensoactivos

María Fernanda Flores-Súchil¹, Anabelle Cerón-Nava¹, Tomás Eduardo Chávez-Miyauchi¹,
Alejandro Islas-García¹

¹Universidad La Salle México, Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad de México, México.

mfloress3@lasallistas.org.mx, anabelle.ceron@lasalle.mx, tomas.chavez85@gmail.com,
alejandro.islas@lasalle.mx

Resumen. Los contaminantes emergentes representan un problema a nivel mundial debido al rápido crecimiento poblacional e industrial, causando efectos negativos en el medio ambiente y en la salud humana. Los componentes activos de los detergentes, denominados tensoactivos, forman parte de estos contaminantes, representando un riesgo debido a que se utilizan masivamente en productos de limpieza, ocasionando un efecto negativo sobre los ecosistemas. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto que tienen tres diferentes tensoactivos de uso común en la supervivencia de diversas colonias de bacterias extraídas del suelo. Se encontró que la mayoría de los microorganismos no sobreviven al dodecil sulfato de sodio, mientras que algunos de ellos aprovechan los tensoactivos no iónicos como fuente de alimento. La metodología implementada, puede ser usada para evaluar el efecto de diferentes compuestos químicos en la supervivencia de microorganismos de forma estandarizada.

Palabras Clave: Contaminantes emergentes, tensoactivos, ecosistemas.

1 Descripción de la problemática prioritaria abordada

El considerable aumento de la población y la rápida industrialización en los últimos años ha tenido un impacto negativo en el medio ambiente, particularmente en los ecosistemas terrestres y acuáticos. El vertido de residuos de diversas industrias contamina en gran medida los cuerpos de agua y suelo; a este tipo de contaminantes se les conoce como emergentes y se definen como "cualquier producto sintético o natural, que tenga el potencial de causar efectos adversos en ecosistemas y/o a la salud humana" (Martínez-Orgániz et al., 2023; Behera & Das, 2023).

Dentro de los contaminantes emergentes de mayor preocupación, se encuentran en detergentes, lavatrastes, jabones de tocador y los champús; estos productos de uso diario están constituidos por tensoactivos que a concentraciones altas, pueden llegar a ser tóxicos y nocivos para los ecosistemas (UC-Peraza y Delgado-Blas, 2012). Mao et.al. (2015) cita, que la presencia excesiva de tensoactivos puede tener un efecto negativo debido a su actividad biológica. Los tensoactivos aniónicos se pueden enlazar a macromoléculas bioactivas como péptidos, enzimas y ADN provocando cambios en las funciones biológicas de los microorganismos; por otro lado, los tensoactivos catiónicos pueden llegar a afectar la membrana citoplásmica de las bacterias y por su parte los tensoactivos no iónicos ejercen actividad antimicrobiana al unirse a diversas proteínas y membranas de fosfolípidos (Mao et al., 2015).

La contaminación por estos productos representa una amenaza para el medio ambiente y la salud humana, es por ello se necesita limpiar, remover, eliminar y restaurar el sitio que ha sido afectado por estos contaminantes. Los procesos biológicos de remediación aprovechan la capacidad de los microorganismos para degradar o transformar los contaminantes presentes en un sitio contaminado, promoviendo la restauración del entorno natural del sitio (Fernández-Rodríguez et al., 2014).

La presente investigación se encuentra alineada a dos de los diecisiete Objetivos de Desarrollo Sostenible. Objetivo 6 Agua y Saneamiento y Objetivo 15 Vida de Ecosistemas Terrestres; para este proyecto se tomaron en cuenta las metas de los objetivos que buscan mejorar la calidad del agua y del suelo buscando reducir la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos en los ecosistemas.

2 Objetivo

Implementar una metodología experimental por medio de retos microbianos que permita evaluar la concentración a la que ciertas especies bacterianas aisladas de suelos contaminados sobreviven ante la presencia de tensoactivos.

3 Propuesta teórico-metodológica

Para evaluar la concentración a la que los microorganismos sobreviven a la presencia de tensoactivos, se realizó lo siguiente:

1. Se prepararon soluciones de 100 ml con 3 diferentes tensoactivos, en la Tabla 1 se encuentra la masa a utilizar, la cual se calculó a partir de su concentración micelar crítica (CMC).
2. Se prepararon cuatro soluciones a 1, 2, 3 y 4 veces las CMC de cada tensoactivo, con caldo nutritivo.
3. De cada una de las concentraciones de tensoactivos, se agregaron 9 ml de dilución en tres diferentes tubos de ensayo, adicionando 1 ml de cepa problema. Esta operación se repitió para cada tensoactivo, así como para las diferentes cepas problema. Se utilizó un blanco, el cual solo contenía caldo nutritivo. Dicho procedimiento se explica de manera grafica en la Figura 1.
4. Todos los tubos se incubaron a 37 °C a 120 rpm por 24 horas. El método se realizó por triplicado.

Tabla 1. Preparación de soluciones a partir de la CMC de tensoactivos.

| Tensoactivo | Cantidad [g/ 100 ml] | CMC |
|--------------|-------------------------|---------------------------------|
| Tritón X-100 | 0.15 | $0.24 \times 10^{-3} \text{ M}$ |
| Tween 80 | 0.016 | $1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ |
| SDS | 2.88 | 0.01 M |

Elaboración propia, noviembre 2022.

Para calcular el porcentaje de supervivencia de los microorganismos se emplearon microplacas. En este procedimiento, se realizó lo siguiente:

1. Se tomaron 200 μL de cada tubo, colocándolos en los pozos de la microplaca.
2. Se colocaron las concentraciones por triplicado de cada una de las diluciones.
3. Posteriormente se realiza una lectura espectrofotométrica en un lector de placas a 620 nm. Dicha técnica se hizo para cada tensoactivo con cada una de las cepas problema.

Para evaluar la supervivencia de los microorganismos, se realizaron cálculos a partir de los resultados de absorbancia en donde se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$F - A = X_i, \quad (1)$$

en donde:

Control de crecimiento: F

Caldo nutritivo: A

A las soluciones problema, se les resta la absorbancia de las soluciones conteniendo solamente tensoactivo y caldo nutritivo, resultando X

$$CMC - B = X, \quad (2)$$

en donde:

Solución problema: CMC

Solución de las diferentes concentraciones de tensoactivo con caldo nutritivo: B

El porciento de inhibición, por tanto, se obtiene:

$$\frac{X_i - X}{X_i} = \% \text{ inhibición}, \quad (3)$$

De la misma forma, el porcentaje de supervivencia se evalúa:

$$\frac{X}{X_i} * 100 = \% \text{ supervivencia}. \quad (4)$$

Cabe mencionar que un valor por arriba del 100% de supervivencia, indicaría que se observa un crecimiento del microorganismo más allá del crecimiento solamente con caldo nutritivo, por lo que podría ser un indicativo que éste se encuentra utilizando al tensoactivo como fuente de nutrientes.

De manera simultánea al llenado de las microplacas se tomó una asada de cada tubo y se realizaron resiembras en cajas Petri con agar noble y PDA de cada tensoactivo con cada cepa problema, utilizando un control positivo (control de crecimiento) y un control negativo (medio sin inocular). Posterior a las 24 horas de incubación se observó el crecimiento en el control positivo. La prueba de viabilidad permite determinar si las mediciones realizadas a partir del método espectrofotométrico corresponden a la biomasa activa y al crecimiento poblacional.

4 Discusión de resultados

De los tensoactivos analizados, el SDS inhibe el crecimiento de las cuatro cepas estudiadas, así como *P. aeruginosa* ATCC 27853 utilizada como control, en la Figura 2 se observa crecimiento bacteriano solo por debajo del 40% en presencia de SDS en las cuatro concentraciones.

En la Figura 3, para el caso del Tween 80, las cepas H1 y F2 mostraron porcentajes de supervivencia entre 135% y 280% , es decir, hubo un aumento del crecimiento que puede atribuirse al uso del tensoactivo como nutriente, considerando que este presenta una estructura química base sorbitano, el cual deriva del sorbitol, uno de los principales glúcidos. Por el contrario, la supervivencia de las cepas H6 y *P. aeruginosa* se ve afectada por este tensoactivo. Este tensoactivo inhibe el crecimiento bacteriano, afectando directamente la viabilidad y las tasas de crecimiento.

El Tween 80 por arriba de una concentración crítica, sería perjudicial para la célula, sin embargo, por debajo de la concentración crítica podría tener un efecto de promoción del crecimiento, ya que la célula se puede estresar y posiblemente esto permite una mayor absorción nutricional de los medios (Nielsen et al., 2016). De acuerdo con nuestro caso como las bacterias se encuentran adaptadas a un ambiente contaminado pueden tener mayor resistencia a estos compuestos.

En presencia del tensoactivo Tritón X-100, la Cepa F1, en la Figura 4 se presentan los porcentajes de supervivencia entre el 200% y cercanas al 400% en las cuatro concentraciones. En contraste, la cepa H6 y *P. aeruginosa* muestran el porcentaje de supervivencia más bajos de las cinco especies probadas con este tensoactivo.

Se sabe que el Tritón X-100, a muy bajas concentraciones, es capaz de unirse a las membranas plasmáticas, sin embargo, en las bicapas lipídicas y proteínas produce modificaciones, provocando cambios en las propiedades de las membranas. A altas concentraciones, el tensoactivo puede provocar una lisis (García-Gurtubay García, 2015).

Los tensoactivos aniónicos son la base principal de los detergentes; usualmente estos tensoactivos son utilizados por la eficacia de sus ingredientes activos en formulaciones farmacéuticas, agrícolas, cosméticos, compuestos biotecnológicos y procesos industriales (Lichtfouse, 2009; Miyake & Yamashita, 2017). Los tensoactivos catiónicos son utilizados en suavizantes y desinfectantes, debido a que la mayoría de las superficies de los productos tienen carga aniónica. Este tipo de tensoactivos pueden llegar a tener acción bactericida y son esenciales en productos antibacterianos y de higiene. (López-Mahía et al., 2005; Miyake & Yamashita, 2017). Los tensoactivos no iónicos son utilizados como detergentes, emulsionantes y dispersantes, y se utilizan con frecuencia para controlar las propiedades de dispersión y espesamiento en la industria del cuidado personal (Alfaro-Portuguez, 2019; Miyake & Yamashita, 2017).

Los resultados anteriores se corroboraron de forma cualitativa con pruebas de viabilidad, en las cuales se analizó el crecimiento poblacional de forma visual y se comparó con el control. En la Figura 5 se muestra como ejemplo, el comportamiento de la Cepa H1.

5 Conclusiones y perspectivas futuras

La metodología experimental permitió evaluar de manera cualitativa y cuantitativa el comportamiento de los microorganismos de interés frente a diferentes tensoactivos utilizados en productos de limpieza. Esta metodología podría aplicarse para determinar el comportamiento de otros microorganismos frente a diferentes contaminantes.

Las cepas F1 y F2 aprovechan tanto el Tween 80 como el Tritón X-100 como fuente de nutrientes, sin embargo, se puede concluir que, aunque ambas sean del mismo género, la cepa F1 cuenta con mejor adaptación para el aprovechamiento de tensoactivos.

La cepa H1 mostró el mejor desempeño de las 4 cepas analizadas. Esto puede deberse a la gran variedad de sustratos que el género *Arthrobacter* es capaz de utilizar como fuente de carbono y de energía.

La cepa H6 muestra la menor supervivencia de las 4 cepas analizadas, pero mejor comportamiento que la cepa control, por lo que, al igual que las otras, cuenta con adaptación a medios contaminados.

El presente trabajo permitió mostrar las características, propiedades y el comportamiento de microorganismos y su proceso de supervivencia ante distintos tensoactivos. A partir de este estudio no solamente se demuestra el efecto negativo de ciertos tensoactivos en la microbiota, sino también permite proponer procesos de biorremediación que sean efectivos para determinados contaminantes.

6 Agradecimientos

Agradecemos el apoyo de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad La Salle México, así como a la Coordinación del Laboratorio de Microbiología que nos proporcionó los microorganismos del cepario de microbiología ambiental que fueron utilizados en este trabajo de investigación.

7 Referencias

1. Ahmadi, S., Rezae, A., Ghosh, S., Malloum, A., & Banach, A. (2023). A review on bioelectrochemical systems for emerging pollutants remediation: A computational approaches. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 11(Issue 3). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110021>
2. Alfaro-Portuguez, R. (2019). Tensoactivos y Coadyuvantes en el Control Químico de Malezas. Obtenido de Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA): <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/TlazSviCXNtbTzoiKdoGgfaOVjIMsuT>
3. Behera, S., & Das, S. (2023). Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: Cellular mechanisms and genetic regulations. *Microbiological Research*, Volume 273.
4. Dubey, S., Chen, C.-W., Haldar, D., Tambat, V. S., Kumar, P., Tiwari, A., . . . Patel, A. K. (2023). Advancement in algal bioremediation for organic, inorganic, and emerging pollutants. *Environmental Pollution*, Volume 317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120840>
5. Fernández-Rodríguez, M. D., García-Gómez, M. C., Alonso-Blázquez, N. & Tarazona, J. V. (2014). Soil Pollution Remediation. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, 344-355, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00579-0>
6. García-Gurtubay García, J. (2015). Efectos del detergente no iónico tritón x-100 sobre las membranas mitocondriales. Universidad de Barcelona, España. Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica. [Tesis] para obtener el título de Doctor en Ciencias de la Salud.
7. Lichtfouse, E. (2009). *Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants*. Springer.
8. López-Mahía, P., Muniategui, S., Prada-Rodríguez, D. & Prieto-Blanco, M. C. (2005). SURFACTANTS AND DETERGENTS. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Elsevier, 554-561, <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00608-7>
9. Mao, X., Jiang, R., Xiao, W. & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 285, 419-435, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>
10. Martínez-Organíz, Á., Crespo-Barrera, P. M., Becerril-Bravo, J. E., & Navarro-Frómata, A. E. (2023). Pollutants of emerging concern in tourist beaches of Guerrero, Mexico: A first approach to sources. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 192(Issue 114989). doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114989>
11. Miyake, M., & Yamashita, Y. (2017). Chapter 24 - Molecular Structure and Phase Behavior of Surfactants. *Cosmetic Science and Technology*, Elsevier, 389-414, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00024-0>
12. Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Frontiers in microbiology*, 7(1878), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>
13. UC-Peraza, Russell Giovanni, & Delgado-Blas, Víctor Hugo. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Laeonereis culveri* (Webster 1879) (Polychaeta: Annelida). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(2), 137-144. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992012000200004&lng=es&tlng=es
14. Van-Ginkel, C. G. (2007). 2.1 - Ultimate Biodegradation of Ingredients Used in Cleaning Agents. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*, Elsevier Science B.V., 655-694, <https://doi.org/10.1016/B978-044451664-0/50020-6>

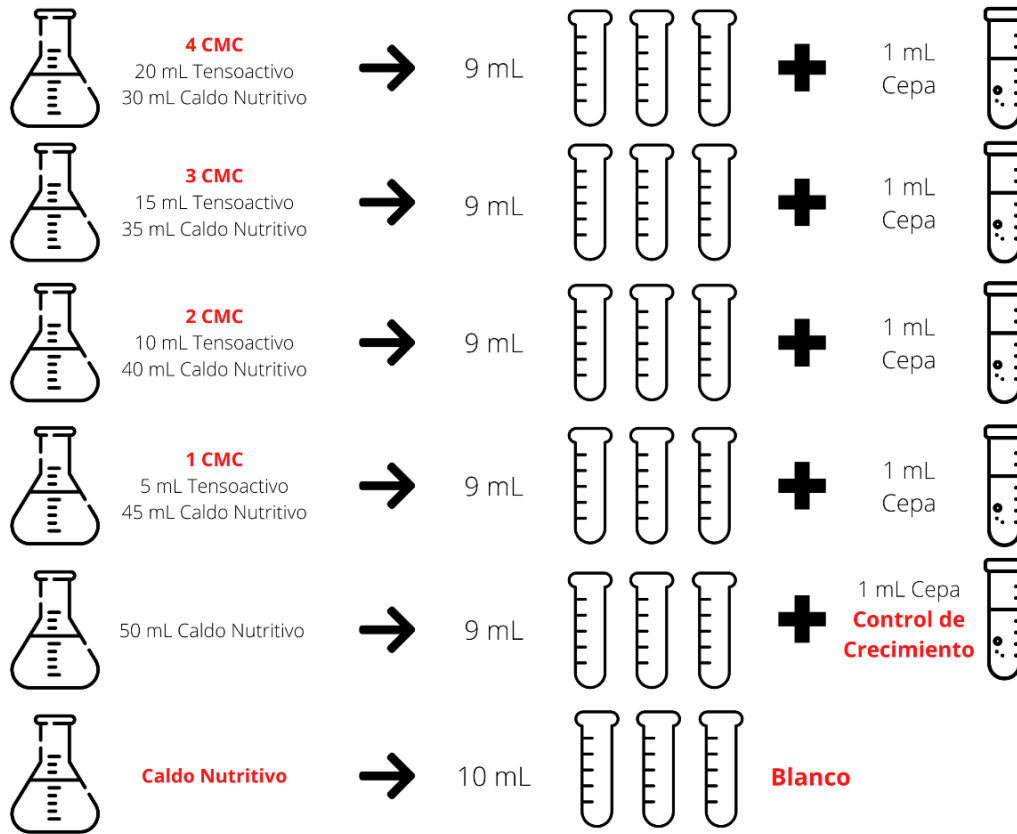


Figura 1. Preparación de concentraciones de tensoactivos con cepa problema. Elaboración propia, noviembre 2022.

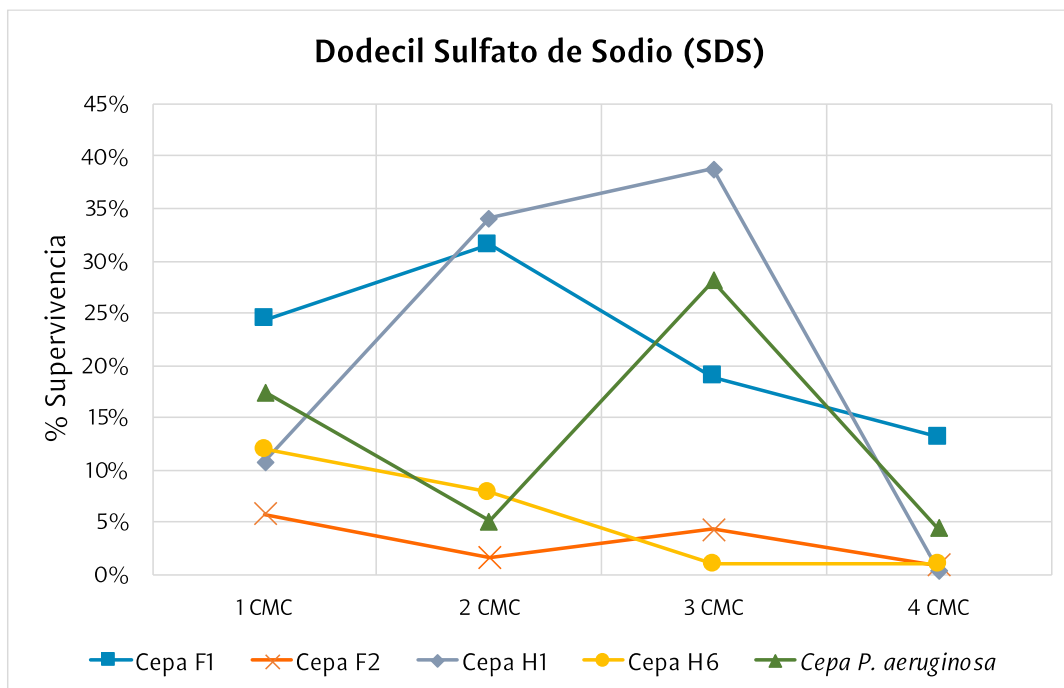


Figura 2. Supervivencia de microorganismos en soluciones de SDS. Elaboración propia, noviembre 2022.

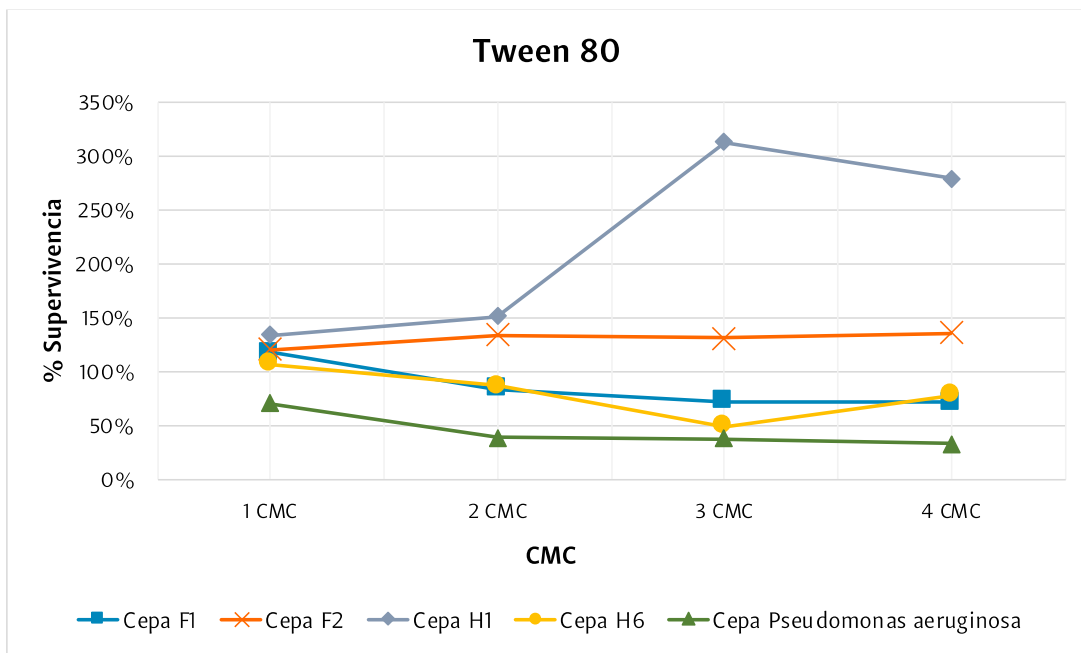


Figura 3. Supervivencia de microorganismos en soluciones de Tween 80.

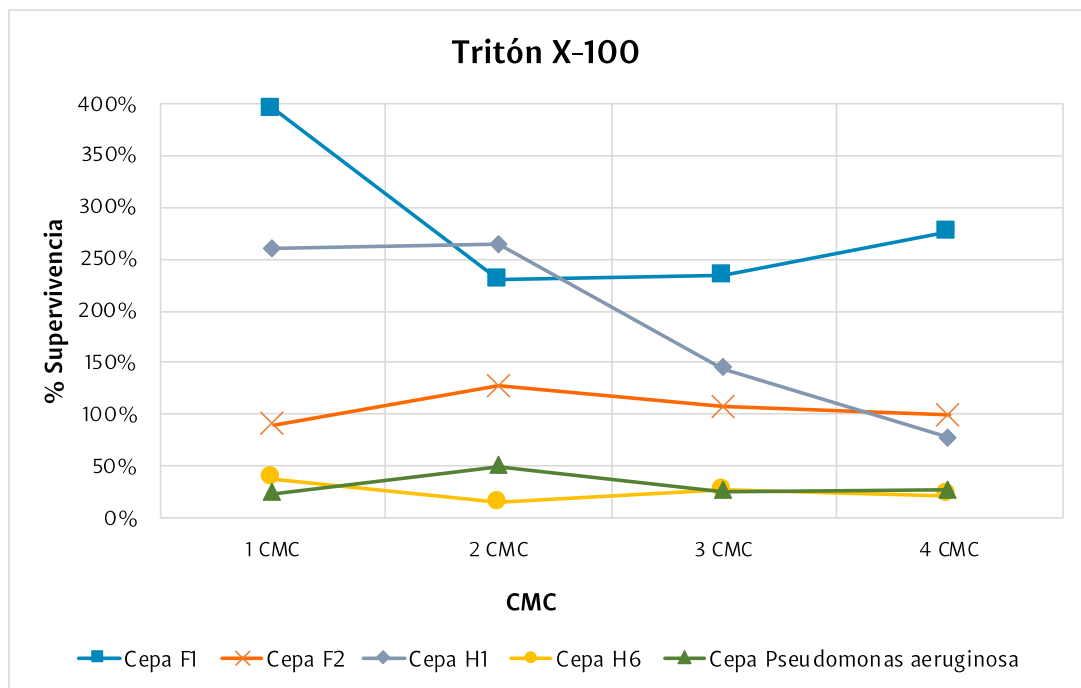


Figura 4. Supervivencia de microorganismos en soluciones de Tritón X-100.

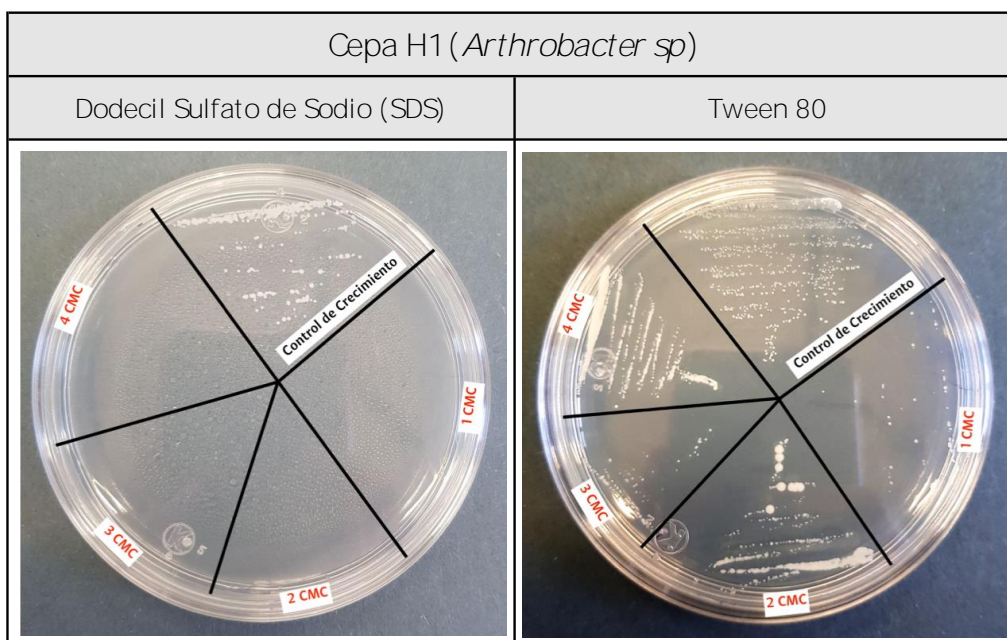


Figura 5. Pruebas de viabilidad para la cepa H1.