



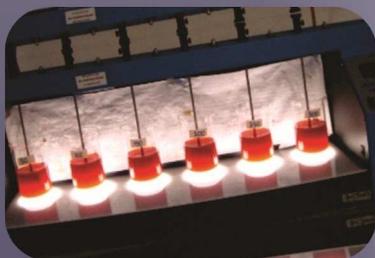
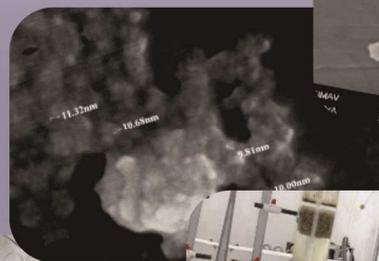
## Aplicaciones en

# Bioingeniería

## Ambiental

SIBA, el ambiente de discusión y de intercambio de conocimiento entre expertos, profesores y estudiantes, en el área de procesos aplicados en la ingeniería Ambiental.

- Metodologías Innovadoras aplicadas a Bioprocesos
- Tratamiento de Residuos
- Tecnologías Anaerobias y Aerobias
- Energía
- Bioprocesos
- Nanotecnología
- Bioremediación
- Biotecnología
- Tratamiento de Agua



**Cuerpo Académico "Gestión Ambiental"**

Arodí Bernal Martínez  
Germán Cuevas Rodríguez  
Sergio Antonio Silva Muñoz  
Elcia Margareth Souza Brito

Departamento de Ingeniería Civil  
División de Ingenierías  
Campus Guanajuato



# “APLICACIONES EN BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”

ISBN: 978-607-441-276-5



9 786074 412765

DR. © 2013 Universidad de Guanajuato

Memorias del Primer Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental,  
organizado por el Cuerpo Académico de Gestión Ambiental  
Guanajuato, Guanajuato, México  
4 al 6 de Septiembre del 2013

**“APLICACIONES EN BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”**  
Primera edición 2013

D.R. © 2013, Universidad de Guanajuato  
Lascuráin de Retana 5, Zona Centro  
Guanajuato, Gto., C.P. 36000

Edición: Cuerpo Académico “Gestión Ambiental”  
Arodí Bernal Martínez  
Germán Cuevas Rodríguez  
Sergio Antonio Silva Muñoz  
Elcia Margareth Souza Brito

ISBN: 978-607-441-276-5

## BIOPROSPECCION DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS DE UN SITIO GEOTÉRMICO, LOS AZUFRES

*Gómez Marmolejo Jéssica Jazmín<sup>1</sup>*, *Rico Mauricio<sup>1</sup>*, *Souza Brito Elcia Margareth<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato, DI – Ing. Civil/Ingeniería Ambiental, Guanajuato, Mexico, e-mail [laflais\\_jazmin@hotmail.com](mailto:laflais_jazmin@hotmail.com); [emsbrito@gmail.com](mailto:emsbrito@gmail.com)

### RESUMEN

En ese trabajo se realizó la bioprospección de bacterias sulfato reductoras de un sitio geotérmico, Los Azufres, Michoacán. Los microorganismos prospectados fueron bacterias sulfato reductoras (BSR), acidófilas, aeróbicas y anaeróbicas, por medio de las técnicas de Roll Tube agar-semi sólido y medio líquido. Además se extrajo el DNA genómico de los aislados y se amplificó el gene DNAr 16S por medio de cadena de polimerasa (PCR). Las técnicas probadas se muestrearon eficientes en la bioprospección de las BSR, sin embargo no se pudo observar el crecimiento celular en medio líquido suficiente para la obtención del DNA y amplificación del gene DNAr 16S, para la realización del análisis filogenético de estos aislados.

**PALABRAS CLAVES :** PCR, BSR, Anaerobiosis, Electroforesis, Roll Tube, Agar Semi-Sólido.

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias extremófilas son mayoritariamente microorganismos procariontes pertenecientes a los dominios Bacterias y Arqueas capaces de crecer bajo condiciones de estrese químico, tal como elevadas temperaturas, ausencia de oxígeno, elevadas concentraciones de metales, condiciones extremas de pH, entre otros. La supervivencia de los extremófilos es posible debido a que sus células tienen componentes y propiedades particulares que les permiten mantenerse estables en el entorno en el que viven. Algunas de estas propiedades son por ejemplo, la presencia de enzimas termosensibles, composición química diferenciada de su membrana, capacidad de síntesis de metabolitos (enzimas) como resultado de adaptación al medio en que viven, etc. Por ejemplo, es conocido que algunos microorganismos termófilos y hipertermófilos poseen enzimas que no se desnaturalizan a altas temperaturas y protegen al ADN para evitar su degradación. Estas enzimas, al igual que las que funcionan a bajas temperaturas o a pH extremos, son conocidas como extremozimas [1]. Estas características son muy interesantes en la búsqueda de nuevas tecnologías, y ponen la bioprospección de microorganismos extremófilos como una nueva línea de investigación científica en pleno ascenso en la actualidad. Para tanto, es necesario acceder los microorganismos aislados, con la finalidad de estudiar con mayor detalle su maquinaria bioquímica y fisiológica, y posteriormente su aplicación biotecnológica, sea el microorganismo *per se* o alguno de sus productos. La bioprospección consiste exactamente en esta búsqueda.

Se ha observado por técnicas de metagenómica que los microorganismos son omnipresentes en todos los ambientes estudiados el planeta, sin embargo tan solo una fracción muy pequeña del orden de 1% se ha cultivado en laboratorio. Esto se debe principalmente por nuestra incapacidad de simular el microambiente ideal para el aislamiento de estos. La dificultad de aislar los microorganismos es aun más difícil para los microorganismos extremófilos. Para el aislamiento de los microorganismos anaeróbicos se puede utilizar por ejemplo, la técnica del Roll-Tube, que data de los años 60, pero aun es muy utilizado y muy eficiente sobre todo para el aislamiento de los anaeróbicos restringidos.

El método del *Roll-Tube* es una técnica que consiste en preparar un tubo con una delgada tapa de agar rodeado por una atmósfera de gas libre de oxígeno. La muestra se inocula mientras que se rota el tubo, produciendo la delgada capa de agar, sobre la cual se desarrollarán las colonias. Para certificar la anaerobiosis, se utiliza tampones impermeables a gases [2]. Después de un periodo de incubación, las colonias (que crecen en esta capa) son fácilmente recolectadas, con auxilio de una aguja estéril e inoculada en medio líquido- anaeróbico.

Otra técnica también utilizada en la bioprospección de los microorganismos anaeróbicos es la siembra en agar semi-sólido (reducido y anaeróbico), también mantenido en atmósfera anaeróbica. En esta técnica, se hace la inoculación con el agar todavía fluido, y las colonias que

crecen dentro del agar son aspiradas, con auxilio de una jeringa y aguja estéril e, inoculada en medio líquido- anaeróbico. Una vez obtenido el aislado, ese es crecido en medio líquido, para posteriormente obtener un precipitado de células. De esto, se extrae el DNA genómico y el fragmento del gene DNAr 16S es amplificado por medio de una reacción de cadena de polimerasa (el PCR) [4].

El objetivo de este trabajo fue aplicar técnicas tradicionales de cultivo, el Roll-tube, para aislar microorganismos anaeróbicos (procariotas sulfato reductores) de un sitio extremo en México. Se utilizó en ese trabajo muestras colectadas del sitio extremo, el SPA Los Azufres, ubicado en el sitio geotérmico Los azufres, Michoacán.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Medio de mineral mínimo (MMM)**- Se utilizó como medio de cultivo un medio mineral preparado a partir del agua del sitio esterilizado tres veces en autoclave (a 121°C por 2h) con intervalos de 24 h entre cada esterilización. Esa agua, antes de usar fue filtrada (0.25 µm de malla).

**MMM para cultivo de las bacterias anaeróbicas** –Para preparar 100 ml de medio BSR se necesito 0.05 ml de glicerol (1M), de lactato (1M), de piruvato (1M), de acetato de sodio (1M) y extracto de levadura (1M), 0,0003g de rezasurina, 95 ml de agua del sitio (previamente esterilizada 3 veces cada 24 h., por 2h en autoclave). Se esterilizó nuevamente y se desgasificó usando Nitrógeno. Una vez que ya estaba frio, se le agregó 0.1 ml de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M), 0,1 mL de dithionite, 0,1 mL de metales traza y 0,1 mL de vitaminas.

**MMM para cultivo bacterias aeróbicas (medio BSR)** - Para preparar 250 ml de medio para los microorganismos aeróbicos oxidadoras del Azufre, se pesa la cantidad necesaria para tener una concentración final de 20 Mm de tiosulfato, y la cantidad de carbonato para tener una concentración final de 0.5 g/L. Estos son agregados al 250 ml de MMM (previamente esterilizada 3 veces, cada 24 h., por 2h en autoclave), y se esterilizó nuevamente. Una vez que ya estaba frio, se le agregó 0.1 ml de metales traza y vitaminas en la misma cantidad.

**Muestreo e Inoculación** – Muestras superficiales de un tapete microbiano (observado en el Spa “Los Azufres”, Michoacán) fueron colectadas con auxilio de espátula metálica estéril, y almacenadas directamente en frasco de vidrio, también estéril. Se mantuvo las condiciones de esterilidad con auxilio de un mechero. Para mantener las condiciones de anaerobiosis, se lleno el frasco con agua del sitio, y se tapo con tapones de butil. Se colocaron las muestras en una hielera y se la transportó al Laboratorio. En laboratorio, se utilizó 1 ml de la suspensión de esa muestra como inóculo para 5 ml de medio de cultivo específico para el aislamiento de las bacterias anaeróbicas sulfato reductoras o 5 mL de medio para el cultivo de las bacterias litotróficas aerobias del ciclo del azufre, describas arriba. Se dejó incubar a temperatura ambiente hasta observación de precipitado negro, o de turbidez (aproximadamente 1 mes). De esa muestra se realizo un primero repique, es decir, se tomo 1 mL de ese como pre in'oculo para 9 mL de medio recion hecho, y se dejo incubaba por mas un mes, o hasta la observación de crecimiento microbiano (de precipitado negro, o de turbidez). Se tomo una alícuota para observación al microscopio óptico (con 1000x de aumento), y se inició el aislamiento por medio de Roll-Tube y agar-semisólido, para las bacterias anaeróbicas, o dilución seriada para el aislamiento de los microorganismos aeróbicos.

**Aislamiento por Agar semi-sólido** – Se pesó 3 g de agar bacteriano, se lavó (con agua destilada), y se aforó en 100 ml con agua destilada. De estos, se tomo una alícuota 7 ml para frascos de penicilina (de 25 mL), los cuales se taparon con tampones de butil, se sellaron, y se esterilizaron en autoclave. Una vez que salieron del autoclave e, aun calientes, se desgasificarón agregando N<sub>2</sub>. Se le adicionó 10 ml de medio de cultivo BSR y 1 ml del pre-inóculo. Al siguiente frasco, se le puso 10 ml del medio BSR y 1 ml del frasco anterior, de modo a obtener diluciones seriadas.

**Aislamiento por Roll Tube** - Para esta técnica también se usaron frascos de penicilina de 20 ml en los cuales se les agrego 0.2 g de agar bacteriológico (pre-lavado) y 5 ml de medio de cultivo BSR; Se esterilizó, se desgasificó con N<sub>2</sub> y se inocularon con diferentes volumen del inóculo (500 µL, 300 µL, 200 µL, 100 µL, y 50 µL). Después de la adición del inóculo, se rollaron los frascos en baño de hielo/agua hasta su solidificación.

Los frascos de ambas técnicas de pusieron a incubar en frasco herméticamente cerrados y en

temperatura ambiente. Al se observar microcolonias aisladas (puntitos negros) se pasó a medio BSR liquido y se dejo a crecer por 20 días, se precipitaron las células (5 min. a 8000 rpm) y se realizó la PCR directa sin extracción de DNA con los oligonucleidos 8F y 907R para la amplificación del gene ARNr 16S.



Figura 1 - A la izquierda sistema de distribución de los gases, a la derecha, frascos de roll tube

**Aislamiento en medio liquido** - Para esta técnica se utilizaron 150 tubos de ensaye para cada muestra a los cuales se les agrego 900µl de medio para microorganismos aeróbicos litotrófico. Estos tubos se enumeraron del -1 al -50 (en triplicado). Al primer tubo se le agrego 100 µl de la muestra del segundo enriquecimiento, en condiciones de esterilidad a un tubo de ensaye con 900 µL del medio oligotrófico, y se agitó para homogenizar la muestra. De esa dilución se tomó 100 µL para vaciarlo a otro tubo de ensaye con 900 µL del medio litotrófico. Se repitió el proceso hasta la dilución de -50. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 30 días o hasta la observación de tubidad.

**Extracción del DNA** – El precipitado de células se extrajo el DNA genómico por medio de técnica tradicional de Tsay y Griffit, adaptado por Brito et al, 2010. Esta se basa en tres etapas, la primera consiste en un tratamiento enzimático y químico con 4 µL de lisozima, 4 µL proteinasaK y 4 µL de acromopeptidasa, y 20 µL SDS 10%. Después de se incuban (en baño maría por 10 min. a una temperatura de 37 °C) y por 10 m. a 60 °C, se realizó la eliminación de la fracción proteica (con fenol, cloroformo y alcohol isoamilico). Por fin se precipitó el DNA con acetato de sodio 3M y etanol 75%.

**Amplificación del gene DNAr 16S** – Se probó amplificar el fragmento gene DNAr 16S realizando un PCR directo a partir de la colonia, utilizando los oligonucleidos universales 8F y el 926R. Las condiciones reaccionales fueron: 30.25 µL de H<sub>2</sub>O DNasa free; 5 µL de buffer taq. 10X; 5 µL dNTP (0.2mM); 2.5 µL del oligonucleido 8F (10 µM) y 2.5 µL del oligonucleido 926F (10 µM), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> y 0.25 µL de Taq polimerasa (Fermentas®). Ese mismo se probó este protocolo con 0.5 µL del DNA extraído. En todas las PCR se adiciónó una muestra positiva (DNA de *E.coli*) y una muestra negativa (0.5 µL de agua en lugar de ADN). Las condiciones de la PCR consistieron de un calentamiento inicial a 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de amplificación, que consistió de un calentamiento inicial (a 94°C por 30s.) para la desnaturalización del DNA, después se alinearon los oligonucleótidos (52°C por 30 s) y por fin, la elongación del fragmento (72°C por 60 s). Al final de los 35 ciclos, se aplicó un calentamiento adicional a 72°C por 10 min. Para comprobar que funcionó la PCR se realizó una electroforesis.

**Electroforesis** – Se pesó 0.5 g de agarosa y se diluyó en 50 ml con TAE 1X, y se colocó en 30 s o en microonda (o hasta que se diluyera completamente). Una vez bajando la temperatura se agregó 5 µL de Bromuro de Etidio (el marcador fluorescente en luz UV), y se preparo el molde. En cada pozo se agregó 1 µL de tapón de carga y 5 µL de la muestra (de DNA o del producto de

PCR); en un de los pocos se puso 1  $\mu\text{L}$  de marcador de tamaño. Se sometió a un corriente de 80Volts por 30 m., y se observó en al transluminador con luz UV.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El aislamiento de los microorganismos anaeróbicos con la técnica de Roll tube se mostro exitosa ya que se pudo observar formación de precipitado negro (Figura 2), que es indicativo de la reducción del  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  sugiriendo el crecimiento de BRS. La observación de algunas de esas colonias por microscopia óptica se verificó que tenían morfologías celulares que variaban de bacilos a coco-bacilos.

### Figura 2 – Muestras del Roll-Tube y Agar semisólido para su aislamiento.

Se suspendió estas colonias en medio liquido y se incubó por 15 dias para la obtención de un precipitado de células (centrifugación a 10000rpm a 15 min.). El precipitado de las células de esos cultivos fueron despreciables, por lo que se adicionó 5 ml de medio recién hecho para estimular el crecimiento, y de esa forma obtener mas precipitado celular. Así mismo, se realizó la PCR de esas muestras, y no se obtuvo amplificación. Es importante enfatizar que en todas las reacciones de PCR se adicionó una muestra positiva (DNA de *E.coli*) y una muestra negativa, a partir de las cuales se conformaba que la reacción de PCR ocurriera bajo las condiciones utilizadas, y que no había contaminación de los reactivos.

Respecto al aislamiento de los microorganismos litotróficos aeróbicos, inicialmente íbamos hacer el aislamiento en medio solido (placas de petri con agar bacteriano, hasta 30%), pero, desafortunadamente el medio so solidificava. Por eso se resolvió intentar el aislamiento por dilución seriada, hasta extinción completa. Adicionalmente también se irá probar la técnica con diluciones en microplaca (100  $\mu\text{L}$  de inculo para 900 $\mu\text{L}$  de medio de cultivo).

## CONCLUSIONES

Se logro condiciones de cultivos propicias al desarrollo de BSR, tal como, condiciones de anaerobiosis restrictas (confirmada por la ausencia decoloración roseo del medio) y de los precipitados negros, típicos del Fe reducido, además del olor típico de  $\text{H}_2\text{S}$  en el medio producto de la reducción del sulfato (NOX del S +6) en sulfuro (NOX -2). Además, también obtuvimos éxito en la técnica de cultivo de Roll tube. Sin embargo no se logró amplificar el gene DNAr 16 S, probablemente por falta de tiempo para que las bacterias pudieran se desarrollar en los cultivos líquidos. A la continuación, para finalizar ese trabajo, se extraerá el ADN de los aislados y se hará un estudio filogenético de los mismos.

Respecto los microorganismos litotróficos se continuaran las pruebas de aislamiento por dilución seriadas (tanto en volúmenes mayores como en microcultivos), para posteriormente realizar la obtención del ADN y estudio filogeneticos de estos microorganismos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elcia Margareth Souza Brito, por la Universidad de Guanajuato por la beca de verano de investigación 2013.

## REFERENCIAS

- [1] Facultad de Agroindustrias de la Univ. Nacional del Nordeste.  
<http://fai.unne.edu.ar/biologia/biodiversidad/biodiversidad.htm> (consultado al dia 23 de julio del 2013)
- [2] Society for anaerobic microbiology (SAM). The University of Sheffield, UK.
- [3] Cappuccino G. James, Sherman Natalie, Microbiology A Laboratory, Edición Benjamín/ Cummings, New York, quinta edición.
- [4] <http://www.elementos.buap.mx/num23/pdf/16.pdf> (consultado al dia 23 de julio del 2013)