

7. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAÉROBICAS DE FUMAROLAS DEL VOLCÁN PARICUTÍN

Romero Nuñez, Victor-Manuel¹; Souza-Brito, Elcia-Margareth²; Caretta, César-Augusto³

¹Dpto. de Biología, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

²Dpto. de Ing. Ambiental, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

³Dpto. de Astronomía, Universidad de Guanajuato, México.

e-mail: ¹argentum_5s1@hotmail.com, ²emsbrito@gmail.com

ABSTRACT

In this paper a phylogenetic study of bacterial populations that develop within the Paricutin volcano fumaroles was performed. Using the technique of T-RFLP profile was visualized the main bacterial populations of this site. Also we did a phylogenetic study based of the similarity of 16S rDNA gene. The population study revealed variation in the diversity and the relative size of the populations of the Paricutin volcano system. Four anaerobic bacterial strains were obtained belong to the classes Bacilli and Clostridium. According to the literature, 2 of these strains (sulfate reducing bacteria) could have potential biotechnological application in the treatment of wastewater.

Keywords: *Bioprospection, sulphate-reducing bacterial (SRB), biomat, T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism).*

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio filogenético de las poblaciones bacterianas que se desarrollan dentro de las fumarolas del volcán Paricutín. Utilizando la técnica del T-RFLP se visualizaron los perfiles poblacionales del sitio. Para el estudio filogenético se utilizó la secuenciación del fragmento del gen ADNr 16S. El estudio poblacional reveló variación en cuanto a la diversidad y el tamaño relativo de las poblaciones del sistema del volcán Paricutín. Se lograron aislar 4 cepas bacterianas anaeróbicas, pertenecientes a las clases Clostridium y Bacilli. De acuerdo a la literatura, 2 de estas cepas (bacterias sulfato reductoras) podrían tener una potencial aplicación biotecnológica para el tratamiento de agua residual.

Palabras clave: *Bioprospección, bacterias sulfato-reductoras (BSR), biomat, T-RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción-Terminales)*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias y arqueas pueden habitar virtualmente cualquier superficie de la Tierra, incluyendo aquellas áreas en donde el entorno es extremadamente hostil [1]. La habilidad de persistir en toda

la biosfera se debe, en parte a su inigualable versatilidad metabólica y plasticidad fenotípica. Un elemento clave de esa adaptabilidad en la habilidad de posicionarse en un nicho en donde puedan propagarse [2].

Los ambientes resultantes de la activi-

dad volcánica son diversos, desde flujos termales ácidos hasta hábitats basálticos profundos en el océano. Estos ambientes volcánicos se encuentran ampliamente distribuidos sobre la Tierra y son de importancia geomicrobiológica para entender la diversidad y características de la vida microbiana que albergan. Éstos pueden ser utilizados como modelos para comprender más acerca de los patrones generales en la diversidad y distribución de los procariotas en el tiempo [3].

El volcán Parícutín se encuentra ubicado en el Campo Volcánico de Michoacán-Guanajuato (CVMG) y sobre la Franja Volcánica Trans-Mexicana (FVTM). El vulcanismo de la FVTM está relacionado con la subducción de las placas de Cocos y Rivera debajo de la fosa Mesoamericana en México [4]. El volcán apareció por primera vez el 20 de febrero de 1943 cerca del pueblo de San Juan Parangaricutiro, en el estado de Michoacán. La actividad volcánica se extendió de 1943 a 1952. El campo de lava se desarrolló en términos de 23 episodios eruptivos, con una duración de varios meses. La actividad fumarólica ha continuado hasta la actualidad [5].

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son microorganismos anaeróbicos que se extienden en ambientes anóxicos, donde utilizan el sulfato como aceptor final de electrones para la degradación de compuestos orgánicos, resultando en la producción de sulfuro y tienen una participación importante en los ciclos del azufre y del carbono [6]. Estas poblaciones bacterianas se han detectado sobre sedimento marino, ventanas hidrotermales, filtraciones de hidrocarburos, en volcanes de lodo y tapetes microbianos presentes en ambientes hipersalinos [6]. Una apli-

cación biotecnológica de las poblaciones de BSR consiste en la remoción de compuestos de azufre de las aguas y gases residuales o la precipitación de metales pesados en diferentes sistemas de biorreactores [6].

Con base en lo anterior, se realizó un estudio filogenético de bacterias anaeróbicas de las fumarolas del volcán Parícutín.

METODOLOGÍA

Muestreo

La bisprospección se realizó sobre el sistema del volcán Parícutín (19°29'35"N 102°15'04"O) situado en el estado de Michoacán, México. Específicamente se seleccionaron 2 fumarolas del volcán Parícutín (*Tex*: tapete externo; *Tin*: tapete interno) y 2 fumarolas de su satélite Sapichu (*SI*: sapichu uno; *SII*: sapichu dos). El material biológico obtenido consistió en tapete microbiano que se desarrollaba al interior de las paredes de la fumarola. La extracción se realizó utilizando cucharas de metal estériles, raspando la superficie de la roca. Su almacenamiento y pre cultivo se realizó en viales de vidrio estériles (~30 mL, sellados con tapones de Butil) utilizando medio de cultivo específico para BSR. Se desplazó el O₂ de los sistemas y se mantuvo una condición anaeróbica inyectando gas N₂.

Extracción de ADN total y análisis poblacional por T-RFLP

Parte del tapete microbiano colectado se utilizó para realizar la extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial MoBio Power Soil[®] y siguiendo el protocolo que describe el fabricante. El mate-

rial genético obtenido se utilizó para realizar el estudio de poblaciones mediante la técnica del T-RFLP [7, 8]. Para esta técnica se utilizaron los oligonucleótidos 8F y 1489R y las enzimas de restricción *AluI* y *HinfI*. Los datos obtenidos fueron tratados según las metodologías descritas en Caretta y Brito (2011)[9].

Cultivo y aislamiento de microorganismo anaeróbicos

Los medios de cultivo seleccionados para el crecimiento de microorganismos anaeróbicos fueron: medio Remy [10] y el medio Fude [11]. La técnica del *Roll Tube*, descrita por Hungate (1969) [12], fue empleada para el aislamiento de microorganismos anaeróbicos. La condición anaeróbica dentro de los sistemas y medios de cultivo se mantuvo con la inyección de gas N₂ semanalmente.

Extracción de ADN y amplificación del gen ADNr 16S

A partir de los cultivos puros (microorganismos aislados) se realizó la ex-

tracción de ADN utilizando la técnica *La Porta CTAB* [13]. A partir del material genético obtenido se realizó la amplificación del fragmento del gen ADNr 16S utilizando los oligonucleótidos 8F, 536F y 1513R. Los amplicones obtenidos fueron enviados a la unidad de secuenciación del LANGEBIO, CINVESTAV Irapuato. Las secuencias obtenidas fueron editadas y analizadas mediante los programas Bioedit (v. 7.2.5) y MAFFT (en: <http://goo.gl/Egf7aY>).

Análisis filogenético

Las secuencias consenso obtenidas fueron sometidas a un BLAST utilizando el portal en línea del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilizando cepas de referencia (cepas con mayor similitud a los aislados) se realizó la construcción del árbol filogenético a través del programa Mega 6 [14] y utilizando los modelos evolutivos de Jukes-Cantor (1969)[15] y Kimura-Ney 2 parámetros (2008)[8].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 7.1: **Colecta de tapete microbiano sobre las fumarolas del volcán Parícutín.** Las características del tapete microbiano variaban de acuerdo a la profundidad de la fumarola. Las capas externas eran delgadas y sus coloraciones claras (verdes, amarillas y blancas). En las capas internas el grosor del tapete era mayor y sus coloraciones oscuras (café, rojas y negras).

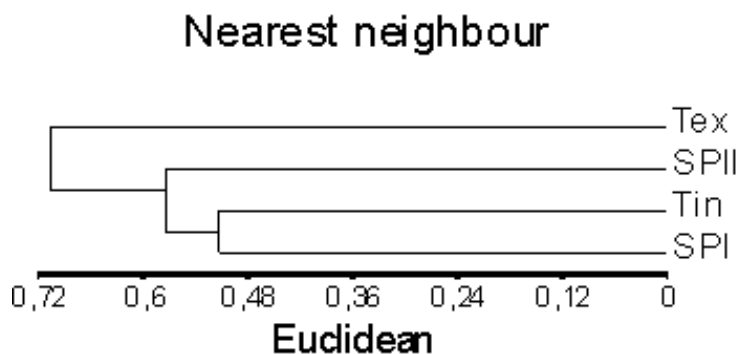


Figura 7.2: **Análisis clúster del T-RFLP.** De acuerdo con el T-RFLP, el tamaño de las poblaciones de los sistemas SI y SII es relativamente pequeño, sin embargo presentan mayor diversidad. Por el contrario, el tamaño de las poblaciones de los sistemas Tin y Tex es relativamente grande, sin embargo su diversidad es menor. De acuerdo al análisis clúster, los 4 sistemas presentan diferencias significativas. Los sistemas Tin y SPl presentan poblaciones similares, mientras que las poblaciones del Tex presentan la mayor diferencia con los demás sistemas.

Tabla 7.1: Caracterización biológica y molecular de las cepas aisladas.

Cepa*	SA ^(a)	MC ^(b)	M Cel ^(c)	TG ^(d)	ER ^(e)	SR ^(f)	Identificación Molecular	
							Sim.	Cepa Ref.
VPTFN01	Par.	MF	Bacilo	+	ES	NP	97%	<i>Clostridium swelfunanium</i>
VPTFN02	Par.	MF	Bacilo	+	ES	NP	94%	<i>Clostridium jejuense</i>
VPTFN03	Par.	MF	Bacilo	Variable	ENS	+	99%	<i>Dsulfotomaculum guttoideum</i>
VPTFN04	Par.	MF	Bacilo	-	ES	+	99%	<i>Paenibacillus azoredunces</i>

* Código de laboratorio. VP: volcán Paricutín; T: tapete microbiano; F: medio Fude; N: nitrógeno.

^a Sitio de aislamiento; Par. = Paricutín.

^b Medio de cultivo; MF= Medio Fude.

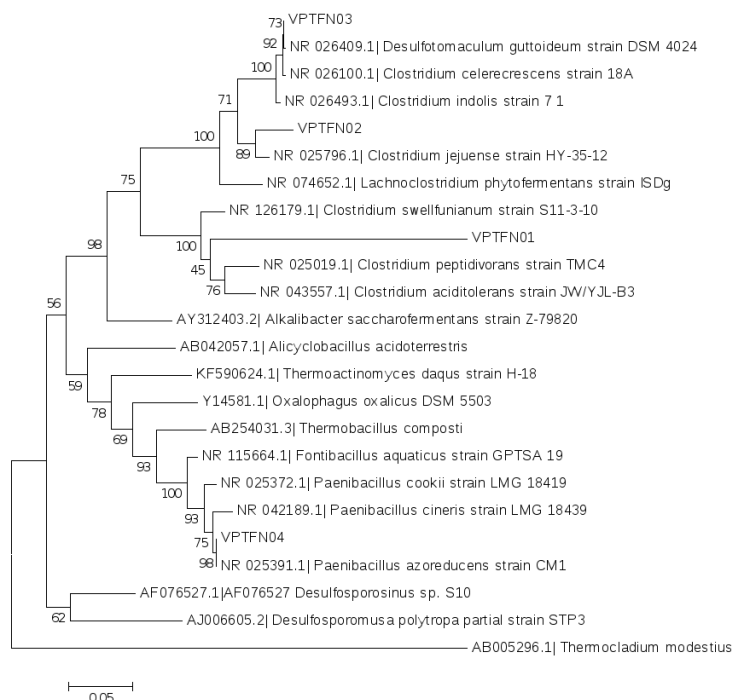
^c Morfología celular.

^d Tinción de Gram; (+) Gram positivo; (-) Gram negativo.

^e Estructura de resistencia; ES= Espora; ENS=Endospora.

^f Presencia de sulfato reducción; NP= no presenta; (+) Presenta.

Figura 7.3: Análisis filogenético. árbol filogenético de las cepas bacterianas aisladas. El árbol se construyó con el programa MEGA 6 comparando las secuencias del gen ADN_r 16S de las cepas aisladas con las depositadas en el banco de datos en línea del NCBI. Después del alineamiento, las secuencias fueron editadas y se utilizaron 1,400 pb con el método de parsimonia y máxima verosimilitud (Bootstrap de 1000 veces) y el modelo de Kimura 2 parámetros (2008).



CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de 4 cepas anaeróbicas del sistema del volcán Parícutín, las cuales se agruparon dentro del filo Firmicutes. Tres de ellas (VPTFN01, VPTFN02 y VPTFN03) se agruparon dentro de la clase Clostridia, mientras que la cepa VPTFN04 se agrupó dentro de la clase *Bacilli*. Se pretende continuar con estudios moleculares, metabólicos y bioquímicos que permitan identificar las cepas que presentaron similitud baja con las cepas de referencia. Así mismo se plantearan nuevos experimentos que permitan detectar los genes *dsrAB* en las cepas que presentaron sulfato-reducción para plantear una posible aplicación biotecnológica en el tratamiento de aguas residuales con presencia de metales pesados.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato. A la Universidad de Pau Et Des Pays de L'adour, Francia.

REFERENCIAS

- [1] Barton, L. L. (2005). Physiological basis for growth in extreme environments. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes, 348-393.
- [2] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Brock, T. D. (2004). Biología de los microorganismos. Pearson Education/Prentice Hall.
- [3] Herrera, A., & Cockell, C. S. (2007). Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. Journal of Microbiological Methods, 70(1), 1-12.
- [4] Erlund, E. J., Cashman, K. V., Wallace, P. J., Pioli, L., Rosi, M., Johnson, E., & Granados, H. D. (2010). Compositional

- evolution of magma from Parcutin Volcano, Mexico: the tephra record. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 197(1), 167-187.
- [5] Urrutia-Fucugauchi, J., Alva-Valdivia, L. M., Goguitchaichvili, A., Rivas, M. L., & Morales, J. (2004). Palaeomagnetic, rock-magnetic and microscopy studies of historic lava flows from the Paricutin volcano, Mexico: implications for the deflection of paleomagnetic directions. *Geophysical Journal International*, 156(3), 431-442.
- [6] Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441-454.
- [7] Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4516-4522.
- [8] Osborn, A. M., Moore, E. R., & Timmis, K. N. (2000). An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), 39-50.
- [9] C. A. Caretta and E. M. S. Brito. In Sili-co restriction for identifying microbial communities in T-RFLP fingerprints. *Journal of Computational Interdisciplinary Sciences*, 2(2):123129, 2011.
- [10] Brito, E. M., Pin-Castillo, H. A., Guyoneaud, R., Caretta, C. A., Gutierrez-Corona, J. F., Duran, R., ... & Goi-Urriza, M. (2013). Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 369-378.
- [11] Fude, L., Harris, B., Urrutia, M. M., & Beveridge, T. J. (1994). Reduction of Cr (VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1525-1531. 11
- [12] Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*, 3B, 117-132.
- [13] CORTSPALOMEC, A. C., Mccauley, R. A., & Oyama, K. (2008). Isolation, characterization and crossamplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Molecular ecology resources*, 8(1), 135-138.
- [14] Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*, 9(4), 299-306.
- [15] Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3, 21-132.
- [16] Souza et al., (2015). Sulfate reduction in a hydrogen fed bioreactor operated at haloalkaline conditions. *Water Research* 68, 67-76.



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato
División de Ingenierías



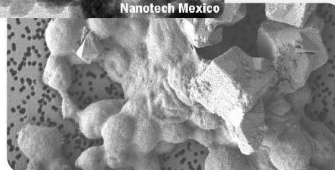
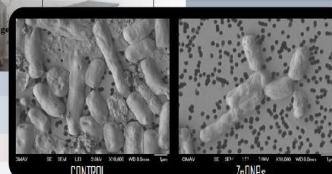
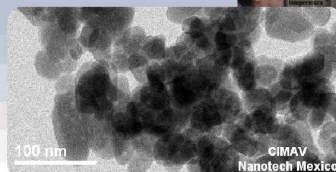
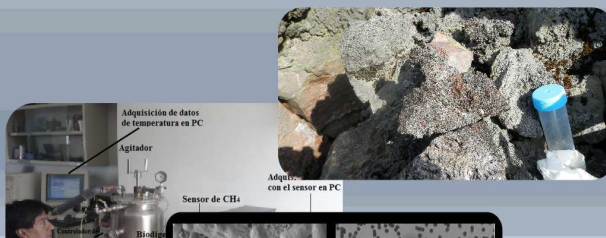
3er. Simposio Internacional de Tecnología y Biotecnología aplicada a la resolución de problemas ambientales

31 de Agosto a 2 de Septiembre de 2015

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 Aerobias y Anarobias
- Energía
- Bioprocesos
- Biorremediación
- Biotecnología
- Nanotecnología
- Tratamiento de Agua



Organización:



Cuerpo Académico de
Bioingeniería, Biotecnología y
Gestión Ambiental

Departamento de Ingeniería Civil
División de Ingenierías
Campus Guanajuato

www.ugto.mx

<http://www.di.ugto.mx/SIBA>



“TECNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS AMBIENTALES”

ISBN: 978-607-441-446-2



D.R. © 2016 Universidad de Guanajuato

Memorias del Tercer Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental,
organizado por el “Grupo de investigación de Bioingeniería, Biotecnología y
Gestión Ambiental”

Guanajuato, Guanajuato. México
31 de Agosto a 2 de Septiembre de 2015

**“TECNOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA
RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS AMBIENTALES”**

Primera edición 2016

D.R. © 2016 Universidad de Guanajuato
Lascuráin de Retana 5, Zona Centro.
Guanajuato, Gto. CP. 3600

Edición: Grupo de Investigación “Bioingeniería, Biotecnología y Gestión Ambiental”
Julio César Valerdi Negreros
Arodi Bernal Martínez
Gemma Cervantes
Germán Cuevas Rodríguez
Sergio Antonio Silva Muñoz
Elcia Margareth Souza Brito

ISBN: 978-607-441-446-2

Índice

- 1** | CAPÍTULO 1
PREFACIO
- 3** | CAPÍTULO 2
LA BIOINFORMÁTICA Y SUS APLICACIONES EN LA ECOLOGÍA MICROBIANA
Bertin, P.
- 9** | CAPÍTULO 3
EFFECT OF CuONPs OVER BACTERIAL COMMUNITIES OF AGRICULTURAL SOIL
Concha-Guerrero, Sandra-I.; Souza-Brito, Elcia-Margareth; Gassie, C.; Bertin, P.; Caretta, César-A.; Durán, Robert; Orrantia-Borunda, Erasmo
- 19** | CAPÍTULO 4
MODELAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIODIGESTOR ANAEROBIO PARA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE RESIDUOS DE CABRA Y DE CONEJO
M.-García, Martín-T.; G.-García, Jessica-J.; M.-Ramírez, Jose-L.
- 27** | CAPÍTULO 5
DEGRADACIÓN DE LIGNINA MEDIANTE EL PROCESO FENTON
Olivo-Toledo, Jenifer; Martínez-Herrera, Gabriel
- 33** | CAPÍTULO 6
PHYSIOLOGIC CHARACTERIZATION OF ANAEROBIC STRAINS ISOLATED FROM EXTREME SITES
Pérez-Bernal, María-Fernanda; Souza-Brito, Elcia-Margareth; Cuevas-Rodríguez, Germán; Hirschler-Réa, Agnès; Guyoneaud, Rémy
- 41** | CAPÍTULO 7
AISLMIENTO DE BACTERIAS ANAÉROBICAS DE FUMAROLAS DEL VOLCÁN PARICUTÍN
Romero Nuñez, Victor-Manuel; Souza-Brito, Elcia-Margareth; Caretta, César-Augusto

- 47** | CAPÍTULO 8
ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS AISLADAS DEL LAGO-CRÁTER
"RINCÓN DE PARANGUEO"
Rivera-Martínez, Laura-Guadalupe; Bertin, Pierre; Caretta, César-Augusto;
Guyoneaud, Rémy; Goni, Marisol; Malm, Olaf; Valerdi-Negreros, Julio-
César; Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 55** | CAPÍTULO 9
ESTUDIO DE BACTERIAS MAGNETOTÁCTICAS EN LAGOS-CRÁTER:
CÍNTORA Y LA JOYA
Zatarain-P., Eva-Cecilia; Pérez-Vázquez, Miriam-Evelia; Valerdi-Negreros,
Julio-César; Brito-S., Elcia-Margareth
- 63** | CAPÍTULO 10
STUDY OF MAGNETOTACTIC BACTERIA IN ALKALINE ENVIRO-
MENTS OF VOLCANIC CRATER LAKES FROM *LAS SIETE LUMI-
NARIAS*
Pérez-Vázquez, Miriam-Evelia; Zatarain-P., Eva-Cecilia; Valerdi-Negreros,
Julio-César; Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 69** | CAPÍTULO 11
TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC EN AISLA-
DOS DE SUELOS AGRÍCOLAS
Rico-Herrera, Mauricio-I.; Concha-Guerrero, Sandra-I.; Orrantia, E.; Luna-
Velazco, Antonia; Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 77** | CAPÍTULO 12
TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC (ZnO)
EN LEVADURAS PRESENTES EN UNA PLANTA DE TRATAMIENTO
DE AGUAS RESIDUALES
González-Paniagua, Yutzil; Cervantes-Avilés, Pabel-A.; Concha-Guerrero,
Sandra-I.; Luna-Velazco, Antonia, Souza-Brito, Elcia-Margareth
- 87** | CAPÍTULO 13
CONCRETO HIDRÁULICO CON PET DE BOTELLAS
Chávez-Valencia, L.-E.; Ruiz-Jaime, C.-L.; Sánchez-Cadena, L.-E.

- 91** | CAPÍTULO 14
PAPERCRATE
Chávez-Valencia, L.-E.; Saucedo-Estrada, C.-A.; Mendoza-Puga, L.-E.
- 95** | CAPÍTULO 15
MICROORGANISMOS NATIVOS EN UN PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN
PARA RECUPERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE RELAVES MINEROS
CON ALTO CONTENIDO DE MANGANESO
Huerta-Rosas, Brenda; Cano-Rodríguez, I.; Gamiño-Arroyo, Z.; Gómez-
Castro, F.-I.; Carrillo-Pedroza, F.-R.; Romo-Rodríguez, P.; Gutiérrez-
Corona, F.; Santiago-Sernas, P.-I.
- 103** | CAPÍTULO 16
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SECRETABLE
GOX ENZYME FROM Ed8 STRAIN OF *A. TUBINGENSIS*
Flores-Amaro, Oscar-Abraham; Romo-Rodríguez, Pamela; Corrales-
Escobosa, Alma-Rosa; Wrobel, Kazimierz; Wrobe, Katarzyna; Villagómez-
Castro, Julio-Cesar; Gutiérrez-Corona, Félix