

ESTUDIO FILOGENÉTICO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE LAGO DE CRATERES "7 LUMINRIAS"

Valerdi Negreiros, Julio César¹✉, Pacheco Cabañas, Rita Karen², Rivera Martínez, Laura Guadalupe³Rico Herrera, Mauricio³, Malm, Olaf⁴, Brito, Elcia Margareth Souza³

¹Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, ²Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, México, ³Ingeniería Ambiental (DI-GCT), Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, ⁴Biofísica Ambiental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

✉ Dirección de contacto, e-mail: jv_ner@hotmail.com

ABSTRACT

The *Cinturón Volcánico Transmexicano* has a great number of volcanoes which are suitable for bacterial biodiversity and bioprospection studies. The interest on such microorganisms is growing nowadays mainly due to the biotechnological applications, although they are also interesting on the ecological point of view, especially due to their adaptation to extreme conditions. Here we chose some volcano lakes on Mexican territory to do a bacterial bioprospection, namely: the *La Joya*, the *Cintora* and the *Rinconde Parangueo*, all located on the Santiago Valley, Guanajuato state. We think that geographic isolation can produce conditions that enable the evolution of extremophile microorganisms. With the aim of isolating such microorganisms we collected superficial sediment samples which were used as *inocula* for different culture media (LB, YPS, R2A and TSA). The heavy metal compositions vary from 0.0027 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg to 0.0034 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe; the nutrient analysis suggest hard eutrofization of *La Joya* Lake and, for *Parangueo* Lake, oligotrophic characteristics were found. After an extensive screening we obtained 15 bacterial strains on LB media, 16 on YPS media, 8 on R2A and 15 on TSA. The genomical DNA of these strains was extracted (Tsay and Griffith, 1993) and the gene rDNA 16S was amplified using universal oligonucleotide (8F and 907R). The PCR amplicons were send for sequencing on LAGEBIO-CINVESTAV, Irapuato. We obtained 32 strains from *Cintora* Lake and 22 from *La Joya* Lake. Unfortunately, no strain came from of *Parangueo* Lake with the culture conditions used, probably due to the alkaline conditions required for growth of bacterial populations specific of this site.

Keywords: *Extremophiles, bioprospection, the La Joya, the Cintora, the El Rincopn de Parangueo*

RESUMEN

El *Cinturón Volcánico Transmexicano* tiene un gran número de volcanes los cuales son adecuados para estudios de biodiversidad y bioprospección bacteriana. El interés sobre tales microorganismos está creciendo hoy en día principalmente debido a las aplicaciones biotecnológicas, aunque también hay interesantes desde punto de vista ecológico, sobre todo debido a su adaptación a condiciones extremas. En este trabajo elegimos algunos lagos volcánicos en territorio mexicano para hacer una bioprospección bacteriana, en concreto: *La Joya*, *Cintora* y *Parangueo*, todos ubicados en el Valle de Santiago, estado de Guanajuato. Creemos que el aislamiento geográfico puede producir condiciones que permitan la evolución de microorganismos extremófilos. Con el objetivo de aislar tales microorganismos se colectaron muestras de sedimentos superficiales que se utilizaron como *inóculos* para los diferentes medios de cultivo (LB, YPS, R2A y TSA). Las composiciones de metales pesados varían de 0,0027 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg a 0,0034 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe, el análisis de nutrientes sugieren fuerte eutrofización del lago *La Joya* y, por el lago de *Parangueo*, se encontraron características oligotróficas. Después de una extensa investigación se obtuvieron 15 cepas bacterianas en medio LB, 16 en medio YPS, 8 en R2A y 15 en TSA. Se extrajo el ADN genómico de estas cepas (Tsay y Griffith, 1993) y los genes de ADNr 16S se amplificaron utilizando oligonucleótidos universales (8F y 907R). Los ampliados de PCR fueron enviados para la secuenciación en LAGEBIO-CINVESTAV, Irapuato. Se obtuvieron 32 cepas del lago *Cintora* y 22 del lago *La Joya*. Por desgracia, no conseguimos cepas del lago *Parangueo* con las condiciones de cultivo utilizadas, probablemente debido a las condiciones

alcalinas, requeridas para el crecimiento de las poblaciones bacterianas específicas de este sitio.

INTRODUCCION

El Valle de Santiago constituye una de las regiones más simbólicas del Altiplano Mexicano debido a la presencia de siete conos volcánicos dispuestos en el terreno de tal manera que asemejan al acomodo de las siete estrellas de la Osa Mayor; también denominado la región de "Las siete luminarias" [1]. Las siete luminarias son, de norte a sur, Hoya Rincón de Parangueo, Hoya San Nicolás de Parangueo (también San Nicolás Parangueo o San Nicolás), Hoya Estrada, Hoya La Alberca, Hoya Blanca, Hoya Cintora (Zintora o La Cintura) y Hoya Álvarez. El fondo de al menos cuatro de estos cráteres fue suficientemente profundo para alcanzar el manto freático de la región, dando origen a lagos cráter (Maars); estos son: Rincón de Parangueo, San Nicolás de Parangueo, La Alberca y Cintora. Actualmente, la mayoría de estos lagos se encuentran en un estado avanzado de desecación o senescencia, con sus áreas superficiales y volúmenes reducidos.

El elevado proceso de deterioro de estos lagos pone en cuestión la pérdida de la biodiversidad de ese medio ambiente. Algunas de las causas antropogénicas de este proceso de deterioro son la deforestación, desviación de efluentes para la agricultura, la sobreextracción de aguas subterráneas, la contaminación y la eutrofización. La reducción del volumen del agua, también se ve reflejado en la alcalinidad y salinidad de estos lagos, y la combinación de salinidad y pH elevados, hacen que estos cuerpos acuáticos sean clasificados como un ejemplo de hábitat extremos, en donde sólo pueden habitar organismos altamente especializados, los microorganismos alcalófilos.

Se clasifica los microorganismos como extremófilos cuando estos resisten a condiciones ambientales extremas. Dependiendo de las condiciones extremas que se adaptaron también reciben nombres específicos. Por ejemplo, los seres que se adaptaron a temperaturas muy altas, son clasificados como hipertermófilos, los adaptados a temperaturas muy bajas (bajo 0°C) psicrófilos, los adaptados a pH muy bajos (<4) acidófilos y los que soportan pH superiores a 10 alcalófilos, etc. Estos microorganismos para habitar en dichas condiciones necesitaron, a lo largo de su evolución, desarrollar adaptaciones fisiológicas distintas de las que son observadas en los microorganismos no extremófilos. Por ejemplo, los microorganismos hipertermófilos deben poseer enzimas termolábiles, además, su membrana debe de tener compuestos lipídicos más resistentes a temperaturas elevadas para mantener la integridad de la célula. La pérdida de estos ecosistemas implica también en la pérdida de su biodiversidad microbiana e, indirectamente, el potencial biotecnológico que estos puedan presentar. Basado en esa premisa, ese trabajo tuvo como principal objetivo aislar microorganismos de los pocos lagos reminiscentes de la región del Valle de Santiago, México.

METODOLOGIA

Sitios de Muestreo – Se seleccionó como sitio de estudio tres lagos de cráteres volcánicos: el lago de la Joya (20.207581 lat. – 101.130001 long), el lago de Cintora (20.38968 lat. – 101.201287 long.) y, el lago del Rincón de Parangueo (20.420839 lat. – 101.254023 log.). La selección de estos puntos fue en función de las condiciones observadas in situ durante el muestreo: el Lago de la Joya como un ejemplo de un lago eutrofizado; el de Cintora como lago seco, y; el del Rincón de Parangueo como ejemplo de un lago extremadamente alcalino (pH superior a 10). Se colectaron muestras de sedimento superficial y del agua, de estos puntos al día 18 de junio de 2012, y en situ se determinaron la temperatura, el pH y la salinidad, con las cual se realizaron la caracterización microbiológica y química, y también sirvieron de inóculo para el aislamiento de los microorganismos cultivables por técnicas tradicionales en medio sólido.

Caracterización química y microbiológica – En la caracterización físico-química se utilizaron kits comerciales HASCH® para las análisis de los nutrientes (P-PO₄²⁻, N-NO₃, N-NO₂ and N-NH₄⁺) y determinación por espectrofotometría. Los metales se extrajo por digestión ácido y se determino por absorción atómica. Para la caracterización microbiológica se utilizó la

determinación de la producción del diacetato de fluoresceína, además del coteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y la determinación del número más probable (NMP).

Aislamiento microbiológico – Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron 4 medios de cultivo: LB, R2A, TSA e YPS. Inicialmente se preparó una dilución de cada muestra (hasta 10^{-3}) con sales de spitzzen, se aplicó 10 µL sobre medio sólido, se distendió con espátula de Drigalki, y se incubó a 35°C. Se seleccionaron las colonias morfológicamente distintas y aparentemente aisladas, las distendiendo en medio sólido con la técnica de estriación. Después, de a lo menos tres repiques estas fueron clasificadas respecto a la morfología de la colonia y de la célula (observada al microscopio óptico con aumento de 1000x). En esa clasificación se utilizó el siguiente código: (a) de acuerdo al sitio de muestreo se utilizó la letra "Y" para La Joya, "C" para Cintora; (b) respecto al lugar de toma de la muestra se utilizó una segunda letra, "S" para suelo y "ag" para agua, (c) la tercera letra se refiere a las condiciones metabólicas que requiere el oxígeno "O", y que sigue es un número descendente según el orden en que se fueron aislando.

Caracterización de los aislados bacterianos – Una vez aislada, se sembró cada una de esas en medio líquido (5 ml de medio + 100 µl del aislado), se cultivó por 24h y se preparó una pastilla de células para la extracción del ADN genómico, se extrajo el ADN de la cepa por medio de técnica tradicional [5]. Ese ADN se utilizó como molde para la amplificación del gen ADNr 16S utilizando oligonucleótidos universales 8F y 907R, por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los productos de la PCR fueron sometidos a una electroforesis (gel de agarosa 1.2%, en TAE) para corroborar el amplificado. Las muestras positivas fueron purificadas e enviadas al LANGEBIO-CENVESTAV, Irapuato para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron inicialmente analizadas con el software libre BIOEDIT, y la secuencia contig obtenida de las secuencias 8F y 907r fueron comparadas con las secuencias depositadas en el NCBI con el BLAST. Las secuencias de los aislados, y las secuencias de las cepas tipo más similares a estas, se utilizaron para obtener una planilla de similitud con el software mafft, y esa, se utilizó para obtención de un árbol filogenético con el software MEGA, utilizando parámetros de parsimonia y máximo verosimilitud, y *bootstrap* de 1000 veces.

RESULTADOS

El análisis de los parámetros físico-químicos del sitio de muestreo se lista en la Tabla 1. El lago del Rincon de Parangueo es muy alcalino, con valores de pH y de salinidad muy elevados, confirmando condiciones extremas de pH y salinidad para ese lago. La joya, por su vez, estuvo ligeramente alcalino con valores de pH de 9.5.

Tabla 1 – Caracterización físico-química y microbiológica del sitio de muestreo.

	Sedimento "Cintora"	Sedimento "Rincón de Parangueo"	Sedimento "La Joya"	Agua "Rincón de Parangueo"	Agua "La Joya"
pH	-	-	-	12	9.5
S (%)	-	-	-	12.2	1.7
T (°C)	-	-	-	25 - 38	27 - 27
F-PO42- (mg/L)	2.5	7.4	0.9	10.11	2.7
N-NO2 (mg/L)	<LD	14.4	1.7	3.8	0.1
N-NO3 (mg/L)	<LD	<LD	<LD	0.16	<LD
N-NH4 (mg/L)	1.13	5.5	0.3	0.7	0.3
YPS ^(a)	3×10^2	2×10^2	1×10^{11}	1×10^2	6×10^2
TSA ^(a)	3×10^2	2×10^3	8×10^7	2×10^2	4×10^1
MMB ^(a)	3×10^3	2×10^3	1×10^{11}	6×10^2	3×10^1
R2A ^(a)	3×10^3	3×10^2	2×10^{11}	4×10^2	2×10^1
LB ^(a)	2×10^4	2×10^2	2×10^7	4×10^2	2×10^1
NMP	1×10^3	7×10^3	2×10^3	7×10^2	7×10^4
EST	0.73	2.28	1.76	1.23	0.79

NMP para agua de uso humano; LD límite de detección; S – salinidad; T – temperatura; (a) Unidad Formadora de Colonia, número de células/100 mL, donde YPS es medio selectivo para bacterias aerobias totales, LB medio selectivo para bacterias entéricas, MMB medio selectivo para bacterias heterotróficas totales, R2A para bacterias heterotróficas y TSA medio selectivo para bacterias semifastidiosas; NMP, número más probable en el medio MMB (número de células/100 mL); EST actividad de las enzimas esterazas.

Primer Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental 4, 5 y 6 de septiembre de 2013

Las colonias observadas presentaron morfología relativamente poco variada, de estas se seleccionaron 7 colonias, 3 del sitio La Joya y 5 del sitio Cintora (Tabla 2), las cuales después de varios repiques en medio solido se obtuvieron 54 cepas (Tabla 3), donde 15 crecieron el LB, 16 en YPS, 8 en R2A y 15 en TSA. Desafortunadamente no se logro, en esa etapa ninguna colonia del sitio El Rincón de Parangueo, ni mismo en condiciones anaeróbicas.

Código	YSOT 01	CSOL 02	CSOT 03	CSOL 04	CSOY 05	YagO 06	YagO 07
Lugar	La joya	Cintora	Cintora	Cintora	Cintora	La Joya	La Joya
Medio	TSA	LB	TSA	LB	YPS	YPS	R2A
Color	Blanca	Amarilla	Blanca en el centro	Blanca/bri llosa	Blanca/bri llosa	Blanca	Blanca
Tipo	Cocos	Coco-bacilo	bacilo	Coco-bacilo	Coco-bacilo	cocos	Cocos-bacilos

Se extrajo el ADN genómico de 26 de estas cepas, y se amplifico el gene ARNr 16S. En el análisis de estas secuencias se observo que algunas cepas aun no se encontraban aisladas. Los resultados de la

Rcemustras, con el ADN extraído, e los 26 amplificados, únicamente resultaron positivos 17 de ellos, los cuales se purificaron mediante Se intento aislar cepas por método de Roll-tube para organismos anaerobios a partir de sedimento tomado del sitio de lago de *Parangueo*, al igual que se intento cultivar sobre medios sólidos específicos en placa petri para organismos aerobios.

No. De muestra	MEDIOS			
	LB	YPS	R2A	TSA
1	CSOL 03b	CSOY 05	YagOR 01	YSOT 01
2	CSOL 01a	CSOY 04	YagOR 05	YSOT 03
3	CSOL 01 M 01M	CSOY 02	YagOR 02 M	YSOT 06
4	3CSOL 02 M	CSOY 06 M	YagOR 06	YSOT 04
5	CSOL 01 M 02M	YagOY 01 M	YagOR 01 M	YSOT 05
6	CSOL 03a	CSOY 03	YagOR 02	YSOT 02
7	CSOL 05a	CSOY 02 M	YagOR 04	YSOT 02 M
8	CSOL 04a	CSOY 01	YagOR 03	CSOT 04
9	CSOL 02 ^a	YagOY 05		CSOT 03
10	CSOL 06 ^a	YagOY 02		CSOT 06
11	CSOL 01b	YagOY 06		CSOT 01 M
12	CSOL 05b	YagOY 04		CSOT 01
13	CSOL 02b	CSOY 02 M		CSOT 05
14	CSOL 06b	CagOY 01 M		CSOT 02
15	CSOL 04b	YagOY 01		CSOT 02 M
16		YagOY 03		

Tabla 2 Muestras analizadas en el presente estudio las cuales se encuentran organizadas por códigos correspondientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

LB	YPS	R2A	TSA		DNA EXTRAIDO AMPLIFICADO POR PCR SECUENCIACIÓN +	1°LETRA	LUGAR
CSOL 03b	CSOY 05	YagOR 01	YSOT 01			C	CINTORA
CSOL 01a	CSOY 04	YagOR 05	YSOT 03			Y	LA JOYA
CSOL 01 M 01M	CSOY 02	YagOR 02 M	YSOT 06				
3CSOL 02 M	CSOY 06 M	YagOR 06	YSOT 04				
CSOL 01 M 02M	YagOY 01 M	YagOR 01 M	YSOT 05				
CSOL 03a	CSOY 03	YagOR 02	YSOT 02				
CSOL 05a	CSOY 02 M	YagOR 04	YSOT 02 M				
CSOL 04a	CSOY 01	YagOR 03	CSOT 04				
CSOL 02a	YagOY 05		CSOT 03				
CSOL 06a	YagOY 02		CSOT 06				
CSOL 01b	YagOY 06		CSOT 01 M				
CSOL 05b	YagOY 04		CSOT 01				
CSOL 02b	CSOY 02 M*		CSOT 05				
CSOL 06b	CagOY 01 M		CSOT 02				
CSOL 04b	YagOY 01		CSOT 02 M				
	x						
15	16	8	15	54			

2°LETRA	SITIO
S	SUELO
ag	AGUA

3°LETRA	CONDICIONES
O	OXIGENO

4°LETRA	MEDIO
L	LB
Y	YPS
R	R2A
T	TSA

Tabla 3 Resultado final que se logro sobre cada una de las 54 muestras analizadas.

NO AISLADOS	DNA EXTRAIDO	AMPLIFICADO POR PCR	SECUENCIACIÓN POSITIVA
CSOL 03b	CSOY 05	CSOL 05b	CSOY 06 M
CSOL 01a	CSOY 04	CSOL 02b	CSOY 03
CSOL 01 M 01M	YagOY 02	CSOL 06b	CSOY 01
3CSOL 02 M	YagOY 06	CSOL 04b	CSOT 06
CSOL 01 M 02M	CSOY 02 M*	CSOY 02	CSOT 01 M
CSOL 03a	CagOY 01 M	YagOY 01 M	
CSOL 05a	CSOT 05	CSOY 02 M	
CSOL 04a	CSOT 02	YagOY 05	
CSOL 02a	CSOT 02 M	YagOY 04	
CSOL 06a		YagOY 01	
CSOL 01b		YagOY 03	
YagOR 01		CSOT 01	
YagOR 05			
YagOR 02 M			
YagOR 06			
YagOR 01 M			
YagOR 02			
YagOR 04			
YagOR 03			
YSOT 01			
YSOT 03			
YSOT 06			
YSOT 04			
YSOT 05			
YSOT 02			
YSOT 02 M			
CSOT 04			
CSOT 03			

Tabla4 Resultado final que se logro sobre cada una de las 54 muestras analizadas.

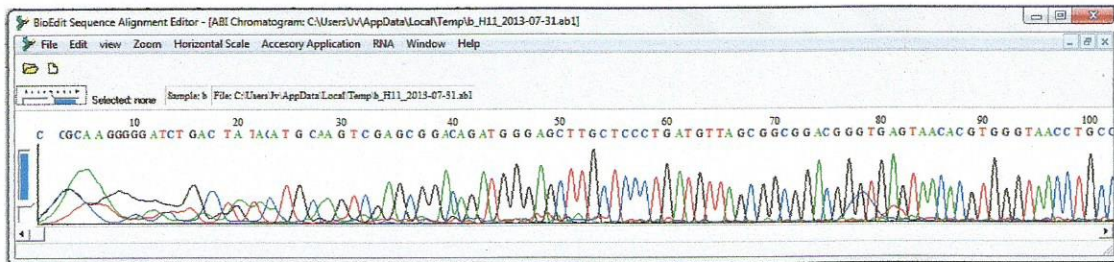


Figura 1 Ejemplo del resultado de secuenciación positivo para el oligonucleotido universal 8F aplicado a CSOT 06 (Muestra número 6 tomada en *Cintorea* partir de suelo, con necesidad de

oxígeno y cultivada en medio TSA).

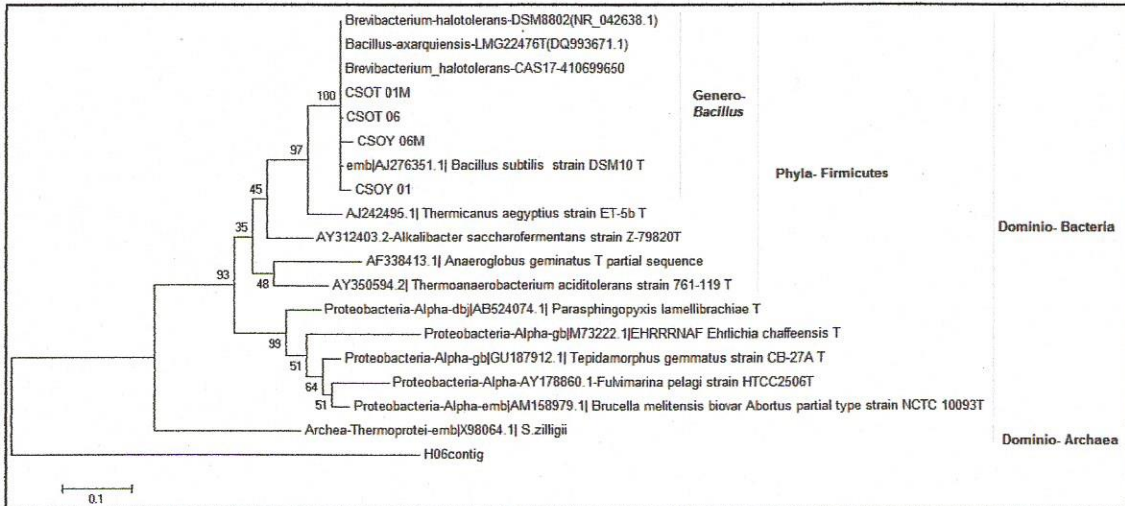


Figura 2 Análisis filogenético de muestras positivas en la secuenciación.

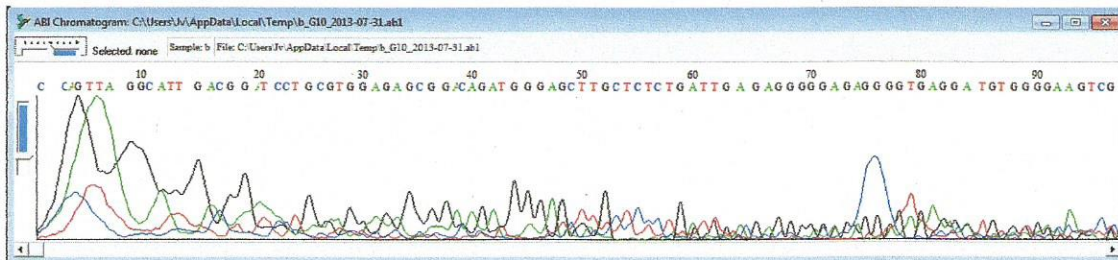


Figura 3 Resultado de secuenciación de la muestra CSOL 02b.

De acuerdo con los resultados observados en la tabla 2, la columna uno (no aislados) indica que aun están presentes dos o más organismos en el medio de cultivo creciendo por lo cual, aun se deben realizar pruebas para lograr separarlos y analizar así su secuencia genética. En la columna dos de la misma tabla, se enlistan las muestras las cuales si se lograron aislar, pero solo se extrajo su DNA, estas mismas muestras se intentaron amplificar con PCR sin tener resultados positivos. En la columna tres se observan las muestras que se amplificaron por PCR (con oligonucleótidos universales) y enviadas a secuenciar en el LANGEBIO-CINVESTAV Irapuato sin obtener resultados positivos, esto debido posiblemente a que en un nuevo estudio en donde se llevaron a cabo observaciones a través de microscopio óptico, se identificaron en las muestras de esta última columna dos morfologías distintas, solo que una más abundante que otra (100 veces más aproximadamente) lo cual implicó que al extraer DNA, teníamos doble secuencias de nucleótidos en un solo tubo eppendorf® y al secuenciar, los picos de las bases nitrogenadas (A, T, G,y C) no estaban definidas como se muestra en la figura 3. Por última en la columna cuatro se observan las 5 muestras que se lograron secuenciar positivamente y con las cuales se llevo a cabo el análisis de secuencias a través del software libre Bioedit versión 7.2.0 (figuras 1 y3) y el análisis filogenético por medio de MEGA 5.2.2 (figura 2).

En la figura 2 se muestra el resultado obtenido de un análisis filogenético realizado con el método de máxima verosimilitud usando el modelo de Jukes-Cantor. Para realizar este análisis, se utilizaron bacterias tipo obtenidas de LPSN (list of prokaryotic names with standing in nomenclature). En total se analizaron 19 secuencias, dentro de las cuales 5 son las secuencias que en nuestro análisis de secuenciación resultaron positivas, 4 del mismo género *Bacillus*, 4 del

Phylum Firmicutes, 5 del Phylum Proteobacteria (clase Alpha), y 1 del dominio Arque utilizando este último como grupo externo. Como se puede observar, y de acuerdo a el análisis realizado en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), en donde se observo una alta homología con *Brevibacterium halotolerans* cepa DSM 8802 con un 99% de similitud.

Como se menciona en la metodología, se llevaron a cabo múltiples pruebas para intentar aislar organismos presentes en el lago de Parangueosin tener resultados positivos, posiblemente debido a las condiciones de alta alcalinidad (pH 10) presentes en el sitio, pero se pretende continuar con el estudio implementando distintas pruebas para lograr el aislado y con esto obtener el análisis de la biodiversidad del sitio Parangueo.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio, se observa la presencia de organismos que logran sobrevivir a condiciones extremas sobre todo de salinidad y presencia de altas concentraciones de metales entre ellos el mercurio que es muy tóxico. Esto sugiere una aplicación biotecnológica utilizando estos microorganismos como una forma de bioprospección aplicando por ejemplo una biorremediación de suelos contaminados con determinados compuestos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, específicamente a la División de Ingenierías- Ingeniería Ambiental y Sanitaria por el apoyo otorgado al acceso de sus instalaciones.

A la Dra. Elcia M. Souza Brito por su infinito apoyo para lograr los resultados de este trabajo y por todos sus conocimientos. A los colaboradores del mismo que gracias a su siempre apoyo y disponibilidad obtuvimos resultados positivos.

Finalmente al comité organizador del SIBA, por la realización de este importante evento.

REFERENCIAS

[1] Jiménez, B., Marín, L. 2005. El agua en México vista desde la academia. Editorial Academia Mexicana de Ciencias. 1ª Ed (2004), edición digital (2005). México, D.F. Pp. 99- 116.

[2] Brito EMS, Andrade LH, Caretta CA, Duran R (2007) *Microorganisms Bioprospection: a New Tendency in Microbial Ecology*. In: Pawley LE (ed) *Leading-Edge Environmental Biodegradation*, pp. 199-222. Ed. Lyman E. Nova Science Publishers, Inc., EUA, ISBN 978-1-60021-903-9

[3] Koopman J. 2005. Reconciliation or property interests in genetics and knowledge resources: Hurry cauteriously! *Ecol. Economics*. 53:523-541.

[4] Synnes M. 2007. Bioprospecting of organisms from the deep sea: scientific and environmental aspects. *Clean Techn. Environ. Policy*. 9:53-59.

[5] Tsay and griff