

First report of thermo alcalophilic bacteria in "Los Baños del Carmen" Venustiano Carranza, Chiapas, Mexico

Primer reporte de bacterias termo alcalófilas del manantial "Los Baños del Carmen", Venustiano Carranza, Chiapas, México

Ortiz-Cortés, Lourdes Y.¹; Valseca-Ozuna, Stephany E.¹; Macal-de la Cruz, Fadia del R.¹;
Ventura-Canseco, Cristina¹; Abud-Archila, Miguel¹; Porras-Ruiz, Laura, Álvarez-Gutiérrez, Peggy E.^{2*}

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, C.P. 29050. ²CONACyT-Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, C.P. 29050.

*Autor para correspondencia: pealvarezgu@conacyt.mx

ABSTRACT

Objective: To isolate and to characterize extremophile microorganism from hot spring manantial "Baños del Carmen" Venustiano Carranza, Chiapas, México.

Design/methodology/approach: The samples were collected in three points of the main pit of the site called "Los Baños del Carmen". Serial dilutions were made and plated in LB medium and nutrient agar. Reseed colonies were isolated with different colonial morphology to obtain axenic cultures. Micro and macroscopic morphological characterization of the isolates and a biochemical characterization with the API 20E kit were carried out.

Results: Three alkaline thermophilic bacterial strains were successfully found: YEPF-C-ITTG, YEPF-J-ITTG, and YEPF-P-ITTG. All strains were Gram-negative and ability to grow at pH 8-10 and 50 °C. Also, all them have a fermentative metabolism of carbohydrates and beta-galactosidase activity.

Limitations on study/implications: The strategy used was limited to heterotrophic aerobic organisms; however, it is likely that there is a diversity of other types of prokaryotes and eukaryotes on the site.

Findings/conclusions: There are extremophile organisms in hot spring "Los Baños del Carmen", and this work is the first report with scientific evidence.

Keywords: biocatalytic bacteria, thermal water, microbiota

RESUMEN

Objetivo: Aislar y caracterizar microbiológicamente bacterias extremófilas del manantial "Baños del Carmen" Venustiano Carranza, Chiapas, México.

Diseño/metodología/aproximación: Las muestras fueron recolectadas en tres puntos de la fosa principal del sitio. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio LB y agar nutritivo. Se llevaron a cabo resiembras de colonias aisladas con diferente morfología colonial hasta obtener cultivos axénicos. Se llevó a cabo una caracterización morfológica micro y macroscópica de los aislados y una caracterización bioquímica con el kit API 20E.

Resultados: Tres cepas bacterianas termo alcalófilas fueron encontradas: YEPF-C-ITTG, YEPF-J-ITTG, y YEPF-P-ITTG. Todas las cepas fueron Gram negativas y registraron crecimiento en medios con pH de 8.0 a 10.0 y 50 °C. Además, todas las cepas tienen metabolismo fermentativo de carbohidratos y actividad beta galactosidasa.

Limitaciones del estudio/implicaciones: La estrategia utilizada se limitó a organismos aerobios heterotróficos; sin embargo, es probable que exista una biodiversidad de otro tipo de organismos procariones y eucariotes en el sitio.

Hallazgos/conclusiones: Existe vida bacteriana extremofila en el manantial "Los Baños del Carmen". Este es el primer reporte con evidencia científica.

Palabras clave: bacterias biocatalíticas, agua termal, microbiota

dos gradientes quimiosintéticos y se exhiben estructuras químicas únicas que soportan nuevos conjuntos de bacterias y arqueas (Inskeep *et al.*, 2015). Este tipo de microorganismos resultó ser de interés biotecnológico debido a su capacidad de producir termozimas de interés industrial. La importancia de éstas radica en su aplicación en la industria alimentaria química, farmacológica y biotecnológica, debido a que este tipo de industrias requiere de proteínas de carácter enzimático que tengan la capacidad de llevar a cabo reacciones de catálisis a temperaturas superiores a 45 °C (Kumar, Awasthi, & Singh, 2011). Estas comunidades termófilas también han despertado interés, debido a que a partir de ellas se ha desarrollado la clonación y expresión de sus genes en hospedantes heterólogos, aumentando así la cantidad de transformaciones impulsadas por enzimas en productos químicos, alimentos, aplicaciones farmacéuticas y otras aplicaciones industriales (Aanniz *et al.*, 2015; Egorova & Antranikian, 2005; Sarmiento, Peralta, & Blamey, 2015; Sharma, Kawarabaysi, & Satyanarayana, 2012).

En el estado de Chiapas, México, uno de los ambientes extremos que ha sido estudiado en los últimos años es el lago-cráter del Volcán El Chichón. En 2015, se identificaron bacterias termófilas pertenecientes al género de *Geobacillus*, registrando actividad lipasa. Las condiciones que se reportaron en este lago-cráter fue una temperatura de 71.5 °C y valores de pH de 2 a 5.5 (Meza-Flores, 2015). También se han identificado algunas especies de bacterias, tales como *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pantonea* y *Stenotrophomonas* (Rincón-Molina *et al.*, 2018). Otro ambiente extremo localizado en el estado de Chiapas son "Los Baños

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos extremófilos tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de organismos vivos. Se clasifican en base a la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan los termófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 45 °C); y dentro de éstos se encuentran los hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C) y psicrófilos (temperatura óptima de crecimiento inferior a 10 °C). Existen también aquellos microorganismos acidófilos (pH óptimo de crecimiento inferiores a 5) y alcalófilos (pH óptimo de crecimiento superior a 8), así como los halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5% a 30% de sal); osmófilos (viven a altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos (antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm) (Ramírez, Serrano, & Sandoval, 2006). Existen diferentes hábitats donde viven los microorganismos extremófilos los cuales incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, que pueden ser ácidos (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia en zonas que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos (Antranikian, Vorgias, & Bertoldo, 2005). El interés por los microorganismos termófilos empezó a explorarse desde 1980 siendo el lago-cráter de Yellowstone, Estados Unidos (Barns, Fundyga, Jeffries, & Pace, 1994), uno de los primeros lugares donde se encontraron comunidades termófilas cuyos atributos funcionales se correlacionan con pronuncia-

termales del Carmen”, los cuales se localizan en Venustiano Carranza (–92.711944 N, 16.417222 O). Este lugar se caracteriza por presentar aguas termales azufradas, lo cual lo convierte en posible fuente de comunidades termófilas; sin embargo, a la fecha no se han encontrado estudios microbiológicos en este ambiente, es por ello que el objetivo de este trabajo fue identificar bacterias termófilas de este sistema, así como evidenciar la presencia de actividades fermentativas y termozimas del metabolismo general, producidas por estos microorganismos por métodos bioquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras. La obtención de muestras se realizó mediante una recolecta en los “Baños del Carmen” (16.4145307 N, 92.7202742 O) ubicado en Venustiano Carranza, Chiapas. La toma de muestra se llevó a cabo en tres puntos de la primera fosa “río arriba” donde está el manantial principal. Las muestras de agua (20-30 mL) fueron colocadas en tubos cónicos de polipropileno estériles de 50 mL y fueron transportadas en un baño de hielo al laboratorio de Microbiología del Polo Tecnológico del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Posteriormente se realizó un aislamiento en diferentes medios de cultivo hasta obtener cultivos axénicos. Estas muestras fueron codificadas como YEFP-C-ITTG, YEPF-J-ITTG, y YEPF-P-ITTG.

Aislamiento de bacterias

De las muestras recolectadas se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo cónico de propileno de 15 mL con 9 mL de agua destilada estéril, estos tubos se homogenizaron y colocaron 24 h en una agitadora orbital a 45 °C. Se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , e inocularon con 1 mL del tubo anterior. Posteriormente, de éstos se transfirieron 300 μ L a los medios sólidos y líquidos LB (Extracto de levadura 5 g, peptona de caseína 10 g, NaCl 5 g) y caldo/agar nutritivo (Bioxón®) y se procedió a hacer una siembra en placa por extensión con una varilla de vidrio “L”. Las cajas fueron incubadas por 48 h a 50 °C. Una vez observado el crecimiento se realizó el aislamiento de las colonias en diversos medios de cultivo hasta obtener cultivos axénicos.

Condiciones de crecimiento y caracterización microbiológica

Las bacterias aisladas se cultivaron en medios sólidos y líquidos LB (Extracto de levadura 5 g, peptona de caseína 10 g, NaCl 5 g) y caldo/agar nutritivo (Bioxón®) a 50 °C y pH 7-9. En los cultivos líquidos se utilizaron tubos de

polipropileno cónico de 15 a 50 mL, o bien en matraces Erlenmeyer de 250 mL. En todos los casos el volumen del medio de cultivo no fue mayor a una tercera parte de la capacidad del tubo o matraz. La caracterización microbiológica se llevó a cabo mediante la observación directa de los cultivos crecidos en medios sólidos y observación en microscopio óptico con tinción Gram.

Caracterización bioquímica (API)

Se inoculó cada una de las galerías del kit comercial API E (Biomeroux, France®) de acuerdo a las instrucciones del proveedor con modificaciones. Se tomaron 300 μ L de una suspensión celular (A_{600nm} 0.400-0.800), posteriormente se incubó a 50 °C y se monitoreó el cambio de color de una a 24 h. El control negativo fue agua y medio de cultivo sin inocular tratado en las mismas condiciones del ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos axénicos de las cepas bacterianas YEFP-C-ITTG, YEPF-J-ITTG, y YEPF-P-ITTG aisladas del manantial en estudio, presentaron crecimiento en el medio de cultivo LB líquido a pH 8 a una temperatura de 50 °C. Las Figuras 1 A, B y C muestran la morfología colonial de las bacterias aisladas, las cuales presentaron forma irregular con un borde ondulado, con una elevación convexa y superficie plana, además de consistencia cremosa y coloración amarillo-crema. Las tres cepas crecen formando aglomerados. En los cultivos sumergidos sin agitación crecen sobre la superficie formando una capa. Las bacterias aisladas fueron Gram negativas (Figura 1 D, E y F). Las condiciones de crecimiento fueron de alta temperatura (50 °C) y rangos de pH de 7.0, 8.0 y 9.0 en cultivo sumergido, por lo que las tres cepas se consideran termófilas alcalófilas.

Respecto a las capacidades fermentativas, la Figura 2 muestra algunas actividades bioquímicas de las cepas YEFP-C-ITTG, YEPF-J-ITTG, y YEPF-P-ITTG. Todas las cepas fueron positivas para la prueba ONPG lo que sugiere presencia de la termozima beta galactosidasa. En cuanto al metabolismo fermentativo ambas cepas fueron capaces de fermentar diversos carbohidratos, tales como la glucosa, manosa, sorbitol, amilosa y arabinosa; además la cepa YEFP-C fermentó inositol.

Los hábitats extremos del estado de Chiapas son numerosos; sin embargo, han sido poco estudiados. Uno de ellos es el manantial de agua llamado “Los Baños del Carmen” ubicado en el manantial a 460 m de altitud.

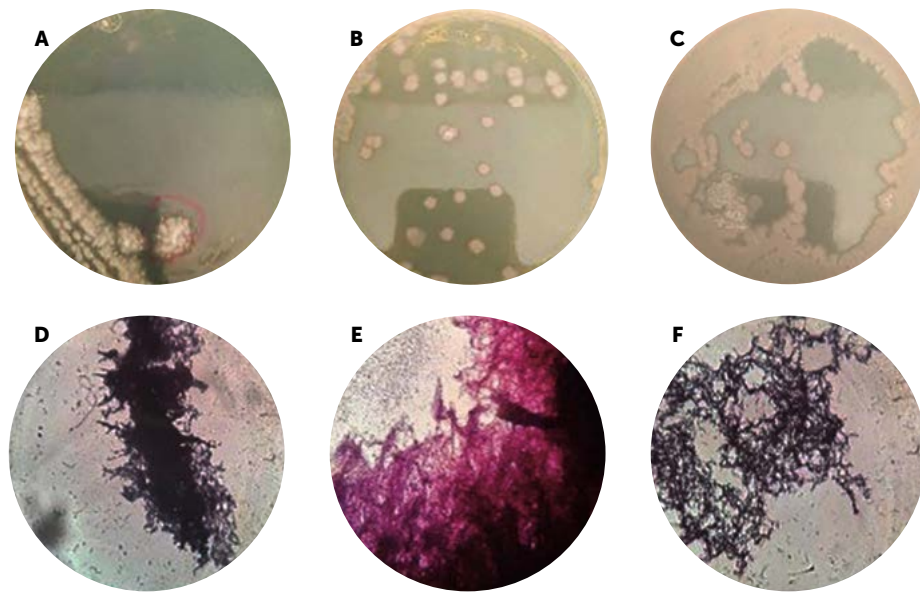


Figura 1. Características microbiológicas de las cepas YEFP-C-ITTG (A y D), YEFP-J-ITTG (B y E) y YEFP-P-ITTG (C y F). Morfología colonial en agar nutritivo cultivadas a pH 8 50 °C (A, B y C) y tinción Gram (D,E y F).

Cuatro afluentes nacen ahí, con tal equilibrio que dos son de agua fría y dos de agua termal (INEGI, 2017).

De acuerdo a Ulukanli & Rak (2002), los organismos que son capaces de crecer en medios con valores

de pH mayores a 9, se denominan alcalófilos; y en este caso estas las cepas estudiadas corresponden a esta clasificación. Las características microbiológicas de las tres cepas coincidieron con la formación de biopelículas o aglomerados flocula-

res (datos no mostrados), y probablemente pueden deberse a la secreción de exopolisacáridos ya que se ha reportado que la formación de flóculos puede estar directamente relacionada con la respuesta a pH en bacterias alcalófilas (Charles *et al.*, 2017). La caracterización de estos exopolímeros es una línea de investigación que requiere ser estudiada en estas cepas.

La caracterización bioquímica permitió explorar de forma presuntiva las características fermentativas de las cepas. A este respecto, las cepas indicaron que tienen un metabolismo aerobio capaz de utilizar carbohidratos simples, esta prueba también permitió encontrar polimorfismos en el metabolismo de carbohidratos que indican que las cepas son diferentes. El metabolismo fermentativo de las tres cepas indicó que no son capaces de reducir H₂S. Los organismos que viven en manantiales de aguas azufradas no necesariamente tienen la capacidad de reducir azufre, pues la diversidad de este tipo de ambientes extremos incluye microorganismos no relacionados con el ciclo del azufre, tal como se reportó recientemente para el manantial de aguas azufradas en Michoacán, llamado "Los Azufres" (Brito *et al.*, 2014).

El estudio de organismos termófilos es importante desde el punto de vista científico pues se contribuye al conocimiento de la fisiología de la vida en ambientes extremos y desde el punto de vista tecnológico porque representan una fuente de termozimas. Las termozimas son importantes porque a diferencia de sus homologas mesófilas presentan termoestabilidad y resistencia a cambios de pH, por esta razón es indispensable continuar con el estu-

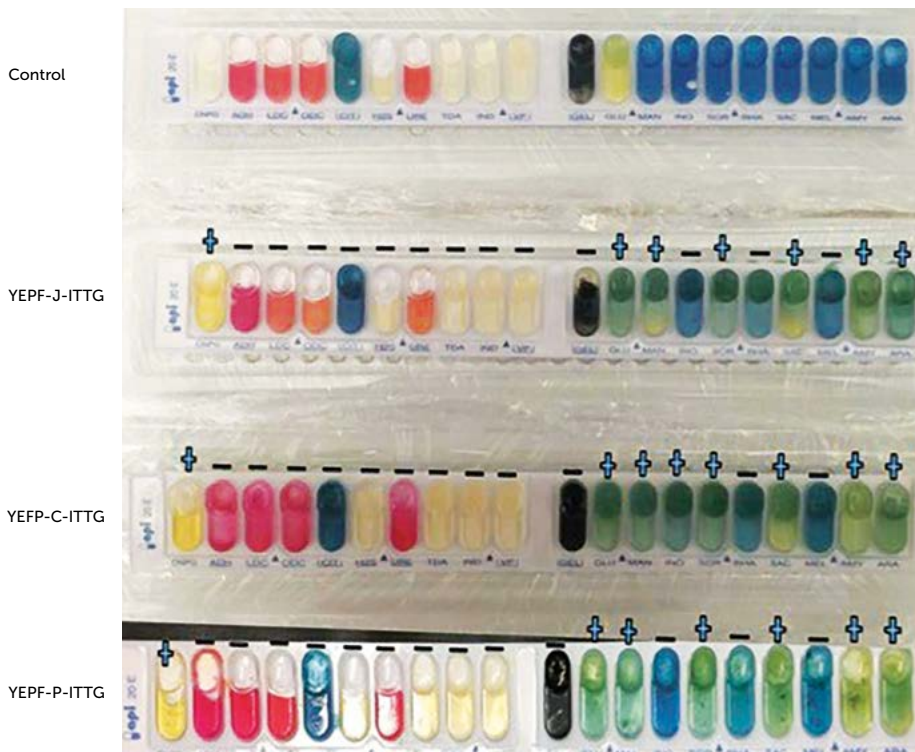


Figura 2. Resultados de caracterización bioquímica, prueba API 20E. Control medio de cultivo sin inocular.

dio de los microorganismos termófilos, y es importante evaluar las propiedades biocatalíticas de estos organismos termoestables.

CONCLUSIONES

A pesar de la activa influencia antropogénica, el manantial de agua evaluado, es un reservorio de microbiota de interés científico. Este trabajo constituye el primer reporte de la vida microbiana en el sitio. Las cepas YAFP-C-ITTG, YAFP-J-ITTG, y YAFP-P-ITTG son alcalófilas y termófilas, Gram negativas y capaces de fermentar azúcares simples.

LITERATURA CITADA

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibjibjen, J. & Amar, M. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140219>
- Antranikian, G., Vorgias, C. E., & Bertoldo, C. (2005). Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/b135786>
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., & Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1609>
- Brito, E. M. S., Villegas-Negrete, N., Sotelo-González, I. A., Caretta, C. A., Goñi-Urriza, M., Gassie, C., & Guyoneaud, R. (2014). Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0624-7>
- Charles, C. J., Rout, S. P., Patel, K. A., Akbar, S., Laws, A. P., Jackson, B. R., & Humphreys, P. N. (2017). Floc formation reduces the pH stress experienced by microorganisms living in alkaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02985-16>
- Egorova, K., & Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.015>
- INEGI. (2017). Anuario estadístico y geográfico de Sinaloa 2017. In INEGI, c2017. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-78701-5>
- Inskeep, W. P., Jay, Z. J., Macur, R. E., Clingenpeel, S., Tenney, A., Loyalvo, D., & Nealson, K. (2015). Geomicrobiology of sublacustrine thermal vents in Yellowstone Lake: Geochemical controls on microbial community structure and function. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01044>
- Kumar, L., Awasthi, G., & Singh, B. (2011). Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology*. <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.121.135>
- Meza-Flores R. (2015). Aislamiento e identificación de bacterias aerobias termófilas productoras de lipasas del lago-cráter del volcán Chichón. Tesis. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
- Ramirez, N., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*.
- Rincón-Molina, C. I., Hernández-García, J. A., Rincón-Rosales, R., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ramírez-Villanueva, D. A., González-Terreros, E., & Ruiz-Valdiviezo, V. M. (2018). Structure and Diversity of the Bacterial Communities in the Acid and Thermophilic Crater-Lake of the Volcano "El Chichón", Mexico. *Geomicrobiology Journal*. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1509158>
- Sarmiento, F., Peralta, R., & Blamey, J. M. (2015). Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00148>
- Sharma, A., Kawarabayasi, Y., & Satyanarayana, T. (2012). Acidophilic bacteria and archaea: Acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0402-3>
- Ulukanli, Z., & Rak, M. D. I. (2002). Alkaliphilic Micro-organisms and Habitats. *Turk J Biol*.

