



Capacidad degradadora de pseudomonas aeruginosa frente a metales pesados presentes en muestras de sedimentos del río Chibunga

Degrading capacity of pseudomonas aeruginosa against heavy metals present in sediment samples from the Chibunga river

Capacidade degradante de pseudomonas aeruginosa contra metais pesados presentes em amostras de sedimentos do rio Chibunga

Karina Inés Paredes-Páliz ^I

kparedespaliz@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5474-2566>

Luis Miguel Santillán-Quiroga ^{II}

luis.santillanquiroga@epoch.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-3215-9369>

María Rafaela Viteri-Uscátegui ^{III}

rafaelaviteri@epoch.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-7901-7360>

Correspondencia: kparedespaliz@gmail.com

Ciencias técnicas y aplicadas

Artículo de investigación

***Recibido:** 30 de marzo de 2021 ***Aceptado:** 22 de abril de 2021 * **Publicado:** 10 de mayo de 2021

- I. PhD en Biología Molecular y Biomedicina. Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación en materiales avanzados GIMA. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Ingeniero Ambiental. Facultad de Ciencias, Carrera de Ingeniería Ambiental, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Ingeniera Ambiental, Facultad de Ciencias, Carrera de Ingeniería Ambiental, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Resumen

La presente investigación presenta un estudio acerca de la determinación de la capacidad biodegradadora que tiene la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, sobre un sustrato conocido como lo es el sedimento de río. Para esto fueron considerados 4 puntos a lo largo del río Chibunga asentado sobre la microcuenca que lleva su mismo nombre. Se determinó, mediante un mapa de uso de suelo, los puntos más sensibles a contaminación e impacto ambiental generado sobre el recurso hídrico, y se procedió a realizar un muestreo puntual en cada punto seleccionado.

Los sedimentos fueron llevados al laboratorio donde se determinó la concentración de metales pesados en las muestras sin tratamiento (suelos no inoculados). Los metales analizados fueron Al, Cu, Ba, Zn, Cd, Ni, Pb, Sr, Ti, y Zn. Se determinó la capacidad de tolerancia a los metales pesados por parte de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y se realizaron ensayos de bioaumentación en las muestras tomadas. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mostró una tolerancia hacia todos los metales pesados en concentraciones de 2mM. Sin embargo, a mayores concentraciones (5 y 10 mM), la bacteria únicamente toleró la presencia de metales como el Al, Zn y Cu. La bioaumentación con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en las cuatro muestras probadas, redujo la concentración de todos los metales pesados que fueron medidos, siendo el Al, Ti y Zn los que disminuyeron hasta un 60% la concentración inicial presente en los suelos muestreados.

Palabras clave: Biorremediación; laboratorio; análisis; muestreo; técnicas; crecimiento bacteriano.

Abstract

This research determined the biodegradable capacity of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, on a substrate known as river sediment. For this, 4 points were considered along the Chibunga river settled on the micro-basin that bears the same name. The most sensitive points of contamination and environmental impact generated on the water resource were determined by means of a land use map, and a point sampling was carried out at each selected point. After the sampling, the sediments were taken to the laboratory where the concentration of heavy metals in the samples without treatment (non-inoculated soils) was determined. The metals analyzed were Al, Cu, Ba, Zn, Cd, Ni, Pb, Sr, Ti, and Zn.

The tolerance capacity to heavy metals by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* was determined and bioaugmentation tests were carried out on the samples taken. *Pseudomonas aeruginosa*

bacteria showed a tolerance to all heavy metals in concentrations of 2mM. However, at higher concentrations (5 and 10 mM), the bacteria only tolerated the presence of metals such as Al, Zn and Cu. Bioaugmentation with the Pseudomonas aeruginosa bacteria in the four samples tested, reduced the concentration of all the heavy metals that were measured, with Al, Ti and Zn decreasing the initial concentration present in the sampled soils by up to 60%.

Keywords: Bioremediation; laboratory; analysis; sampling; techniques; bacterial growth.

Resumo

A presente investigação apresenta um estudo sobre a determinação da capacidade de biodegradação da bactéria Pseudomonas aeruginosa em um substrato conhecido, como o sedimento de um rio. Para este fim, foram considerados 4 pontos ao longo do rio Chibunga, localizado na microbacia com o mesmo nome. Um mapa de uso do solo foi usado para determinar os pontos mais sensíveis à contaminação e ao impacto ambiental gerado sobre o recurso hídrico, e uma amostragem pontual foi realizada em cada ponto selecionado.

Os sedimentos foram levados ao laboratório onde a concentração de metais pesados foi determinada nas amostras não tratadas (solos não-inoculados). Os metais analisados foram Al, Cu, Ba, Zn, Cd, Ni, Pb, Sr, Ti, e Zn. Foi determinada a capacidade de tolerância das bactérias Pseudomonas aeruginosa aos metais pesados e foram realizados ensaios de bioaugmentação sobre as amostras coletadas. As bactérias Pseudomonas aeruginosa mostraram tolerância a todos os metais pesados em concentrações de 2mM. Entretanto, em concentrações mais elevadas (5 e 10 mM), as bactérias toleraram apenas a presença de metais como Al, Zn e Cu. A bioaugmentação com bactérias Pseudomonas aeruginosa nas quatro amostras testadas reduziu a concentração de todos os metais pesados que foram medidos, sendo Al, Ti e Zn os que diminuíram até 60% a concentração inicial presente nos solos amostrados.

Palavras-chave: Biorremediação; laboratório; análise; amostragem; técnicas; crescimento bacteriano.

Introducción

Mediante el análisis de los lodos provenientes del Río Chibunga se ha demostrado que existe una alta presencia de metales, algunos de los cuales no presentan mayor riesgo a la salud humana y al ecosistema. Sin embargo, los iones de metales pesados (como el cromo, cadmio, cobalto, cobre, níquel y mercurio) tienen propiedades toxicológicas y posibles impactos en la salud humana y el medio ambiente (Fu y Wang, 2011). La remoción de metales pesados sin tratamientos apropiados posee un gran impacto en la salud pública debido a su persistencia, biomagnificación y acumulación en la cadena alimenticia.

La remoción y detoxificación de contaminantes que representan una amenaza para la salud pública, principalmente en suelo, agua y sedimentos; puede llevarse a cabo mediante una técnica que emplea el uso de microorganismos conocida como biorremediación (Liu et al., 2018). La biorremediación de metales a través de microorganismos es una estrategia eficiente por su bajo costo, alta eficiencia y su naturaleza eco-amigable (Wasi et al., 2011). Las interacciones metal-microbiota son estudiadas con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (Wasi et al., 2011). El proceso consiste en lograr la transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos, usando enzimas microbianas dando como resultado compuestos poco solubles en agua o bien volátiles. El género *Pseudomonas* sp. es uno de los más interesantes y usados debido a los diversos mecanismos de remediación que posee (Agnello et al., 2016).

El estudio tuvo como propósito aplicar la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, para evidenciar cual fue la capacidad de estas para reducir las concentraciones de metales pesados presentes en los sedimentos de los alrededores del Río Chibunga, que son comunes y que se encuentran disueltos por la utilización de fertilizantes, pesticidas y abonos químicos.

Materiales y Métodos

Los materiales utilizados para el muestreo de los sedimentos en campo fueron:

- 1.- Pala manual.
- 2.- Fundas Ziploc de 5 Kg cada una.
- 3.- GPS Garmin.
- 4.- Cooler.

Para generación de mapas de uso de suelo y puntos georreferenciados:

1.- Software ArcGis.

Métodos

Puntos de muestreo

Se identificaron los puntos más sensibles al impacto generado por actividades: agrícola, agropecuario forestal, y agropecuario mixto y urbana, de donde se consideran los arrastres más grandes de estos compuestos al agua del río Chibunga y sus alrededores.

Se consideró por ende cuatro puntos importantes para el muestreo por la importancia y ubicación de estos.

Frecuencia y secuencia temporal

Según el objetivo de la investigación se realizó un muestreo puntual en cada punto, considerando que fuese la misma estación del año y en la misma fecha.

Toma de muestras

Se tomaron 10 Kg de sedimentos por punto de muestreo, mismos que fueron almacenados

En bolsas de plástico sellada de boca ancho, minimizando la pérdida de humedad y las posibles manipulaciones las cuales puedan contaminar a la muestra antes de llegar al laboratorio para su análisis (Mejía, 2010).

Determinación del UFC de las muestras obtenidas del río Chibunga

Se realizaron 4 diluciones seriadas con agua de peptona desde la 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, en donde en 4 Erlenmeyer de 250ml se colocó 90 ml de agua de peptona dilución 10⁻¹ y se adicionó 10g de cada una de las muestras, luego se colocó en tubos 9 ml de agua de peptona y se adiciono 1 ml de la solución anterior así sucesivamente hasta obtener la dilución 10⁻⁸.

Se prepararon 32 cajas de agar nutritivo en donde se sembraron por extensión en superficie las diluciones anteriores y se dejó a 35°C durante 24 horas y se contó las UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Identificación de Pseudomonas aeruginosa

Se partió de una cepa de Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, obtenida en el laboratorio de Análisis Bioquímico de la ESPOCH, misma que fue identificada bioquímicamente para su respectiva comprobación.

La identificación de la cepa se realizó a partir de la serie bioquímica (triple azúcar hierro agar, agar kligler, manitol, citrato, SIM, úrea y pruebas adicionales como catalasa y oxidasa).

Determinación del nivel de tolerancia de Pseudomonas aeruginosa frente a metales pesados

Se utilizaron 7 Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo y cada uno con una solución de Na, Zn, Al, Ti, Cd, Cu, y Pb en una concentración de 0.1mg/100ml, para el blanco se utilizó solo el metal sin la bacteria y otro sin metal y sin bacteria. Las muestras se inocularon por triplicado y se incubaron a 35°C durante 24 horas y se determinó el crecimiento por turbidez con la escala Macfarland.

Bajo condiciones controladas se seleccionaron las cepas capaces de crecer en caldo nutritivo con metales. Estas fueron trasladadas posteriormente a un medio mínimo para determinar la capacidad de crecimiento y resistencia a metales pesados.

Se seleccionaron 3 tipos de formulaciones “Tabla 1”.

Una vez identificada la formulación de crecimiento óptimo para la bacteria, se procedió a sembrar la misma por el método de difusión en placas. Se colocó el metal en diferentes concentraciones: 2,5, 5 y 10 mM, utilizando como control placas sin metal y se procedió a sembrar la bacteria por extensión en superficie y se determinó la presencia o ausencia de colonias.

Tabla 1: Formulaciones.

FORMULACIONES					
FORMULACIÓN 1		FORMULACIÓN 2		FORMULACIÓN 3	
COMPUESTO	MASA (g)	COMPUESTO	MASA (g)	COMPUESTO	MASA (g)
K ₂ HPO ₄	0,165	K ₂ HPO ₄	0,03	Glucosa	0,60
KH ₂ PO ₄	0,018	NH ₄ Cl	0,06	NH ₄ SO ₄	0,3
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,042	Na ₂ SO ₄	0,12	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,12
KCl	0,03	KNO ₃	0,12	K ₂ HPO ₄	0,12
Extracto de levadura	0,0078	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,012	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,0006
Agar	0,9	TSB	0,60	Agar	0,9
-	-	Agar	0,9	-	-

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Determinación del índice de saturación de los sedimentos

A 170g de lodos aproximadamente se colocó en un tubo con agujeros y en un cristizador y se adiciono 20ml de agua durante 24 horas, donde después se midió con una probeta la cantidad de agua restante. Este método sirvió para poder colocar la cantidad de mililitros de bacterias en dilución a distintas concentraciones.

Bioaumentación de sedimentos con Pseudomonas aeruginosa

Se utilizaron Erlenmeyer de 250ml con 50ml de caldo nutritivo, enriquecido con glucosa, en donde se inoculó las bacterias con mayor cantidad de crecimiento de los metales y se dejó incubar en condiciones especiales de 35°C durante 24 horas, se comparó la turbidez con el estándar 0.5 Mc Farland, luego se realizaron diluciones seriadas 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ en agua de peptona y se sembraron por extensión en superficie de todas las diluciones y se dejó incubar durante 24horas a 35°C, y se contaron las UFC hasta que se puedan contar las colonias.

Las diluciones que mostraron un mayor crecimiento en masa de la bacteria fueron seleccionadas para la inoculación de los sedimentos, usando diferentes concentraciones de acuerdo con el índice de saturación de cada muestra anteriormente obtenido.

Los sedimentos inoculados fueron colocados en gavetas durante 30 días a temperatura ambiente, repitiéndose la inoculación bacteriana cada día hasta el fin del experimento.

Determinación de la cantidad de metales pesados en los lodos después de aplicar la bacteria

Se aplicó el método de determinación por espectrómetro de absorción atómica, el mismo que se aplicó al inicio del análisis para determinar la cantidad de metales obtenidos después de aplicar el tratamiento.

El cual consiste en:

- *Digestión de las muestras*

Se trasfiere 500g de los lodos secos en un Erlenmeyer, luego se agregó 3 ml de agua destilada, y 7,5 ml de ácido clorhídrico y 2,5 ml de ácido nítrico concentrado bajo una Sorbona.

Luego se cubrió con un vidrio reloj durante 12horas, se calentó bajo reflujo durante 2 horas, luego se enjuago con 30ml de agua y recogido en un Erlenmeyer.

Se filtró el extracto en un filtro antiácido en un vaso de precipitación de 50 ml el mismo que debe estar claro.

Se enjuago el vaso de precipitación con el extracto con 10 ml de ácido nítrico 2M a 50°C, se refresco y se diluyo con ácido nítrico 2 M.

- *Análisis de las muestras*

Se colocó la muestra previamente procesada fue colocada en Erlenmeyer de 50 ml y enrasada con agua destilada, se toma 1.5 ml y se agrega 1 ml de HCl al 18 % y 1 ml de Na BH₄, el mismo que se coloca en una balón de dos bocas al cual se va a conectar el equipo de espectrometría de absorción atómica para la determinación de los metales presentes en los suelos.

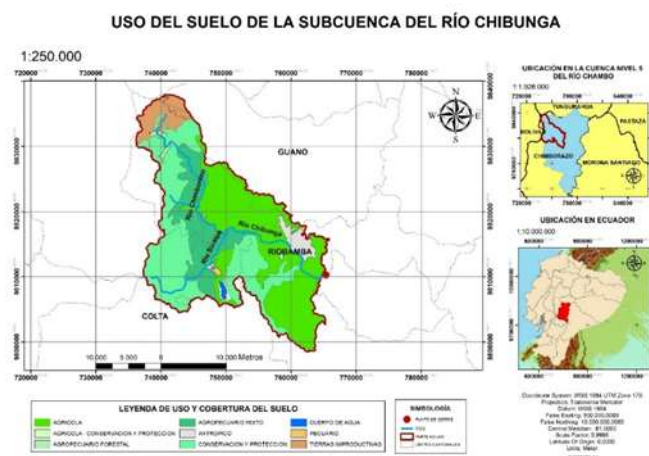
Resultados y discusión

Selección de los puntos de muestreo

Después de verificar los mapas de usos de suelo en la ciudad de Riobamba y sus alrededores, comprobamos una gran incidencia de actividad agrícola, agropecuario mixto, y agropecuario forestal, en las cercanías al río Chibunga, siendo estas las que más contribuyen con una carga contaminante al cuerpo hídrico. “Fig. 1”.

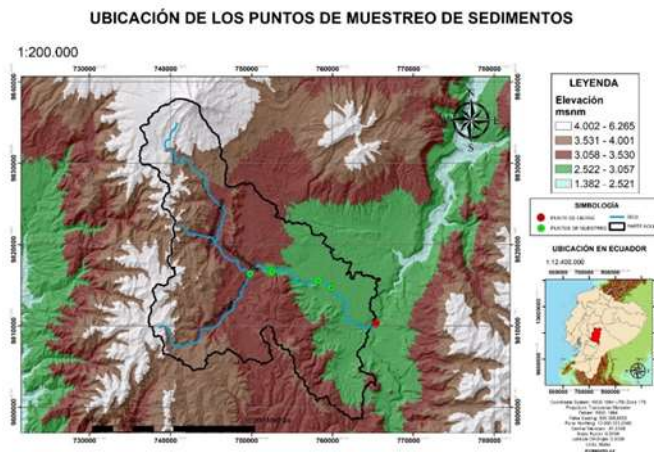
Por tal motivo en relación con la afectación y vulnerabilidad de la zona ribereña del río, hemos seleccionado 4 puntos relevantes a lo largo del mismo, estos se encuentran a una distancia de 4 km de separación, “Fig. 2”.

Figura 1: Mapa de uso de suelo, Subcuenca del Río Chibunga (2019)



Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Figura 2: Mapa de ubicación de los puntos de muestreo de sedimentos. (2019)



Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Concentración de metales en el suelo

La concentración de metales pesados está muy extendida en el medio ambiente; se derivan de dos grandes fuentes: natural y antropogénica. La contaminación ambiental antropogénica es la más extendida y perjudicial debido a su solubilidad y biodisponibilidad y está ocasionada por actividades relacionadas con la minería, agricultura, exceso de fertilizantes y mala depuración de aguas y desechos contaminados con metales pesados. La Tabla 1 muestra la concentración de metales pesados presentes en las 4 muestras de suelo tomadas de los alrededores del Río Chibunga, Provincia de Chimborazo.

El elemento que presentó una mayor concentración mg/Kg es el aluminio (Al), con un promedio para todas las muestras de 12183 mg/Kg. La toxicidad por Al es considerada uno de los factores más limitantes para el crecimiento de plantas. De hecho, en casi todos los ecosistemas que presentan suelos ácidos, por ejemplo, las plantas leñosas no presentan signos de estrés por respuesta a la toxicidad por Al, pero los microorganismos del suelo y los nutrientes mediados por bacterias y hongos pueden verse afectados por la toxicidad de este metal Jha et al (2020); reportó que la adición de Al suprimió la respiración del suelo, la nitrificación y la captación microbiana de NH_4 en suelos de pino. Por lo tanto, la diversidad de microorganismos resistentes a Al juega un papel clave en procesos de recuperación de suelos contaminados.

La toxicidad por Al es más importante que la toxicidad relacionada con el pH en cuanto a crecimiento de plantas en general, por lo que el empleo de microorganismos para reducir las

concentraciones de este metal es una estrategia adecuada para tratar este tipo de suelos (Riaz et al., 2018).

El segundo elemento con mayor concentración en las muestras evaluadas fue el Titanio (Ti), con valores en promedio de 566.1 mg/Kg en todas las muestras de suelo. Metales como El Cd y el Pb mostraron los valores más bajos, con concentraciones de <0.25 y <0.10 respectivamente “Tabla 2”.

Tabla 2: Concentración de metales presentes en suelo antes del tratamiento.

Muestras	Al mg/Kg	Cu mg/Kg	Ba mg/Kg	Cd mg/Kg	Ni mg/Kg	Pb mg/Kg	Sr mg/Kg	Ti mg/Kg	Zn mg/Kg
1	12020.00	25.94	84.95	<0.25	14.59	<0.10	77.25	694.00	56.60
2	10755.00	23.85	74.80	<0.25	16.03	<0.10	67.20	607.00	57.40
3	13120.00	27.61	103.50	<0.25	18.15	<0.10	70.00	314.80	108.20
4	1284.00	21.36	96.70	<0.25	13.90	<0.10	79.00	648.50	<0.50

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Nanopartículas de Titanio tienen el potencial para ser utilizados en productos fitosanitarios y así mejorar su efectividad para descomponer compuestos persistentes de manera más rápida. Sin embargo, la aplicación sistemática y no controlada de tales productos aumentaría dramáticamente la entrada de Titanio en los suelos, sobre todo los usados para la agricultura (Shang et al., 2019). Estudios realizados por varios investigadores aseveran que los suelos tienen un fondo geogénico de TiO₂ en promedio de 0.5%, lo que sugiere una cierta adaptación evolutiva de los microorganismos del suelo al Ti. Sin embargo, El TiO₂ en su forma nanoescala podría afectar a los microorganismos del suelo de manera diferente al Ti natural, afectando potencialmente el funcionamiento de los ecosistemas en varios niveles tróficos (Kah et al., 2018; Moll et al., 2017). El exceso de Ti incluso podría cubrir la raíz o la superficie de las partículas del suelo e inhibir el crecimiento y funcionamiento de algunos microorganismos o perjudicar la colonización de la raíz por microorganismos beneficiosos como hongos micorrícicos o bacterias fijadoras de nitrógeno (Gardea-Torresdey et al., 2014). “Tabla 2”.

Saturación de agua en las muestras de suelo

La saturación de un suelo depende de forma directa de su textura y estructura, siendo los suelos arenosos los que muestran un drenaje más rápido en comparación con suelos más compactos o

arcillosos. La humedad de los suelos disminuye considerablemente en procesos de drenaje, es decir cuando el agua es movida después de lluvias o riegos considerables (Zotarelli et al., 2013).

Una baja cantidad de agua en el suelo puede producir un punto de marchitamiento permanente del suelo que provoca una disminución de la capacidad de campo. En estos casos, las plantas pierden la capacidad de absorber agua por sus raíces llevándolas a su marchitamiento y eventual muerte (Karup et al., 2017; Kim et al., 2017).

Es por esta razón que se considera un suelo sano a aquel que no ha perdido su capacidad de retener niveles apropiados de agua, y que además permite que los compuestos orgánicos e inorgánicos estén biodisponibles para que sean tomados por las plantas, acelerando y facilitando los procesos de biorremediación (Shang y Li, 2019; McIntosh et al., 2017).

En nuestro estudio, calculamos el índice de saturación de las 4 muestras tomadas de sedimentos del Río Chibunga. Los resultados presentados en la Tabla 3 nos indican que la muestra de suelo 2, presentó el menos volumen de saturación, en opuesto con la muestra 1 que presentó el índice más alto. Esto nos sugiere que una de las zonas estudiadas es más propensa a la pérdida de agua, lo que disminuye la capacidad de absorción del suelo y la capacidad de este para mantener materia orgánica en condiciones, que es indispensable para que el suelo sea apto para la agricultura. “Tabla 3”.

Tabla 3: Índice de saturación de las muestras del Río Chibunga.

MUESTRA	MASA (g)	VOLUMEN DE SATURACIÓN (mL)
1	176,82	16
2	167,79	8
3	170,19	11
4	173,78	12

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Caracterización bioquímica de Pseudomonas aeruginosa

Los ensayos realizados para la identificación de la especie *Pseudomonas aeruginosa* dieron resultados positivos para 8 de las 9 pruebas bioquímicas efectuadas, confirmando los criterios de identificación usados para este tipo de bacteria “Tabla 4”. Dentro del grupo de las Gammaproteobacterias, sabemos que *Escherichia coli* es capaz de metabolizar la glucosa y otros azúcares por tres vías de la glucólisis: vía Embden–Meyerhof (EMP), vía pentosa fosfato (PPP) y

Entner-Doudoroff (EDP); sin embargo, *P. aeruginosa* tiene una vía de oxidación de la glucosa altamente activa que limita la fosforilización directa de la glucosa en condiciones de crecimiento aeróbico (Palleroni, 2010; Paz-Zarza et al., 2019). Además, esta bacteria tiene también la capacidad de generar una serie de proteasas, inmonoglobulinas, péptidos antibacterianos, proteínas surfactantes, elastasas etc. En nuestro estudio, la prueba de proteasa dio una reacción positiva, reforzando las características mencionadas. Al ser parte del grupo de bacterias no fermentadoras, tiene la incapacidad de fermentar lactosa “Tabla 2”, siendo capaz de utilizar fuentes de nitrógeno y carbono como el amoníaco y el acetato, obteniendo así la energía de la oxidación de azúcares (Botelho et al., 2019; Freschi et al., 2019). “Tabla 4”.

Medios de cultivo usados para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*:

A diferencia de otras especies del género *Pseudomonas*, la bacteria usada en este trabajo: *Pseudomonas aeruginosa* puede desarrollarse de manera eficaz tanto en agua como en suelo con requerimientos nutricionales mínimos e incluso en ecosistemas hostiles, donde las concentraciones de metales pesados pueden llegar a puntos altos de saturación. Este es uno de los principales motivos por los cuales esta cepa bacteriana es una de las más utilizadas en procesos de biorremediación que pretenden reducir la cantidad de metales a valores aceptados por las regulaciones zonales de cada país.

Tabla 4: Pruebas bioquímicas para la confirmación de especie *Pseudomonas aeruginosa*.

PRUEBA	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
TSI	Amarillo	+
Kliger	Rojo	+
Manitol	-	V
Urea	-	V
Citrato	Azul	+
SIM	Indol	Anillo Rojo
	Movilidad	Turbidez
Catalasa	Reacción	+
Oxidasa	Reacción	+
Proteasa	Reacción	+
Lactasa	Reacción	-

+: Positivo -: Negativo V: Variante

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

En este estudio se evaluaron tres medios de cultivo para el crecimiento de *P. aeruginosa*: un medio mínimo y dos medios enriquecidos con glucosa y una concentración mínima de Agar Tripticasa Soya (TSA) respectivamente “Tabla 5”.

El medio Agar Soya Triptona (TSA) es un medio enriquecido general utilizado para múltiples propósitos, incluido el recuento de placas, mantenimiento de cultivos de reserva, y el aislamiento de microorganismos de una variedad de muestras y procedencias y como base para medios que contengan sangre (Ishii et al., 2015; Kang et al., 2017). Es usado también para una gran variedad de estudios no clínicos y es eficiente para el cultivo de bacterias menos exigentes como Enterobacterias, Enterococcus, Pseudomonas, Bacillus, Staphylococcus, y otros microorganismos con requerimientos similares de crecimiento (Zhurbenko et al., 2006).

En nuestro ensayo quisimos aportar a la formulación 2, los requerimientos mínimos para el crecimiento de *P. aeruginosa* y que nos aportó eficazmente el medio TSA. “Tabla 5”.

Tabla 5: Composición de medios de cultivo para la siembra de *Pseudomonas aeruginosa*.

FORMULACIONES					
FORMULACIÓN 1		FORMULACIÓN 2		FORMULACIÓN 3	
COMPUESTO	MASA (g)	COMPUESTO	MASA (g)	COMPUESTO	MASA (g)
K ₂ HPO ₄	0,165	K ₂ HPO ₄	0,03	Glucosa	0,60
KH ₂ PO ₄	0,018	NH ₄ Cl	0,06	NH ₄ SO ₄	0,3
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,042	Na ₂ SO ₄	0,12	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,12
KCl	0,03	KNO ₃	0,12	K ₂ HPO ₄	0,12
Extracto de levadura	0,0078	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,012	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,0006
Agar	0,9	TSA	0,60	Agar	0,9
-	-	Agar	0,9	-	-

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Nuestros resultados muestran el crecimiento de la bacteria en las 3 formulaciones, sin embargo, el crecimiento fue mucho mayor en la formulación 2 y 3 debido a la presencia de nutrientes como la glucosa “Tabla 6”.

La formulación 1, que contaba con los requerimientos nutricionales mínimos, es de gran ayuda para ensayos de biorremediación, especialmente si se le adiciona al mismo cantidades crecientes de metales pesados o hidrocarburos, ya que obliga a la bacteria a tomar de los mismos, los compuestos necesarios para su crecimiento y metabolismo. Al ver que la bacteria pudo ser capaz de crecer en este medio mínimo, se tomó este medio como medio base para futuros ensayos de

tolerancia y resistencia a metales pesados, siempre y cuando la bacteria haya alcanzado una población importante en un medio más enriquecido. “Tabla 6”.

Tabla 6: Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en las diferentes formulaciones

	FORMULACION 1	FORMULACION 2	FORMULACION 3
RESULTADO	+	+++	++
DETALLE	Nutrientes mínimos	Nutrientes TSB	Nutrientes a base de glucosa

+ Poco crecimiento

++ Crecimiento moderado

+++ Crecimiento abundante

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Tolerancia de Pseudomonas aeruginosa frente a metales pesados

La tolerancia se refiere a la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y crecer de manera óptima bajo condiciones de estrés por metales pesados, sin que esto influya en su funcionamiento normal reproductivo, fisiológico y bioquímico (Abdu et al., 2017). Esta característica de los microorganismos implica diferentes y variados mecanismos como son: formación de complejos metálicos insolubles, volatilización y remoción de estos de suelo y unión del metal a la pared celular o proteínas bacterianas. Otros mecanismos incluyen la regulación de la toma del metal del suelo y la transformación de este a formas menos tóxicas (Chu, 2018; Riaz et al., 2020).

En nuestra investigación, después de haber comprobado la eficiencia de las formulaciones para el crecimiento de *P. aeruginosa*, procedimos a probar el crecimiento de la bacteria en diferentes concentraciones de metales: 2 mM, 5 mM y 10mM.

La bacteria cultivada en concentraciones ascendentes de metales en la formulación 1, presentó un crecimiento bajo pero constante en todos los metales ensayados (Na, Zn, Al, Ti, Cd, Cu y Pb) y en las tres concentraciones probadas. Sin embargo, para el Al y Ti, la bacteria únicamente fue capaz de resistir la mínima concentración ensayada: 2mM “Tabla 7”.

Tabla 7: Crecimiento bacteriano en la formulación 1 con diferentes metales

	Na	Zn	Al	Ti	Cd	Cu	Pb
2mM	+	+	+	+	+	+	+
5 mM	+	+	-	-	+	+	+
10mM	+	+	-	-	+	+	+

Ningún crecimiento

+ Poco crecimiento

++ Crecimiento moderado

+++ Crecimiento abundante

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

En cuanto a la formulación 2, pese a que la resistencia bacteriana se evidenció para todos los metales, el metal frente al cual la bacteria mostró una mayor resistencia fue el Zn, cuyo valor en la muestra 3 del suelo sin tratar fue el más alto (89.5 mg/Kg), sugiriéndonos que la cepa podría ser empleada para un proceso de bioaumentación eficaz “Tabla 8”.

Tabla 8: Crecimiento bacteriano en la formulación 2 con diferentes metales

	Na	Zn	Al	Ti	Cd	Cu	Pb
2Mm	++	++	++	++	+	++	++
5 Mm	-	++	++	-	-	-	++
10Mm	-	++	- -	- -	- -	- -	- -

Ningún crecimiento

+ Poco crecimiento

++ Crecimiento moderado

+++ Crecimiento abundante

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Los resultados de la bacteria cultivada en la formulación 3 nos indican que la cepa mostró resistencia para todos los metales ensayados, sobre todo para las tres concentraciones de Al y Cu probadas.

A diferencia de la formulación 2, en donde la resistencia al Cu estuvo presente sólo en la mínima concentración, la resistencia de *P. aeruginosa* mostró una resistencia alta en las 3 concentraciones de Cu, sugiriéndonos que la bacteria también podría ser útil para disminuir la cantidad de este metal en el suelo “Tabla 9”.

Tabla 9: Crecimiento bacteriano en la formulación 3 con diferentes metales

	Na	Zn	Al	Ti	Cd	Cu	Pb
2Mm	++	++	+	++	+	++	++
5 Mm	+	--	+	-	-	+	--
10Mm	-	- -	+	- -	- -	+	- -

Ningún crecimiento

+ Poco crecimiento

++ Crecimiento moderado

+++ Crecimiento abundante

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Estos datos coinciden con estudios realizados (Paredes-Páliz et al., 2016a) en donde la mayoría de los aislados bacterianos de la rizósfera de *Spartina maritima* fueron resistentes a concentraciones intermedias de Cu, Zn y Pb.

Inoculación bacteriana en muestras de suelo

La población microbiana del suelo está bajo una gran presión debido a la contaminación por una variedad de sustancias tóxicas como pesticidas, metales pesados y contaminantes orgánicos. Los microorganismos del suelo utilizan algunos metales pesados como donantes o aceptores de electrones durante su metabolismo sin que éstos manifiesten signos de toxicidad; además, como vimos en resultados anteriores, exhiben diferente tolerancia frente a los metales pesados. La biomasa bacteriana presente en el suelo juega un papel indirecto pero muy importante en la fitorremediación de metales pesados ya que actúan directamente en la rizósfera de las plantas y ayuda a que los metales se presenten en su forma soluble que los vuelve de fácil disposición para la absorción de la planta (Paredes-Páliz et al., 2017; Abdu et al., 2017).

Los microbios del suelo han ideado varios mecanismos para mitigar y combatir el efecto de la toxicidad de los metales pesados para su metabolismo y supervivencia (Zhang et al., 2016). Están equipados con genes que les permiten acumular metales pesados más allá de ciertos límites y también tienen la capacidad de modificar o transformar metales pesados a formas menos tóxicas, sobreviviendo y llevando a cabo sus actividades normales en medios altamente contaminados. Estas ventajas han sido aprovechadas por investigadores, quienes han estudiado varios genes en organismos útiles en el campo de la Biorremediación (Paredes-Páliz et al., 2016b; Lebrazi y Fikri-Benbrahim, 2018; Nadeem et al., 2020).

Nuestros resultados muestran las concentraciones de metales en cada una de las muestras al finalizar el tiempo de tratamiento con la inoculación bacteriana. Metales como el Cd y el Pb no fueron considerados debido a que su concentración inicial fue de <0.25 y <010 respectivamente, un valor muy por debajo de los límites de intervención “Tabla 10”.

Tabla 10: Concentración de metales antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa*

Muestras	Al mg/Kg	Cu mg/Kg	Ba mg/Kg	Cd mg/Kg	Ni mg/Kg	Pb mg/Kg	Sr mg/Kg	Ti mg/Kg	Zn mg/Kg	
1	A	12,020.00	25.94	84.95	<0.25	14.59	<10	77.25	694.00	56.60
	D	6010.00	18.15	62.03	<0.25	10.54	<10	57.15	329.00	26.60
2	A	10,755.00	23.85	74.80	<0.25	16.03	<10	67.20	607.00	57.40
	D	5654.00	16.69	52.08	<0.25	12.00	<10	47.20	306.00	27.25
	A	13,120.00	27.61	103.50	<0.25	18.15	<10	70.00	314.80	108.20

3	D	6700.00	19.33	84.50	<0.25	15.15	<10	50.50	14.80	89.50
4	A	12,840.00	21.36	96.70	<0.25	13.90	<10	79.00	648.50	<0.50
	D	6300.00	14.95	73.20	<0.25	9.8	<10	59.03	328.00	<10

A: Antes de la inoculación bacteriana

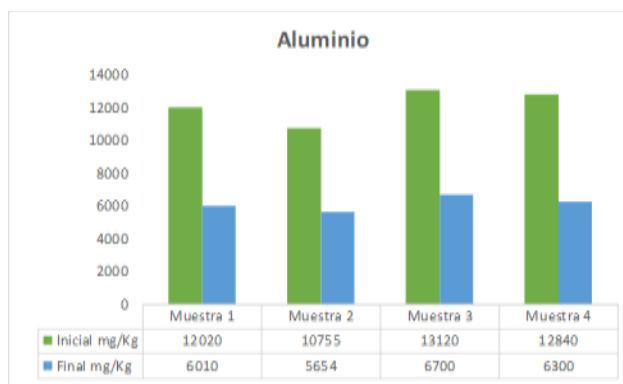
D: Después de la inoculación bacteriana

Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

La tabla 10 nos indica las concentraciones iniciales (suelos sin inoculación bacteriana) y finales (suelos con la bacteria *P. aeruginosa*) de los metales enviados para análisis.

En cuanto al Al “Fig. 3”, todas las muestras de suelo presentan una reducción significativa (60% aproximadamente), siendo este elemento el que tuvo concentraciones iniciales por sobre los 10000 mg/Kg. Se conoce, por varios estudios, que la presencia de aluminio puede causar la inhibición total del crecimiento bacteriano, debido a su unión con el ADN, las membranas y la pared celular. Sin embargo, *P. aeruginosa*, que es un tipo común de bacteria que puede aislarse fácilmente de suelos, sedimentos y cuerpos de agua contaminados, se caracteriza por su capacidad de realizar biosorción y bioacumulación de aluminio dentro de sus células, lo que explicaría de alguna medida la alta capacidad de adaptación de la bacteria y la disminución del metal después del tratamiento (Klein et al., 2009; Tsakiridis, 2012; Kurniawan et al., 2018).

Figura 3: Concentraciones de Aluminio antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa*

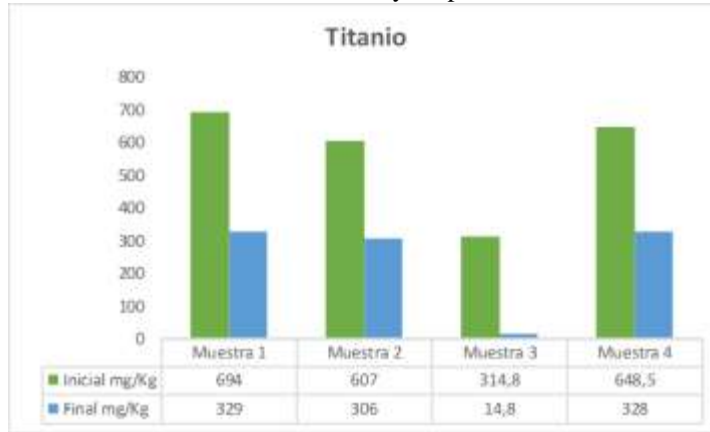


Fuente: Paredes-Páliz et al, 2021

El segundo elemento que presentó concentraciones más altas en los suelos fue el Ti. Este tuvo una disminución de más del 50% en las muestras 1, 2 y 4, mientras que la muestra 3 tuvo una disminución de 21 veces su concentración inicial, indicándonos la gran capacidad de la bacteria a

tolerar este metal. “Fig. 4”. El TiO₂ es usado comúnmente como alternativas a la esterilización convencional, desinfectando zonas, especialmente hospitalarias, gracias a las propiedades fotocatalíticas de este metal. Sin embargo, el uso generalizado y descontrolado de antibióticos ha causado, en gran medida, la aparición de cepas resistentes a este elemento (Cheng et al., 2009; Liou et al., 2012).

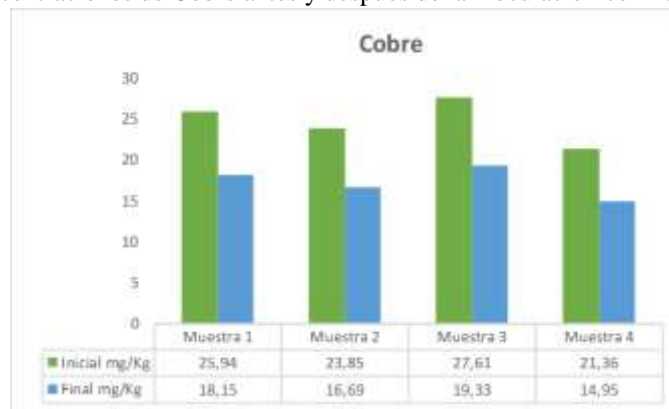
Figura 4: Concentraciones de Titanio antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa*



Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

En cuanto al Cu no tuvo una mayor reducción de su concentración en las 4 muestras de suelo probadas, manteniéndose los valores casi iguales a los iniciales. Cabe recalcar que las concentraciones de Cu en el suelo inicial no fueron altas y tampoco sobrepasaron los límites permitidos por la legislación local, por lo que no se consideraron a los suelos como contaminados por este metal “Fig. 5”.

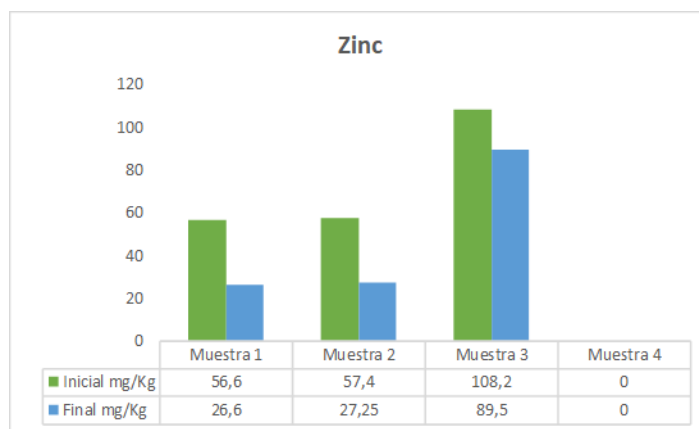
Figura 5: Concentraciones de Cobre antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa*



Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Para que un suelo sea considerado como contaminado por Zinc, este elemento debe sobrepasar valores por encima de los 1000 mg/Kg. Nuestros resultados indican que este metal no superó los límites permisibles, por lo que consideramos a todas las zonas muestreadas como suelos sin contaminación por Zinc. Pese a esto, nuestros datos señalan una reducción de este metal en aproximadamente un 50% en las muestras 1 y 2, y de un 25% en la muestra 3. La muestra 4 presentó valores significativos para este metal antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa* “Fig. 6”.

Figura 6: Concentraciones de Cobre antes y después de la inoculación con *P. aeruginosa*



Fuente: (Paredes-Páliz et al., 2021)

Conclusiones

El presente estudio ha demostrado la capacidad degradadora de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* para la degradación de metales pesados presentes en sedimentos del Río Chibunga. La determinación de las propiedades físico-químicas de los suelos, así como la concentración de metales pesados, fue determinante para comparar las muestras antes y después de la inoculación bacteriana. La bioaumentación de las diferentes muestras de sedimentos por parte de la bacteria *P. aeruginosa* redujo la concentración (mg/Kg) de todos los metales pesados estudiados en un promedio de 20-40% con una reducción mayor en concentraciones de metales como el Aluminio y Titanio (>50%). Pese a que en este trabajo proporcionó resultados positivos mediante el uso de una cepa bacteriana comercial, el eventual uso de una cepa nativa aislada de los sedimentos contaminados sería una mejor alternativa a la hora de diseñar metodologías de biorremediación

que resulten más efectivas. Este trabajo ha sentado la línea base para futuros estudios en la zona donde se pueda realizar ensayos de bioaumentación con el uso de consorcios bacterianos (cepa comercial y cepas nativas), esto debido a que es el primer estudio de este tipo que se realiza en las inmediaciones del Río Chibunga, provincia de Chimborazo.

Agradecimientos

Para el desarrollo del presente artículo hemos contado con el apoyo del laboratorio de análisis bioquímico y bacteriológico, así como también de la facultad de ciencias, y del grupo GIADE de la misma.

Referencias

1. Abdu, N., Abdullahi, A. A., & Abdulkadir, A. (2017). Heavy metals and soil microbes. *Environmental chemistry letters*, 15(1), 65-84.
2. Agnello, A., Bagard, M., Hullebusch, E., Esposito, G., & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 693-703.
3. Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44, 100640.
4. Cheng, C. L., Sun, D. S., Chu, W. C., Tseng, Y. H., Ho, H. C., Wang, J. B., ... & Yu, M. S. (2009). The effects of the bacterial interaction with visible-light responsive titania photocatalyst on the bactericidal performance. *Journal of biomedical science*, 16(1), 7.
5. Chu, D. (2018, February). Effects of heavy metals on soil microbial community. In *IOP Conference Series: Earth and environmental science* (Vol. 113, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.
6. Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., & Levesque, R. C. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome biology and evolution*, 11(1), 109-120.

7. Fu, F., & Wang, Q. (2011). Eliminación de iones de metales pesados de las aguas residuales: una revisión. *Journal of Environmental Management*, 407-418.
8. Gardea-Torresdey, J. L., Rico, C. M., & White, J. C. (2014). Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environmental science & technology*, 48(5), 2526-2540.
9. Ishii, M., Matsumoto, Y., & Sekimizu, K. (2015). Compounds in a particular production lot of tryptic soy broth inhibit *Staphylococcus aureus* cell growth. *Drug discoveries & therapeutics*, 9(3), 178-183.
10. Jha, P., Hati, K. M., Dalal, R. C., Dang, Y. P., Kopittke, P. M., & Menzies, N. W. (2020). Soil carbon and nitrogen dynamics in a Vertisol following 50 years of no-tillage, crop stubble retention and nitrogen fertilization. *Geoderma*, 358, 113996.
11. Kah, M., Kookana, R. S., Gogos, A., & Bucheli, T. D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature nanotechnology*, 13(8), 677-684.
12. Kang, H. R., Lee, Y. L., & Hwang, H. J. (2017). Potential for application as a starter culture of tyramine-reducing strain. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*.
13. Karup, D., Moldrup, P., Tuller, M., Arthur, E., & de Jonge, L. W. (2017). Prediction of the soil water retention curve for structured soil from saturation to oven - dryness. *European Journal of Soil Science*, 68(1), 57-65.
14. Kim, P. G., Roh, J. Y., Hong, Y., & Kwon, J. H. (2017). Effects of soil water saturation on sampling equilibrium and kinetics of selected polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 184, 86-92.
15. Klein S., Lorenzo C., Hoffmann S., Walther J.M., Storbeck S., Piekarski T., Tindall B.J., Wray V., Nimtz M. & Moser J. (2009). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNAdependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Journal of Molecular Microbiology*, 71(3), 551-565.
16. Kurniawan, S. B., Purwanti, I. F., & Titah, H. S. (2018). The effect of pH and aluminium to bacteria isolated from aluminium recycling industry. *Journal of Ecological Engineering*, 19(3).

17. Lebrazi, S., & Fikri-Benbrahim, K. (2018). Rhizobium-Legume Symbioses: Heavy metal effects and principal approaches for bioremediation of contaminated soil. In *Legumes for soil health and sustainable management* (pp. 205-233). Springer, Singapore.
18. Liou, J. W., & Chang, H. H. (2012). Bactericidal effects and mechanisms of visible light-responsive titanium dioxide photocatalysts on pathogenic bacteria. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 60(4), 267-275.
19. Liu, H., Xu, F., Xie, Y., Wang, C., Zhang, A., Li, L., & Xu, H. (2018). Effect of modified coconut shell biochar on availability of heavy metals and biochemical characteristics of soil in multiple heavy metals contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 645, 702-709.
20. McIntosh, P., Schulthess, C. P., Kuzovkina, Y. A., & Guillard, K. (2017). Bioremediation and phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) under various conditions. *International journal of phytoremediation*, 19(8), 755-764.
21. Mejia, G. (06 de septiembre de 2010). SESA. Obtenido de SESA: <https://www.sanidadambiental.com/2010/09/06/toma-de-muestras-para-la-determinacion-de-la-radiactividad-ambiental/>
22. Moll, J., Klingenfuss, F., Widmer, F., Gogos, A., Bucheli, T. D., Hartmann, M., & van der Heijden, M. G. (2017). Effects of titanium dioxide nanoparticles on soil microbial communities and wheat biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 111, 85-93.
23. Nadeem, N., Asif, R., Ayyub, S., Salman, S., Shafique, F., Ali, Q., & Malik, A. (2020). Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2020(1), e035-e035.
24. Palleroni, N. J. (2010). The Pseudomonas story. *Environmental microbiology*, 12(6), 1377-1383.
25. Paredes-Páliz, K. I., Caviedes, M. A., Doukkali, B., Mateos-Naranjo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., & Pajuelo, E. (2016a). Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19825-19837.
26. Paredes-Páliz, K. I., Mateos-Naranjo, E., Doukkali, B., Caviedes, M. A., Redondo-Gómez, S., Rodríguez-Llorente, I. D., & Pajuelo, E. (2017). Modulation of *Spartina*

- densiflora plant growth and metal accumulation upon selective inoculation treatments: A comparison of gram negative and gram positive rhizobacteria. *Marine pollution bulletin*, 125(1-2), 77-85.
27. Paredes-Páliz, K. I., Pajuelo, E., Doukkali, B., Caviedes, M. Á., Rodríguez-Llorente, I. D., & Mateos-Naranjo, E. (2016b). Bacterial inoculants for enhanced seed germination of *Spartina densiflora*: Implications for restoration of metal polluted areas. *Marine pollution bulletin*, 110(1), 396-400.
 28. Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189.
 29. Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Wang, Q., Cao, H., Yang, G., ... & Wang, X. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 123919.
 30. Riaz, M., Yan, L., Wu, X., Hussain, S., Aziz, O., & Jiang, C. (2018). Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 165, 25-35.
 31. Shang, L., & Li, D. (2019). Comparison of different approaches for estimating soil water characteristic curves from saturation to oven dryness. *Journal of Hydrology*, 577, 123971.
 32. Shang, Y., Hasan, M., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., & Zhou, J. (2019). Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review. *Molecules*, 24(14), 2558.
 33. Tsakiridis, P. E. (2012). Aluminium salt slag characterization and utilization—A review. *Journal of hazardous materials*, 217, 1-10.
 34. Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2011). Suitability of immobilized *Pseudomonas fluorescens* SM1 strain for remediation of phenols, heavy metals and pesticides from water. *Water, Air and Soil Pollution*.
 35. Zhang, C., Nie, S., Liang, J., Zeng, G., Wu, H., Hua, S. & Xiang, H. (2016). Effects of heavy metals and soil physicochemical properties on wetland soil microbial biomass and bacterial community structure. *Science of the Total Environment*, 557, 785-790.

36. Zhurbenko, R., Rodríguez Martínez, C., Díaz Pérez, M., Durán Vila, A., López Hernández, O. D., Oramas, V., & Rosa, D. (2006). Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 58(2), 0-0.
37. Zotarelli, L., Dukes, Y. & Morgan, T. (2013). Interpretación del Contenido de la Humedad del Suelo para Determinar Capacidad de Campo y Evitar Riego Excesivo en Suelos Arenosos Utilizando Sensores de Humedad, [en línea]. The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), 2-5.

© 2020 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)