



## BIOPROSPECCION DE BACTERIAS EXTREMOFILAS

Gómez Marmolejo Jéssica Jazmín, Souza Brito Elcia Margareth

<sup>1</sup> División de Ingenierías, laflais\_jazmin@hotmail.com, <sup>2</sup> División de Ingenierías, emsbrito@gmail.com

### RESUMEN

En ese trabajo se realizó la bioprospección de bacterias extremófilas de un sitio geotérmico, Los Azufres ubicado en Michoacán. Los microorganismos prospectados fueron bacterias sulfato reductoras (BSR), acidófilas y anaeróbicas, por medio de las técnicas de Roll Tube y del agar-semi sólido. 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 liquido 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 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 sobretodo para los anaeróbicos restrictos.

El método del Roll-Tube es una técnica popularizada por el Virginia Polytechnic Institute (VIP), el cual consiste en preparar un tubo con una delgada tapa de agar rodeado por una atmosfera 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 desarrollaran 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 liquido-anaeróbico

Otra técnica también utilizada en la bioprospección de los microorganismos anaeróbicos es una siembra en agar semi-sólido (reducido y anaeróbico), y también mantenido en atmosfera 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). La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en los años 80's, y consiste de obtener miles de replicas de un determinado gene, simulado *in vitro* la transcripción del DNA [4].

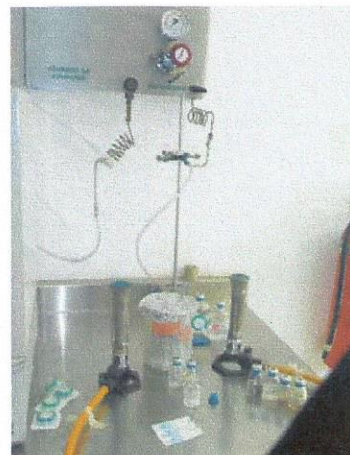
El objetivo de este trabajo fue aplicar técnicas tradicionales de cultivo, el Roll-tube, para aislar microorganismos anaeróbicos (procariontas sulfato reductores) de un sitio extremo en México. Se utilizó en ese trabajo muestras colectadas del sitio extremo, el SPA Los Azufres, ubicado en el sitio geotérmico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

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Medio de Cultivo** - Para preparar 100 ml de medio BSR se necesito 0.05 ml de glicerol, lactato, piruvato, acetato y levadura en la misma cantidad, 1 gota 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  $Fe_2SO_4$ , dithionite, 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. Una vez que llegamos al Laboratorio, se utilizó 1 ml de la suspensión de esa muestra como inóculo para 5 ml de medio de cultivo específico para las BSR, el cual fue preparado con anticipación. Se dejó incubar a temperatura ambiente hasta observación de precipitado negro. Se observó al microscopio óptico (1000x de aumento) una pequeña alícuota y se notó que había crecimiento microbiano, se inició el aislamiento por medio de Roll-Tube y agar-semisólido.

**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 esto se 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  $N_2$ . Se le adicionó 10 ml de medio de cultivo BSR y 1 ml de la muestra. 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 y 5 ml de medio de cultivo BSR; Se esterilizo, se desgasificó con  $N_2$  y se inocularon con diferentes volumen del inóculo (500  $\mu$ L, 300  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, y 50  $\mu$ L). 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 líquido y se dejó a crecer. Una vez que creció, se precipitaron las células durante 5 min. a 8000 rpm, y se realizó una PCR directa sin extracción de DNA, y la otra con extracción de DNA de estos precipitados.

**Extracción del DNA** – El precipitado de células se extrajo el DNA genómico por medio de técnica tradicional la cual consistió inicialmente en un tratamiento enzimático y químico (tabla 1). En ese, después de la adición de TGE, de la Lisoenzima y de la achromopeptidasa, se incubó en baño maría por 10 min. a una temperatura de 37 °C; después de agregar la Proteínasa K y la SDS, se incubó durante 30 m. a 37°C, y después por 10 m. a 60 °C. A seguir se eliminó la fracción proteica con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico: primero se agregó fenol:cloroformo en proporciones de 96:4 (500 µL para cada tubo), después de centrifugación (8 min. a 8000 rpm), el sobrenadante se lavó con 500 µL con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (48:48:4) y, el sobrenadante se lavó con 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (96:4). Por fin se precipitó el DNA con acetato de sodio 3M y etanol 75%.

Tabla 1 – Extracción de DNA, etapa de lisis celular (modificado de Tsay y Grift, 1993 por Brito 2004.)

Sustancias	Cantidad
TGE (Tris 25 mM, glucosa 50 mM, y EDTA 10 mM).	400 µL
Lisoenzima (100 mg/ml).	4 µL
Acromopeptidasa (solo gram +)	4 µL
Proteinasa K	4 µL
SDS 10 %	20 µL

**Amplificación del gene DNAr 16S** – Debido el tiempo muy corto, para lograr crecimiento bacteriano suficiente para la extracción del DNA, se probó amplificar el gene DNAr 16S realizando un PCR directo de la colonia. Las condiciones reaccionales de esa PCR están listadas en la tabla 2. También se probó este protocolo con 0.5 µL del DNA extraído,

Tabla 2 – Condiciones reaccionales para la PCR directa de la colonia

Sustancia	Cantidad
10 X buffer taq.	5 µL
dNTP (0.2mM)	5 µL
Primer 8F	2.5 µL
Primer 926 R	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	4 µL
Taq polimerasa	0.25 µL
H <sub>2</sub> O	30.25 µL

En todas las reacciones de PCR se adicionó una muestra positiva (DNA de *E.coli*) y una muestra negativa (0.5 µL de agua en lugar de ADN). Después de un calentamiento inicial (a 94°C por 5 min. cuando era el DNA o 15 min. si se trataba de la colonia), se realizó la amplificación del seguimiento deseado aplicando tres ciclos de calentamiento: una para la desnaturalización del DNA (a 94°C por 30s.), otra de alineación de los oligonucleótidos (52°C por 30 s) y una de elongación del fragmento (72°C por 60 s), el cual se repitió por 35 veces. Por fin se produzco una cola calentando a 72°C por 50min. El programa utilizado fue el 8F926. Para comprobar que funcionó la PCR se realizó una electroforesis.

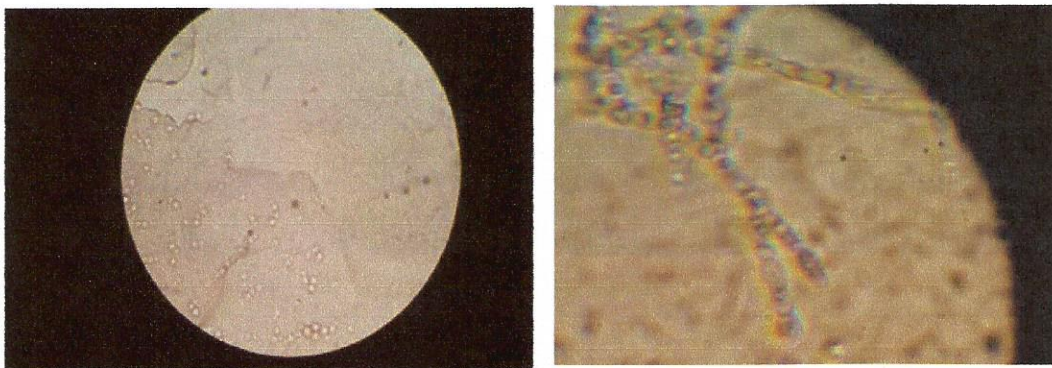
**Electroforesis** – Se pesó 0.5 g de agarosa y se diluyó en 50 ml con TAE 1X, y se colocó en 30 s o en microonda (o hasta que se diluyera completamente). Una vez bajando la temperatura se agregó 5 µL de Bromuro de Etidio el marcador fluorescente en luz UV, y se preparo el molde. En cada pozo se agrego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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras se observó formación de precipitado negro (Figura), que es indicativo de la reducción del  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  sugiriendo el crecimiento de BRS. Similarmente, se observó crecimiento de varias colonias negras por Roll tube (figura). Estos cultivos se observó el crecimiento de cocos-bacilos y bacilos (por microscopía óptica, figura 1)



**Figura 1 – Observación microscópicas de los cultivos líquidos (muestras antes de aplicar Roll-Tube y Agar semisólido para su aislamiento). Se observa el crecimiento de cocos-bacilos y bacilos**

Con la finalidad de llevar a cabo todas las propuestas del verano, se procesó el análisis de 19 cultivos de BSR los cuales fueron obtenidos previamente a partir de colonias crecidas en Roll tube (obtenidos del mismo sitio, y por la misma técnica). 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 como se puede apreciar en la Figura 2 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 confirmaba que la reacción de PCR ocurriera bajo las condiciones utilizadas, y que no había contaminación de los reactivos.

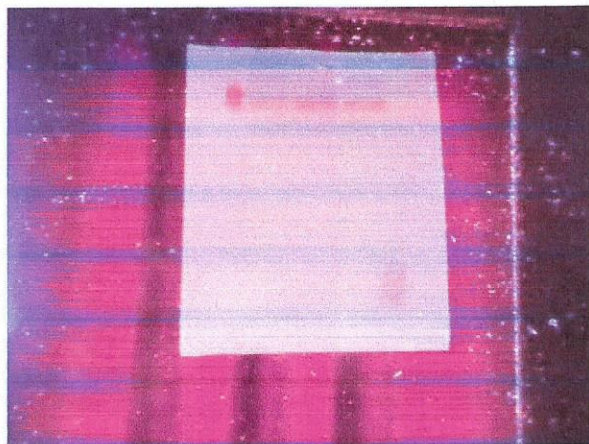


Figura 2 – Ejemplo de electroforesis de una PCR. Se puede observar que no se amplificó el gene DNAr 16S

#### 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 H<sub>2</sub>S en el medio producto de la reducción del sulfato (NOX del S +6) en sulfuro (NOX -2).

La técnica de cultivo de Roll tuvo se aplica para aislar microorganismos anaerobios sulfato reductores. Sin embargo no se logró amplificar el gene DNAr 16, probablemente por falta de tiempo para que las bacterias pudieran se desarrollar en los cultivos líquidos.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elcia Margareth Souza Brito por todo el apoyo así como en la facilitación del material empleado en el Laboratorio de Ingenierías, y a Universidad de Guanajuato por la beca y por permitirme laborar dentro de las instalaciones escolares.

#### REFERENCIAS

- [1] Facultad de Agroindustrias de la Univ. Nacional del Nordeste.  
<http://fai.unne.edu.ar/biologia/biodiversidad/biodiversidad.htm> (consultado al día 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 día 23 de julio del 2013)