

CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas sp.* EN AGUAS RESIDUALES DE CUATRO RESTAURANTES DE LA CIUDAD DEL CUSCO, PERÚ

CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas sp.* IN RESIDUAL WATER OF FOUR RESTAURANTS IN THE CITY OF CUSCO, PERÚ

Erika K. Puma¹, Kevin A. Palomino¹

(1) Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Escuela Profesional de Biología, Av. de la Cultura 773, Cusco-Perú
(email: epumapuma@gmail.com; kevin.leon2008@gmail.com)

Recibido: 03/05/2019 - Evaluado: 03/08/2019 - Aceptado: 25/09/2019

RESUMEN

Esta investigación está orientada al aislamiento y caracterización de bacterias *Pseudomonas sp.* a partir del efluente de las aguas residuales de 04 restaurantes de la ciudad de Cusco, Perú. La selección de dichos restaurantes se realizó por la gran demanda de comensales y su red de desagüe aislada solo para la cocina. Se aisló *Pseudomonas sp.* de las aguas de los restaurantes con la técnica que recomienda la Asociación Americana de Salud Pública. Se realizó la caracterización morfológica, tinción Gram, las pruebas de oxidasa, catalasa, fluorescencia de luz ultravioleta y licuefacción de gelatina. Como resultado se caracterizó 16 colonias del género *Pseudomonas*, de las cuales 16 presentaron coloración Gram negativa, 13 colonias presentaron reacción a catalasa, oxidasa, licuefacción de gelatina y fluorescencia positiva. Se concluye que las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran distribuidas en las redes de desagüe propias del efluente de la cocina de restaurantes.

ABSTRACT

The research is aimed at the isolation and characterization of *Pseudomonas sp* bacteria. from the wastewater effluent from 04 restaurants in the city of Cusco, Peru. The selection of these restaurants was made due of the high demand of diners and its isolated drainage network only for the kitchen. *Pseudomonas sp.* of the waters of restaurants with the technique recommended by the American Public Health Association. Morphological characterization, Gram staining, oxidase testing, catalase, ultraviolet light fluorescence and gelatin liquefaction were performed. As a result, 16 colonies of the genus *Pseudomonas* were characterized, of which 16 had Gram-negative coloration, 13 colonies had reaction to catalase, oxidase, gelatin liquefaction and positive fluorescence. It is concluded that bacteria of the genus *Pseudomonas* are distributed in the drainage networks of the restaurant kitchen effluent.

Palabras clave: *Pseudomonas sp*, oxidasa, catalasa, fluorescencia

Keywords: *Pseudomonas sp*, oxidase, catalase, fluorescence

INTRODUCCIÓN

El agua componente principal para la vida, sistema ecológico en equilibrio que tiene propiedades físicas, químicas y biológicas siendo esta la base de todas las comunidades vivas. Sin embargo, por el desarrollo de actividades humanas sufre alteraciones físicas, químicas y biológicas. En la ciudad del Cusco, Perú los restaurantes se han incrementado a lo largo de todos estos últimos años debido a la gran afluencia de turistas nacionales como extranjeros, el incremento de comensales conlleva al aumento de restaurantes, generándose de esta manera mayor cantidad de aguas residuales con alto contenido en grasas y desechos de cocina. Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan una gran capacidad para utilizar una diversidad de nutrientes razón por la que se explica su habitat ya que *Pseudomonas sp.* tomará como nutrientes las grasas, aceites, petróleo para degradarlo (Mayz & Manzi, 2017).

La familia Pseudomonadaceae incluye a bacilos rectos o ligeramente curvados, de flagelación polar, Gram negativos, estos son incapaces de formar esporas, no fermentan glucosa (Pinzón-Junca, 2019) crecen aeróbicamente, su ganancia energética se da por respiración aeróbica y en algunas especies por respiración anaeróbica (desnitrificación), son bacterias facultativas (Pérez *et al.*, 2015). Desde el punto de vista fisiológico y metabólico las *Pseudomonas* se caracterizan por el amplio espectro de sustratos orgánicos utilizables. También utilizan un gran número de compuestos heterocíclicos y aromáticos que no son atacados por otras bacterias (Garrity *et al.*, 2004).

La contaminación del agua en los restaurantes es generalmente por residuos orgánicos, grasas, aceites, detergentes, sustancias químicas propias de la limpieza y lavado, las que ocasionan daños en las redes de desagüe ocasionando obstrucción debido a la acumulación de grasas, generándose malos olores, daños en la infraestructura de red de desagüe (The city of San Diego, 2013).

Las *Pseudomonas* pueden ser halladas en aguas residuales, y ser utilizadas en la eliminación de grasas, debido a su amplio requerimiento nutricional para su metabolismo que resulta siendo bastante versátil, ya que puede adaptarse a una gran variedad de ambientes hallándose ampliamente distribuida en el suelo y agua (Guerra *et al.*, 2011).

Se buscó caracterizar bacterias del género *Pseudomonas* que habitan en las aguas residuales de restaurantes, debido a que tienen características biorremediadoras que son favorables para la recuperación de aguas contaminadas (Dueñas & Quispe, 2011). Controla diferentes formas de contaminación química, así como degradación de biosidas, detergentes, material plástico, hidrocarburos y demás compuestos xenobióticos. Esta bacteria puede ser útil para el tratamiento de aguas residuales (Frias & Garrido, 2012).

Es por ello que el presente trabajo de investigación está dirigido a conocer la presencia de las bacterias del género *Pseudomonas* en las aguas residuales de cuatro restaurantes de la ciudad del Cusco, Perú donde la toma de muestra se efectuó mediante la técnica recomendada por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 2005).

Para este estudio la toma de muestras se realizó a la salida de los efluentes (sistema de desagüe de la red de cocinas) de los restaurantes seleccionados. Para posteriormente ser transportadas al laboratorio de control de calidad de la Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú (UNSAAC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio a los efluentes de los restaurantes del Cusco, Perú que cumplían con nuestras exigencias para tener una toma de muestra uniforme, debían tener un sistema aislado solo de aguas residuales no domesticas del área de cocina. Se planificó y conversó con los encargados de los 4 restaurantes (Ver figura 1).

Obtención y traslado de muestras de los restaurantes

Se utilizó las normas de bioseguridad para tomar las muestras de agua residual, se recolectaron las muestras en frascos estériles de 50 ml. y fueron transportados en cadena de frío (4°C) siguiendo el protocolo de transporte de muestras, inmediatamente para ser procesadas al laboratorio de Control de Calidad de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Escuela Profesional de Biología de la UNSAAC.

Cultivo en caldo BHI

Se utilizó caldo BHI con la finalidad de proporcionar los nutrientes y condiciones necesarias para que las bacterias recuperen su vitalidad. La preparación del medio se realizó un día antes y se cultivaron en tubos pequeños, se procedió a incubar a 37 °C durante 24 horas.

Siembra en agar Cetrimide

Los tubos presentaron turbidez transcurrido las 24 horas en caldo BHI, se procedió a realizar el aislamiento de las bacterias mediante la siembra por estrías en placas con agar Cetrimide en aerobiosis a 37 °C durante 24-48 horas este medio es diferenciador lo que nos permitirá aislar únicamente las bacterias del género *Pseudomonas*. Este medio presenta en su composición bromuro de cetiltrimetilamonio quien es el responsable de inhibir el desarrollo de otros géneros de bacterias (Dueñas & Quispe, 2011).

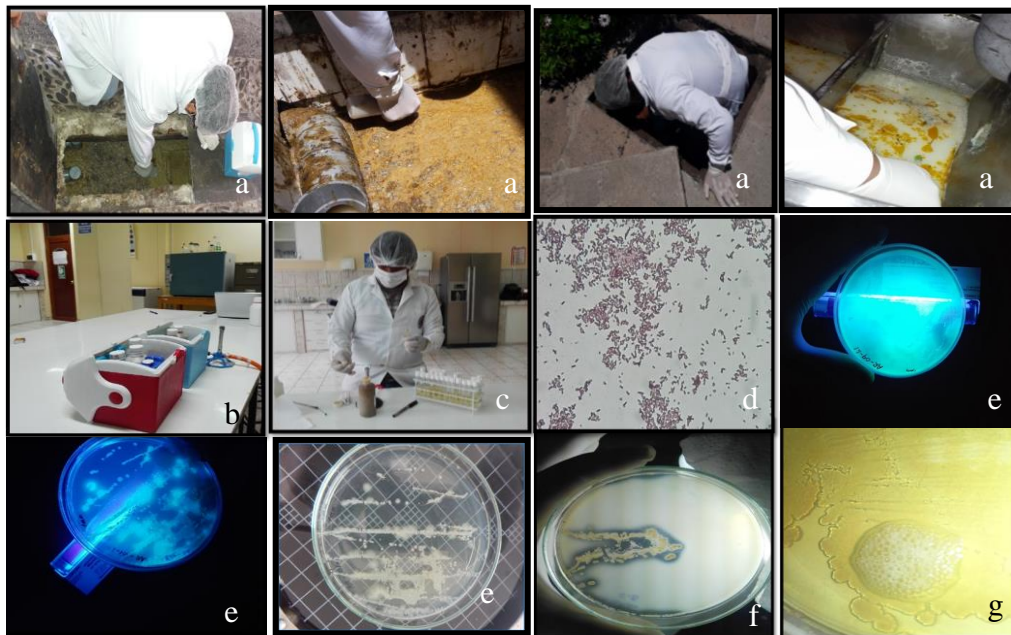


Fig. 1: Toma de muestra y pruebas bioquímicas. a: Toma de muestra de las redes de desagüe de los restaurantes, b: Transporte al laboratorio, c: Cultivo en caldo BHI posterior a ello se hizo la siembra en agar Cetrimide, d: Tinción Gram, e: Prueba de fluorescencia ultravioleta, f: Prueba de licuefacción de gelatina y g: Prueba de catalasa.

Morfología de las colonias

La morfología de las colonias se observó que son diferentes; La unidad formadora de colonias (UFC) creció en agar Cetrimide y se obtuvo diferentes características morfológicas como forma, borde y elevación. Así también se observó la superficie, consistencia, luz transmitida (Vargas & Kuno, 2014).

Tinción Gram

La característica más importante en las bacterias es su forma, la tinción Gram es empleado para la diferenciación y visualización de las bacterias mediante la cual se podrá determinar características morfológicas de las bacterias, existen cocos, bacilos, espirilos. Estas características se determinan observando al microscopio por coloración por el método Gram (López *et al.*, 2014).

Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan la enzima catalasa. Es por ello que se utilizó esta prueba bioquímica para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en las bacterias de este género (Fernández *et al.*, 2010) (Ver figura 1).

Prueba de oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. Durante la prueba la enzima oxidasa en presencia de oxígeno, citocromo C y el reactivo de la oxidasa, este se oxida para producir un compuesto colorido llamado indofenol, el reactivo más usado es el reactivo de Kovacs oxidasa, que es una solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios. Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan la enzima oxidasa. Es por ello que se utilizó esta prueba bioquímica para comprobar la presencia de la enzima oxidasa en este género (Fernández *et al.*, 2010).

Licuefacción de gelatina

La prueba de licuefacción de gelatina se utiliza como medio de cultivo gelatina nutritiva, en esta prueba se pretende determinar la capacidad de *Pseudomonas sp.* de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que licuan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. La gelatina como proteína derivada del colágeno animal es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constituidos, con pérdida de sus características gelificantes (Trujillo, 2014).

Prueba de fluorescencia de luz ultravioleta

Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan la producción de fluorescencia al ser examinadas las placas bajo la luz UV (366 nm), de esta manera la producción de color verde-azulado nos indica la presencia de pirocianina, la producción de un color rojizo o marrón oscuro nos indica la presencia de piorrubina y la producción de un color verde nos indica la presencia de pioverdina, estas proteínas determinan un gen en específico y/o degradación de contaminantes (Avalos, 2008; Bonilla, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aisló *Pseudomonas sp.* de aguas residuales de los cuatro restaurantes en evaluación. Gutiérrez *et al.* (2017), indican que estas bacterias son consideradas patógenas, lo que representa un riesgo para la salud.

Morfología de las colonias

El crecimiento de las colonias fue de distintas formas estas presentaron morfologías típicas de las colonias de *Pseudomonas sp.* como nos menciona (Garrity *et al.*, 2004), presenta borde ondulado, con un color típico verde/azulado. Así la morfología de las colonias se aprecia en la Tabla 1.

Tinción Gram: Las bacterias son Gram negativas, bacilos rectos se encuentran en suelo y agua (Pérez *et al.*, 2015), curvados. Todas las UFC presentan esta característica lo que indica que el agar Cetrimide aisló solo bacterias Gram negativas.

Prueba de oxidasa: Las UFC al ser sometidas a la prueba de oxidasa se obtuvo 13 UFC con reacción a oxidasa positiva (García del Valle *et al.*, 2016). Las bacterias del género *Pseudomonas sp.* Presentan la enzima oxidasa y 03 fueron negativas lo que indican que no tienen esta enzima. Así también, Callico *et al.*, 2004 en sus resultados obtuvieron un 100% de oxidasa positiva en sus de cepas.

Prueba de catalasa: Las UFC al ser sometidas a la prueba de catalasa se obtuvo 13 UFC con reacción a catalasa positiva, ya que estas UFC presentan estas enzimas y 03 fueron negativas lo que indican que no tienen esta enzima. *Pseudomonas sp.* Presentan enzimas catalasa y oxidasa positivo (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Tabla 1: Características Morfológicas: Forma, Borde y Elevación de colonias de *Pseudomonas sp.*

Nº	CÓDIGO	COLOR	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	LUZ TRANSMITIDA
1	RI01020171	Verde oscuro	Circular	Ondulado	Plana	Lisa	Creemosas	Translucida
2	RI01020172	Verde limón	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Creemosas	Translucida
3	RI01020173	Verde limón	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Translucida
4	RI01020174	Verde azulado	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
5	RI01020175	Crema	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
6	RL01020171	Verde oscuro	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
7	RL01020172	Crema	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Creemosas	Translucida
8	RL01020173	Verde limón	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
9	RL02020171	Verde limón	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Creemosas	Opaca
10	RL02020172	Crema	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
11	RL02020173	Verde limón	Circular	Ondulado	Convexa	Rugosa	Creemosas	Opaca
12	RL02020174	Verde azulado	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
13	RC01020171	Verde oscuro	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Translucida
14	RC01020172	Verde oscuro	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
15	RC01020173	Crema	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creemosas	Opaca
16	RC01020174	Crema	Irregular	Entero	Convexa	Rugosa	Creemosas	Translucida

Prueba de fluorescencia de luz ultravioleta: La luz de fluorescencia es fundamental para determinar si estas bacterias pertenecen a este género *Pseudomonas sp.*, que producen pigmentos, de las cuales 13 fueron positivas y 3 negativas (ver Figura 1). Las bacterias presentaron fluorescencia color verde-azulado lo que indica la presencia de pioverdina. (García del Valle *et al.*, 2016). También, Callico *et al.* (2004) utilizaron agar King A y King B para producción de pigmentos obtuvieron un 100 % de bacterias con pigmentos pioverdina en agar King A y un 94% de bacterias que producen pioverdina en agar King B.

Prueba de licuefacción de gelatina: en la Figura 1 se aprecia que la bacteria realizó la licuefacción de gelatina presentando un halo transparente, y también hay bacterias que no realizaron la licuefacción de gelatina y por ende no presentan el halo si no una capa densa opaca. Se utilizó cloruro mercúrico ácido (Reactivo de Frazier) para que se note mejor la hidrólisis de gelatina.

En la Tabla 2 se observa la caracterización de las bacterias *Pseudomonas sp.* Se caracterizó 16 colonias del género *Pseudomonas*, de las cuales 16 presentaron coloración Gram negativa, 13 colonias presentaron reacción a catalasa, oxidasa, licuefacción de gelatina y fluorescencia positiva. Estos resultados obtenidos nos indican que las aguas residuales de los restaurantes en estudio presentan *Pseudomonas sp.* Se determina que se encuentran

ampliamente distribuidas y van cumpliendo un rol fundamental en la remediación de las aguas residuales esto debido a su amplia capacidad alimenticia indicado por Zanaroli *et al.* (2010), citado en Mendol (2014), ya que muchos de ellos utilizan más de 100 compuestos orgánicos indicado por Pérez *et al.* (2008), citado en Mendol, (2014) como grasas, aceites, petróleo y restos de alimentos, así mismo son patógenas para la salud.

Tabla 2: Caracterización de *Pseudomonas sp.*

Resultado	Coloración Gram -	Catalasa	Oxidasa	Licuefacción de gelatina	Fluorescencia de luz ultravioleta
POSITIVO	16	13	13	13	13
NEGATIVO	0	03	03	03	03
TOTAL	16	16	16	16	16

CONCLUSIONES

Las bacterias del genero *Pseudomonas* están presentes en todos los ambientes, cumpliendo roles como remediación de aguas residuales y al mismo tiempo deben tomarse medidas de seguridad para evitar la contaminación ya que son patógenas.

1. Se caracterizaron 16 colonias típicas del género *Pseudomonas sp.* En las aguas residuales de 04 restaurantes de la ciudad del Cusco, Perú.
2. Se caracterizaron 16 colonias del género *Pseudomonas*, de las cuales 16 presentaron coloración Gram negativa, 13 colonias presentaron reacción a catalasa, oxidasa, licuefacción de gelatina y fluorescencia positiva.

Por ello se concluye que las bacterias del genero *Pseudomonas sp.* se encuentran presentes en aguas residuales de restaurantes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco, Perú; Dra. Hedy Espinoza C. y Blga. Giovanna Urbina Q. por su asesoría en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- APHA-Asociación Americana de Salud Pública (2015). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18va ed., Washington.
- Avalos, S.H. (2008). Experiencias para observar el fenómeno de fluorescencia con luz ultravioleta. *Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien.*, 5(3), 377-381.
- Callico, A., Cedre, B., Sifontes, S., Pino, Y., Callis, A. & Esnard, S., (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor*, 13(3), 1-9.
- Dueñas, C. & Quispe, F. (2011). *Resistencia a metales pesados y antibióticos de Pseudomonas sp. Aisladas de ríos salados y Cañipia, Espinar-Cusco*. (Tesis de grado) Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco Facultad de Ciencias Escuela Profesional de Biología. Cusco, Perú. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/UNSAAC/860>
- Bonilla, L. (2017). *¿La fluorescencia en microorganismos puede ser posible?* Obtenido de: <https://www.eurekaciencia.com/naturales/microbiologia/proteina-de-fluorescencia/> Fecha de acceso: 13 de febrero de 2018.

Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, J. & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades, 2-28. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf> Fecha de acceso: 26 de abril de 2017.

Frias, J.P. & Garrido, N.I. (2012). *Biorremediación de aguas contaminadas con detergentes por medio de bacterias quimiosintetizadoras*. Concurso XIII Junior del Agua 2013. CONAPHI-Chile, Stockholm Junior Water Prize, Dirección General de Aguas, Gobierno de Chile. Obtenido de: http://www.juniordelagua.cl/archivos_recursos/phpBf0Msy.pdf Fecha de Acceso: 30 de diciembre 2016.

García del Valle, A., Zamudio, M. & Cruz, M. (2016). *Bacteriología y Micología Médicas*, Manual de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/8Manual_Bacteriologia_Micologia_Medicas.pdf

Garrity, G.M., Bell, J.A. & Lilburn, T.G. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York., May 2004: 1-399. [DOI: 10.1007/bergeysoutline200405] [Online].

Guerra, G.A., Betancourth, C.A. & Salazar, C.E. (2011). Antagonismo de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a *Fusarium oxysporum* fsp. pisi Schtdl en arveja *Pisum sativum* L.. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 14 (2), 33-42.

Gutiérrez, O.G., Navarro, L.F., Loeza, P.D., Guadalupe, O. & Jiménez R. (2017) Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. *Revista Nova scientia*, vol.9 (19) León [DOI:10.21640/ns.v9i19.957] [Online].

López, L.E., Hernández, M., Colín, C.A., Ortega, S., Cerón, G. & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3 (1), 10-18.

Mayz, J.M. & Manzi, L.V. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr.. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19 (1), 29-37.

Mendo, W. (2014). *Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México*. (Tesis de Maestría) Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/41954>

Pérez, S., Coto, O., Echemendía, M. & Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Rev. Protección Veg.*, 30 (3), 225-234.

Pinzon-Junca, A. (2019). *Pseudomonas*. *Rev. Acta Médica Colombiana*, 44 (1), 52.

Trujillo, J.A. (2014). Actividad 5: *Metodología de Aislamiento Purificación y Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Streptococos Y Estafilococos*. Ingeniería Bioquímica, Microbiología General, N°11320489 Instituto Tecnológico de Acapulco. Obtenido de: https://www.academia.edu/11467546/ACTIVIDAD_5_Metodolog%C3%ADa_de_Aislamiento_Purificaci%C3%B3n_y_Pruebas_Bioqu%C3%ADmicas_para_la_Identificaci%C3%B3n_de_Streptococos_Y_Estafilococos. Fecha de acceso: 10 de Abril de 2018.

The city of San Diego, (2013). *Como mantener la grasa de cocinar fuera del desagüe*. Obtenido de: <https://www.sandiego.gov/sites/default/files/legacy/mwwd/pdf/greasespan.pdf>. Fecha de acceso: 21 de febrero de 2019.

Vargas, T. & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49 (2), 2594-2598.

