



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

STHEPHANY ESMERALDA VALSECA OZUNA

NOMBRE DEL PROYECTO:

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS EXTREMÓFILAS NATIVAS
DEL ESTADO DE CHIAPAS”

ASESOR:

DRA. PEGGY E. ÁLVAREZ GUTIÉRREZ

PERIODO:

ENERO-JUNIO 2018

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

JUNIO/2018

Contenido

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS

Lista de Tablas	4
Índice de figuras	5
Capítulo I	9
1.1 Caracterización del área de participación	9
1.1.1 Lugar donde se realizó el estudio	9
1.2 Alcances y limitaciones	9
1.2.1 Limitaciones	9
1.2.2 Alcances	10
1.3 PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS	11
Capítulo II	12
2.1 PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS ...	12
2.1.2 Toma de muestra	12
2.1.3 Lugar de ejecución	13
2.1.4 Material biológico	13
2.2 Cultivo de bacterias	14
2.2.1 Preparación del medio de cultivo	14
2.2.2 Aislamiento de cultivo bacteriano	14
2.2.3 Aislamiento de cultivos puros en medio líquido	15
2.3 Conservación de las cepas	16
2.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	16
2.4.1 Prueba API 20E	16
2.4.2 Preparación de la suspensión bacteriana	17
2.4.3 Siembra de la galería API	17
2.4.4 Tapar con parafina líquida	17
2.4.5 Poner la galería en su propia cámara húmeda de incubación	17

2.4.6 Incubación.....	17
2.4.7 Comparación de resultados	17
2.5 Caracterización morfológica y microscópica	18
2.5.1 Tinción de Gram	18
2.5.2 Preparación al microscopio óptico.....	19
2.5.3 Identificación de colonias	19
2.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	20
2.6.1 Extracción de ADN.....	20
2.6.2 Electroforesis	21
2.6.3 Reactivo 50x	21
2.6.4 Reactivo 1x	21
2.6.5 Gel de agarosa.....	21
Capítulo III	22
3.1 Resultados y Discusión.....	22
3.1.1 Aislamiento de cultivo bacteriano	22
3.1.2 Aislamiento de cultivos puros en medio líquido	24
3.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUIMICA	26
3.2.1 Prueba API 20e	26
3.2.2 Tinción de Gram	28
3.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	30
3.3.1 Extracción de ADN.....	30
3.3.2 Electroforesis	32
Capitulo IV	33
4.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
4.1.1 Recomendaciones	33
4.2 COMPETENCIAS REALIZADAS Y/O DESARROLLAS	34
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES	34

Lista de Tablas

Tabla 1. Reactivos del medio Luria Bertani (LB). El agar bacteriológico se utilizará para la siembra en medio sólido.....	14
Tabla 2. De comparación de resultados de la prueba API 20e.....	18
Tabla 3. Soluciones para la Tinción de Gram.....	18
Tabla 4. Tabla de indicador del resultado en Tinción de Gram.....	18
Tabla 5. Descripción de forma y tinción de Gram.....	19
Tabla 6. Características morfológicas macroscópicas de los organismos.....	19
Tabla 7. Morfología colonial YEFP-C1.....	24
Tabla 8. Morfología colonial YEFP-J2.	24
Tabla 9. Morfología colonial YEFP-P1.....	24
Tabla 10. Resultados de los cultivos puros de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2.....	25
Tabla 11. Morfología colonial del cultivo puro YEFP-C1.....	25
Tabla 12. Morfología colonial del cultivo puro YEFP-J2.....	26
Tabla 13. Morfología colonial del cultivo puro YEFP-P1.....	26
Tabla 14. Resultados de la prueba API 20E de las cepas colectadas de los baños del Carmen.....	27
Tabla 15. Resultados de tinción de Gram.....	29
Tabla 16. Resultados de la descripción microscópica.....	30
Tabla 17. Resultados de la extracción de ADN con kit DNeasy Blood & Tissue.....	31
Tabla 18. Tabla de rangos de la calidad del ADN (Carlos, 2010).....	31

Índice de figuras

Ilustración 1. Localización geográfica de los baños del Carmen, Chiapas. Fuente: Google Maps.	12
Ilustración 2. Termos con muestras de los Lagos del Baño del Carmen.	13
Ilustración 3. Sitio experimental del lago de los Baños del Carmen. Puntos de Muestreo de las bacterias Extremofilas-alcalofilas.	13
Ilustración 4. Técnica de siembra por método de dilución.	15
Ilustración 5. Diagrama de flujo del aislamiento de cultivos puros.	16
Ilustración 6. Marcadores de color en la galería de la prueba API 20e.	18
Ilustración 7. Resultados de siembra del aislamiento de cultivo de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2.	22
Ilustración 8. Características morfológicas de las bacterias extremófilas YEFP-C1.	23
Ilustración 9. Características morfológicas de las bacterias extremófilas YEFP-J2.	23
Ilustración 10. Características morfológicas de las bacterias extremófilas YEFP-P1.	24
Ilustración 11. Morfología colonial del cultivo puro, YEFP-C1.	25
Ilustración 12. Morfología colonial del cultivo puro, YEFP-J2.	25
Ilustración 13. Morfología colonial del cultivo puro, YEFP-P1.	26
Ilustración 14. Galerías de la prueba API 20e de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2.	¡Error! Marcador no definido.
Ilustración 15. Tinción Gram de las cepas seleccionadas, YEFP-P1 (izquierda), YEFP-C1 (Centro) y YEFP-J2 (Derecha).	30
Ilustración 16. Electroforegrama en gel de agarosa al 1% de ADN de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1, YEFP-J2.	32

Introducción

El trabajo se centró en el cultivo y aislamiento de microorganismos extremófilos, además de una determinación molecular de las bacterias aisladas provenientes de 3 distintos puntos de los lagos del Baño del Carmen de Chiapas.

El desarrollo tecnológico requiere del uso de catalizadores y otras biomoléculas capaces de generar productos con una inversión mínima y en lapsos de tiempo cortos. De manera paralela, se debe disminuir el impacto ambiental que genera la actividad industrial, y optimizar la utilización y el manejo de los recursos naturales (Cavicchioli et al., 2011). Al día de hoy, el número de enzimas con aplicación industrial es inmenso, sin embargo, muchas de ellas sólo pueden funcionar bajo limitadas condiciones de temperatura, pH y medio de reacción (Sarmiento, 2015).

La gran biodiversidad existente entre los microorganismos extremófilos y su capacidad para sintetizar proteínas y enzimas (extremoenzimas), capaces de funcionar bajo condiciones extremas, ha abierto un prometedor panorama en la biotecnología, ya que gran parte de los procesos industriales ocurren bajo condiciones extremas de temperatura, presión, fuerza iónica, pH y solventes orgánicos. Además, las extremoenzimas pueden ser usadas como un modelo para diseñar y construir proteínas con nuevas propiedades de interés para determinadas aplicaciones industriales, a través de la manipulación genética de microorganismos. (Jia., 2013)

La identificación del microorganismo consiste en la asignación de una bacteria o microorganismo a un taxón según una clasificación establecida. Permite llegar a determinar la especie o incluso la cepa de la bacteria aislada previamente en una muestra. Para ello se determinan las características fenotípicas del microorganismo y se comparan con las diferentes categorías de la clasificación considerada (Sanguiné., 2013).

Justificación

Existen diversas investigaciones sobre bacterias que pueden desarrollarse en ecosistemas extremos, estos ecosistemas se extienden en la mayor parte de la superficie terrestre. Las comunidades bacterianas que crecen en este tipo de ecosistemas son de gran interés puesto que se han encontrado diversos estudios en donde las enzimas de estos microorganismos son utilizadas en la industria alimentaria, puesto que resisten altas temperaturas durante el proceso de elaboración de algunos alimentos derivados de la leche. Otra aplicación importante en el estudio de microorganismos extremófilos es en el sector biotecnológico el cual ha sido de gran interés en los últimos años, ya que se han realizado estudios donde las enzimas de este tipo de bacterias son de gran ayuda para la clonación de las cadenas de ADN de una manera más rápida y simple.

Las bacterias extremófilas tienen una gran dificultad para ser cultivadas ya que el conocimiento y el manejo de las técnicas aún son muy limitados, debido a la falta de investigaciones relacionadas con el tema. Es importante recalcar que el aislamiento y cultivo de estos pueden llegar a ser complicadas, puesto que, las condiciones de crecimiento en su hábitat natural son “extremas” y simular un ambiente parecido a nivel laboratorio puede llegar a ser complicado.

Objetivos

Objetivo general:

IDENTIFICAR BACTERIAS TERMÓFILAS AISLADAS DE AGUAS TERMALES EN CHIAPAS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DE GENES RIBOSOMALES 16S.

Objetivos específicos:

- Aislar de bacterias extremófilas mediante diluciones seriadas en medios de cultivo ricos.
- Identificar microbiológicamente de bacterias alcalófilas termófilas mediante pruebas bioquímica y tinción Gram.
- Identificar molecularmente bacterias alcalófilas termófilas a través amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de genes ribosomales 16 S.

Capítulo I

1.1 Caracterización del área de participación

1.1.1 Lugar donde se realizó el estudio

En el Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles, laboratorio de Microbiología No. 3 del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, localizado en carretera panamericana Km. 1080 col. Juan Crispín, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

1.1.2 Misión del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

1.1.3 Visión del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

1.2 Alcances y limitaciones

1.2.1 Limitaciones

Los reactivos se demoraban de vez en cuando porque no contábamos con ellos en el laboratorio.

Los equipos teníamos que prestarlos en otros laboratorios para poder ocuparlos y a veces teníamos que esperar días para poder usar algunos.

No teníamos una tarja para lavar el material sucio y poder ocuparlos, teníamos que prestar en otros laboratorios para poder lavar.

En el crecimiento de las bacterias les hacía crecer una capa de nata en la cual esta no nos permitía leer en el espectrofotómetro.

No todas las incubadoras tienen el rango para el crecimiento de las bacterias extremófilas ya que sus temperaturas tienen que ser altas.

Son bacterias muy ácidas por lo tanto el crecer en pH muy altas era complicado para el medio sólido al momento de solidificar.

Tienen diferencias en las estructuras en la membrana para la identificación

Tienen que modificarse los kit y técnicas para las bacterias extremófilas.

1.2.2 Alcances

Los microorganismos extremófilos constituyen la opción más prometedora como fuente de biomoléculas con capacidad biocatalizadora, capaces de soportar condiciones drásticas de proceso y cuyo uso comercial puede conducir a la sustentabilidad industrial. (Cavicchioli,2011)

La amplia aplicación de las enzimas para las industrias química, farmacéutica y de alimentos crea una fuerte demanda de biocatalizadores que tengan propiedades nuevas y mejoradas. (Hasan, 2010)

Los microorganismos extremófilas aislados poseen un importante potencial para ser aplicado particularmente en la petrolera, en procesos de recuperación microbiana de petróleo (destaponamiento, fluidización, consolidación de arenas) y prevenir la biocorrosión, así como en la protección ambiental. (Codina Escobar, 2008)

Las enzimas de los microorganismos extremófilas pueden ser aplicados en la industria alimentaria para la hidrólisis de grasas, particularmente productos lácteos; en la industria textil, para la remoción de impurezas del algodón antes del procesamiento y teñido; en la industria peletera para retirar la grasa subcutánea de las pieles. (Oliart-Ros, 2016)

La aplicación de enzimas termófilas y alcalófilas aplicadas a detergentes biológicos, pueden ayudar a la remoción de depósitos orgánicos en la ropa, como grasas y aceites, que además

de ser activas a las altas temperaturas y en las condiciones alcalinas de las aguas de lavado, son resistentes a los componentes de los mismos. (Regla, 2013)

1.3 PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS

- 1.- La inoculación de las bacterias se llevó a cabo con éxito en los primeros meses de la estancia enero-marzo, el aislamiento después de muchas pruebas obtuvimos los cultivos puros con los cuales partimos el experimento.
- 2.- La extracción de ADN tuvo buen resultado, dando una cantidad considerable de ADN extraída para hacer su cuantificación en el NanoDrop.
- 3.- La electroforesis de ADN nos demostró la cantidad molecular de las muestras encontradas en la extracción de ADN.
- 4.- Aún podremos saber qué tipo de bacterias son con las que hemos estado trabajando mediante la secuenciación.
- 5.- No contamos con mucha información sobre este tema en específico.
- 6.- No se ha desarrollado una tecnología para llevar a cabo para bacterias extremófilas.

Capítulo II

2.1 PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

2.1.2 Toma de muestra.

La localidad de Baños del Carmen está situada en el Municipio de Venustiano Carranza (en el Estado de Chiapas). Baños del Carmen está a 460 metros de altitud. Cuatro afluentes nacen ahí, con tal equilibrio que dos son de aguas frescas y dos de aguas termales. las aguas azufradas provienen de cuevas saturadas de azufre, mineral asociado a la actividad volcánica y que puede ser encontrado en los bordes de los cráteres de volcanes extintos, donde se han depositado gases emanados durante sus erupciones. (Constantino López et al., 2012).



Ilustración 1. Localización geográfica de los baños del Carmen, Chiapas. Fuente: Google Maps.

Ambos afluentes desembocan, más tarde, en el río Grijalva. las aguas azufradas provienen de cuevas saturadas de azufre, mineral asociado a la actividad volcánica y que puede ser encontrado en los bordes de los cráteres de volcanes extintos, donde se han depositado gases emanados durante sus erupciones.

2.1.3 Lugar de ejecución

Las muestras fueron transportadas en termos al laboratorio 3 de Microbiología del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles que se encuentra en el Tecnológico Nacional campus Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, localizado en carretera panamericana Km. 1080 col. Juan Crispín, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Fueron almacenadas a 37 °C

2.1.4 Material biológico

El material biológico consta de agua y sedimentos que se recolectaron dentro del lago, en la Figura 2 se muestra el sitio de muestreo de los 3 diferentes puntos de colecta.



Ilustración 2. Termos con muestras de los Lagos del Baño del Carmen.

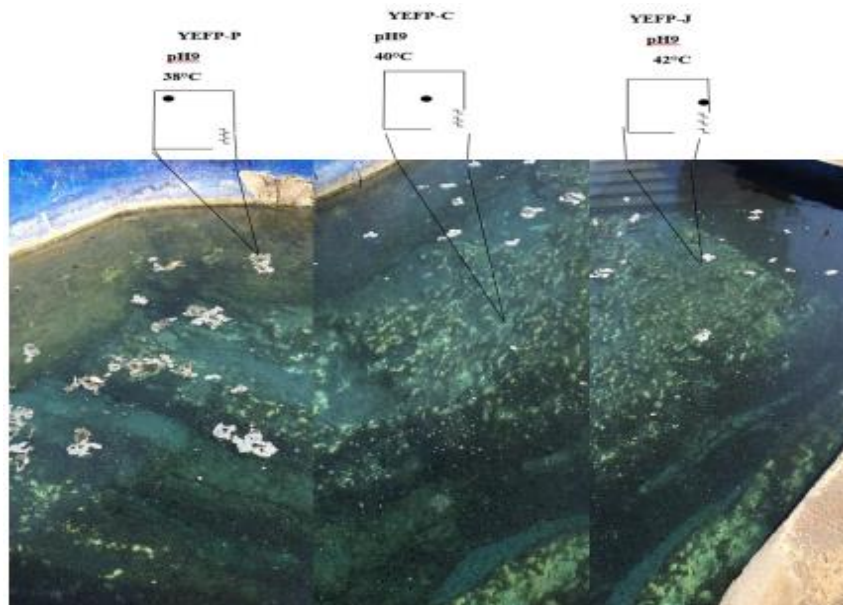


Ilustración 3. Sitio experimental del lago de los Baños del Carmen. Puntos de Muestreo de las bacterias Extremofilas-alcalofilas.

2.2 Cultivo de bacterias

2.2.1 Preparación del medio de cultivo

Medio LB

Para la siembra en medio sólido se utilizó agar bacteriológico de la marca Bioxon^{MR}, cloruro de sodio, extracto de levadura, peptona de caseína de la marca DIBICO^{MR}, el modo de preparación fue de acuerdo a las especificaciones del fabricante, adicionándole la concentración de agar bacteriológico al 4%. Con pH de 7, se preparó 100 mL del medio sólido para 4 cajas petri, una para cada muestra más una de control, cada caja con 25 mL de medio, para la siembra en medio líquido se utilizó caldo nutritivo de la marca Bioxon^{MR} y caldo de cloruro de sodio, extracto de levadura, peptona de caseína de la marca DIBICO^{MR}, el modo de preparación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Con un pH de 9, se preparó 130 mL para 10 tubos falcón, 3 tubos por muestra más el control, cada tubo con 12 mL del medio.

Tabla 1. Reactivos del medio *Luria Bertani* (LB).

El agar bacteriológico se utilizará para la siembra en medio sólido.

Reactivos	Cantidad para 1L
Cloruro de Sodio	5 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona de Caseína	10 g
Agar Bacteriológico	4 g

2.2.2 Aislamiento de cultivo bacteriano

Para la siembra en medio sólido se inoculó 500 µl de muestra en las cajas petri con 25 mL de medio LB para los 3 puntos de muestreo realizadas por triplicado. para la siembra en medio líquido se inoculó 3 mL de muestra en tubos falcón de 15 mL con 12 mL de medio LB para los 3 puntos de muestreo realizadas por triplicado. Se agitó hasta homogenizar el caldo de cultivo, las cajas petri y los tubos sembrados se dejó en incubación a 50°C por 24hrs, las muestras con más crecimiento fueron: YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2; Posteriormente

fueron incubadas a -4°C , Por lo tanto, se procedió a hacer diluciones para hacer la siembra y tener completamente colonias aisladas.

2.2.3 Aislamiento de cultivos puros en medio líquido

Las muestras tomadas para el aislamiento fueron: YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2; se usó 7 tubos falcón con 9 mL de agua estéril para cada muestra que en total fueron 21 tubos y 189 mL de agua estéril, con un aza se tomó y se sacó pellet para depositarlo en un tubo falcón con 9 mL de agua estéril, de cada respectiva muestra, después se tomó el tubo falcón con 9 mL de agua estéril y el pellet, con una micropipeta retiramos 900 μl del tubo y lo depositamos en un nuevo tubo falcón con 9 mL de agua estéril, posteriormente retiramos 800 μl del tubo falcón con 900 μl y el agua estéril y lo depositamos en un nuevo tubo falcón con 9 mL de agua estéril. Del tubo de 800 μl retiramos 700 μl y lo depositamos en un nuevo tubo falcón con 9 mL de agua estéril, del tubo 700 μl retiramos 600 μl y lo depositamos en un nuevo tubo falcón con 9 mL de agua estéril, del tubo 600 μl retiramos 500 μl y lo depositamos en un nuevo tubo falcón con 9 mL de agua estéril, del tubo 500 μl retiramos 400 μl y lo depositamos en un nuevo tubo falcón con 9 mL de agua estéril. Estos pasos fueron realizados para cada muestra correspondiente. Y gráficamente es así como se muestra en la figura 3.

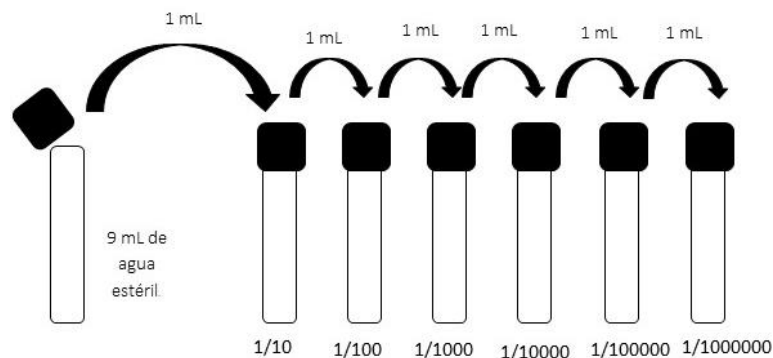


Ilustración 4. Técnica de siembra por método de dilución.

Obteniendo las diluciones 10^{-4} para YEFP-P1, YEFP-C1 y 10^{-6} para YEFP-J2; se realizó la siembra en medio sólido LB con pH 7 colocando 100 μl de cada muestra diluida con una micropipeta distribuyendo en 3 cajas petri, las cajas petri se dejó en incubación a 50°C por 24hrs, ya que se obtuvo nuestras colonias completamente aisladas por técnica de estría cruzada se sembró cada colonia de las muestras en otras 3 cajas petri con medio sólido LB con pH 7, una por muestra y nuevamente se dejó las cajas petri en incubación a 50°C por

24hrs, y posteriormente se guardó a una temperatura de -4°C . Así como se muestra en la ilustración 5.

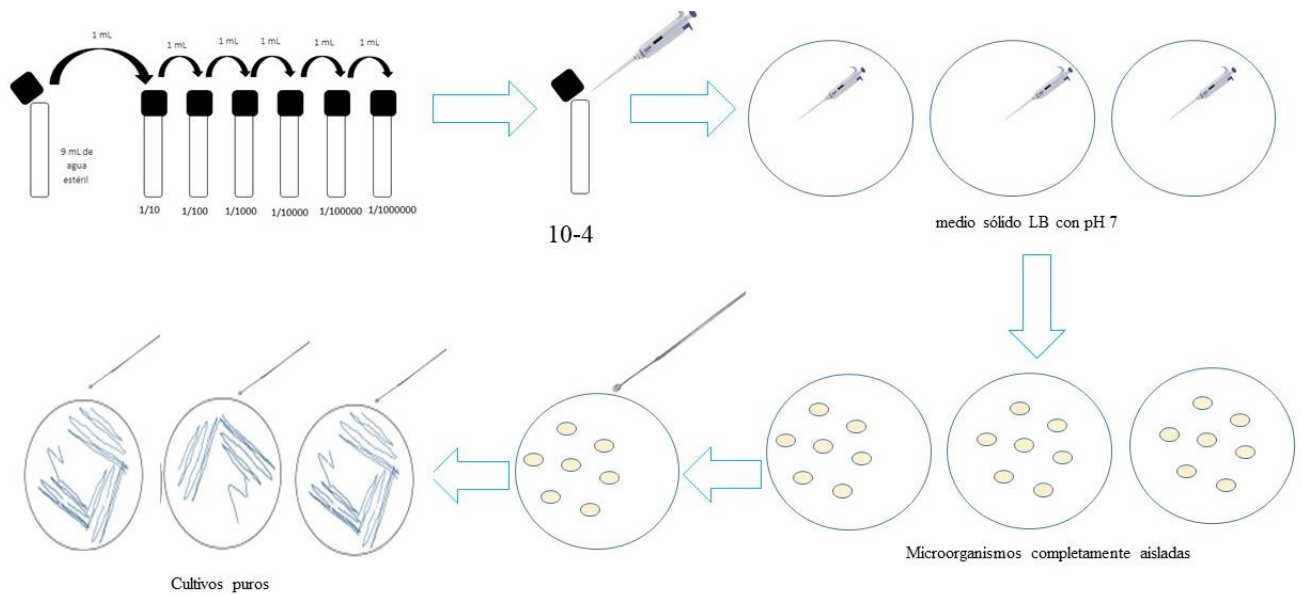


Ilustración 5. Diagrama de flujo del aislamiento de cultivos puros.

2.3 Conservación de las cepas

Para las cepas YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2; se creció en medio LB, 100 mL por muestra en matraz Erlenmeyer, el inóculo se tomó de los cultivos puros ya obtenidos y se dejó a incubar a 50°C por 48 horas, en tubos eppendorf de 2 mL se colocó 1000 μl de caldo con la cepa ya crecida y se centrifugo a 3000 rpm durante 5 min, obteniendo 100 μl de pellet se le agrego 200 μl de glicerol, se dejó incubar a -20°C y a -80°C .

2.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

2.4.1 Prueba API 20E

Para esta prueba con el pre inóculo ya preparado anteriormente en la medición de pH con medio líquido LB de cada muestra YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2; se llevó a cabo el procedimiento siguiente.

2.4.2 Preparación de la suspensión bacteriana

Se preparó 4 matraces con 50 mL de medio LB se inoculo con 1 mL del pre inóculo a cada matraz por cada muestra, se incubaron a 50°C por 72 horas, posteriormente en 3 tubos falcón colocamos 10 mL de cada muestra y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se colocó en Vórtex para obtener medio limpio, libre de nata para poder colocarlo en la galería.

2.4.3 Siembra de la galería API

Se usó 300 µl de cada tubo de muestra, cada pocillo tiene un tubo y una cúpula (parte aerobia), se llenó con la suspensión de bacterias los tubos, no la cúpula, de todos los pocillos, se llenó la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de las bacterias 300 µl.

2.4.4 Tapar con parafina líquida

Se llenó con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LCD, ODC, URE, H2S para que obtuviéramos anaerobiosis.

2.4.5 Poner la galería en su propia cámara húmeda de incubación

Se colocó la tira en su propia cámara húmeda de incubación. Previamente se puso agua estéril en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmosfera húmeda durante la incubación.

2.4.6 Incubación

Incubamos a 50°C para extremofilos el tiempo es 1 hora.

2.4.7 Comparación de resultados

Después del tiempo de incubación se sacó la prueba y se consultó como se menciona en la tabla.

Tabla 2. De comparación de resultados de la prueba API 20E.

Pruebas	Reacción/ Enzimas	Negativo.	Positivo.
ONPG	B-Galactoadasa	Sin color	Amarillo
ADH	Arginina deshidrogenasa	Amarillo	Rojo o naranja
LCD	Lisina dexcarboxilasa	Amarillo	Rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o naranja
CIT	Utilización de citrato	Verde	Azul oscuro o turquesa
HIS	Producción de H ₂ S	Sin precipitado	Precipitado negro
URE	Ureasa	Amarillo	Rojo o naranja
TDA	Triptofano desaminasa	Amarillo	Marrón o rojo
IND	Producción de indol.	Amarillo	Color rosa o anillo rosa
UP	Producción de acetona.	Sin color	Rosa o rojo
GEL	Quelatinasa	Sin difusión	Difusión del pigmento

GLU	Fer/ Ox. Glucosa	Azul o verde	Amarillo
MAN	Fer/ Ox. Monitol	Azul o verde	Amarillo
INO	Fer/ Ox. Inositol	Azul o verde	Amarillo
SUR	Fer/ Ox. Sorbitol	Azul o verde	Amarillo
RHA	Fer/ Ox. Romnosa	Azul o verde	Amarillo
SAC	Fer/ Ox. Sacarosa	Azul o verde	Amarillo
MEL	Fer/ Ox. Melobiosa	Azul o verde	Amarillo
AMY	Fer/ Ox. Amydolina	Azul o verde	Amarillo
ARA	Fer/ Ox. Arobinosa	Azul o verde	Amarillo
OX	Citocroma oxidasa	Azul o verde	Amarillo



Ilustración 6. Marcadores de color en la galería de la prueba API 20e.

2.5 Caracterización morfológica y microscópica

2.5.1 Tinción de Gram

En la Tabla 3 se muestran las soluciones que se utilizaron para la identificación microscópica de las cepas bacterianas, se colocaron de 1 a 2 gotas de la muestra a analizar en un portaobjetos de vidrio, se extendió uniformemente formando una mancha delgada, por último, se fijó la muestra pasando rápidamente al portaobjetos 4 o 5 veces sobre la llama de un mechero Busen, cuidando que la llama no sobrecaliente las muestras.

Tabla 3. Soluciones para la Tinción de Gram.

Solución	Tiempo de aplicación	Bacterias Gram positivas	Bacterias Gram negativas
Colorante: Cristal violeta	30 s	Violeta	Violeta
Mordiente: Lugol	1 min	Violeta	Violeta
Decolorante: Alcohol-cetona	10 s	Violeta	Incolora
Colorante de contraste: Safranina	45 s	Violeta	Rosada

2.5.2 Preparación al microscopio óptico

Se colocó el portaobjetos sobre el microscopio, se le agrego una gota de aceite de inmersión para una mayor claridad, se examinó el extendido al microscopio con objetivo de inmersión (40X)

Tabla 4. Tabla de indicador del resultado en Tinción de Gram.

GRAM POSITIVA	VIOLETA
GRAM NEGATIVA	ROJO O ROSADO

Tabla 5. Descripción de forma y tinción de Gram

Característica	Descripción
Forma	La forma puede ser redonda o coco, bacilo, hifa, espirilo o espiroqueta
Tinción Gram	La tinción Gram aplica solo para bacterias y puede ser positiva o negativa

2.5.3 Identificación de colonias

La identificación de las colonias se llevó a cabo mediante la observación en placa, en donde se buscaron características.

Tabla 6. Características morfológicas macroscópicas de los organismos.

Características	Descripción
Borde	Los bordes de la colonia se describen como entero, ondulado, lobulado o filamentosos
Elevación	La elevación de la colonia respecto a la superficie del medio se define como plana, convexa o elevada
Superficie	La superficie de la colonia se define como lisa, rugosa o plegada
Consistencia	La consistencia se determina con el asa y puede ser cremosa o membranosa
Color	El color de la colonia se define en general y se usan términos comunes para definirlo, en algunos casos se especifica si existe un pigmento producido difusible o no

Luz transmitida	Las características ópticas consisten en observar a través de la colonia para determinar la luz transmitida, la cual puede ser opaca, traslúcida o transparente.
-----------------	--

2.6 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

2.6.1 Extracción de ADN

El método de extracción lo realizamos con DNeasy Blood & Tissue kit (250) con técnica modificada.

Se extrajo la muestra con un aza en circunstancias estéril, en un tubo eppendorf estéril se colocó, para cada muestra en total fueron 3 tubos, resuspendimos el pellet en 180 µl de buffer ATL, se agregó 20 µl de proteinasa K, se mezcló vigorosamente mediante Vórtex, vorteamos de vez en cuando durante la incubación para dispersar la muestra, se agregó 200 µl de buffer AL a la muestra y mezclamos vigorosamente mediante Vórtex, se agregó 200 µl de etanol (96-100%) a -20°C, y se mezcló vigorosamente de nuevo mediante Vórtex, se pipeteo la mezcla de la etapa 5 (incluyendo cualquier precipitado) en la mini columna giratoria DNeasy colocada en el tubo de colecta de 2 mL. Se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm. Se descartó el filtrado y el tubo de colecta, se colocó la mini columna giratoria DNeasy en un nuevo tubo de colecta de 2 mL, se agregó 500 µl de buffer AW1, y se centrifugó 1 min a 8000 rpm. Se descartó el filtrado y el tubo de colecta, se colocó la mi columna giratoria DNeasy en un nuevo tubo de colecta de 2 m, se agregó 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó durante 3 min a 14000 rpm para que pudiéramos sacar la membrana DNeasy. Se descartó el filtrado y el tubo de colecta (2x). se vació en el tubo de colecta luego se reutilizó en otra centrifuga durante 3 min por 14000 rpm, se colocó la mini columna giratoria en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL O 2 mL y se pipeteó 150µl de buffer AE (ADESI) directamente en la membrana de DNeasy . Se esperó 10 min y se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm para eluir, se repitió la elución de nuevo como se describe la etapa, pero sacándolo del tubo de microcentrifugación y colocándolo directamente en la membrana, se dejó incubando las muestras por 24 horas a -4°C.

Posteriormente se midió la concentración de DNA obtenida en el NanoDrop.

2.6.2 Electroforesis

Para esta prueba se requirió del reactivo 50x, 1x, gel de agarosa para poder llevarse a cabo.

2.6.3 Reactivo 50x

Se pesó el Tris y el EDTA, se agregó 80 mL de H₂O en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se mezcló, se pipeteó 5.7 mL de ácido acético en el matraz y se mezcló, se midió el pH a 8.5 en el pHmetro, se aforó a 100 mL con H₂O destilada con una probeta, se colocó en un frasco grande y se esterilizó a 15-15.

2.6.4 Reactivo 1x.

Se agregó 1 mL de TAE 50x más 49 mL H₂O estéril, que es igual a 50 mL TAE 1X es decir al 1%.

2.6.5 Gel de agarosa

Se colocó 50 mL de TAE 1X en el matraz Erlenmeyer y se dejó caer la pastilla de agarosa, se colocó por 1 min en el microondas hasta que la pastilla se disolviera completamente y su color quedara transparente, se dejó que la solución de agarosa se enfriara al punto que nuestra mano pudiera soportar lo caliente, se vertió la solución de agarosa en el molde indicado, sellado en los extremos y con el peine instalado, se dejó polimerizar durante 20 min aproximadamente, se retiró los sellos y el peine cuidando de no romper los pocillos, se llenó el aparato de electroforesis en gel horizontal, con el tampón TAE 1X (200 mL), hasta cubrir el gel, posteriormente ya que obtuvimos nuestras soluciones se procedió a hacer la prueba de electroforesis, se colocó en la mesa un porta objetos, se pipeteó 1 µl del gel red por cada muestra y se puso en el porta objetos cada µl separado no se debía de juntarse. Se colocó 2 µl de buffer de carga a cada 1 µl del gel red en el porta objeto haciéndolo homogéneo, se pipeteó 5 µl de muestra de ADN y se juntó con los 3 µl posteriores haciendo nuestra mezcla homogénea, se llenó los pocillos con 8 µl de estándares de peso molecular, se tuvo mucha precaución y cuidado al llenar los pocillos checando que nuestras puntas no fueran con burbujas porque si no causaría burbujas a nuestros pocillos y posiblemente se saliera nuestra muestra, se aplicó a corriente continua y corrimos el gel a 80 V, y se esperó a que corriera la muestra. Aproximadamente 50 min, al término de la electroforesis se extrajo el gel y lo llevamos a la cámara de electroforesis para fotodocumentar los resultados.

Capítulo III

3.1 Resultados y Discusión

3.1.1 Aislamiento de cultivo bacteriano

Las 3 muestras colectadas en los baños del Carmen se cultivaron en medio rico líquido, las 3 presentaron crecimiento con pH 9, después de un tiempo de incubación de 24 horas a una temperatura de 50°C. Comparado con el blanco, las 3 muestras tenían turbidez y tenían presencia de nata en la parte superior de cada tubo, así como se muestra en la ilustración 7.



Ilustración 7. Resultados de siembra del aislamiento de cultivo de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2.

Las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2 se cultivaron en medio rico sólido con pH 7 en un tiempo de incubación de 24 horas a temperatura de 50°C. Los resultados de las colonias aisladas se muestran en las ilustraciones 8,9 y 10, así mismo se muestra a un costado en las tablas 7,8 y 9 su morfología colonial.

La bacteria YEFP-C1 presenta una morfología irregular con bordes ondulados, convexos de color crema, con consistencia cremosa como lo muestra la ilustración 8.

Tabla 7. Morfología colonial YEFP-C1.

Característica	Descripción
Forma	Irregular
Borde	Ondulado
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Color	Crema



Ilustración 8. Características morfológicas de las bacterias extremófilas YEFP-C1.

Esta bacteria YEFP-J2 presenta una morfología convexa con bordes ondulares de color crema con forma circular como lo muestra la ilustración 9.

Tabla 8. Morfología colonial YEFP-J2.

Característica	Descripción
Forma	Circular
Borde	Ondulado
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Color	Crema



Ilustración 9. Características morfológicas de las bacterias extremófilas YEFP-J2.

La bacteria YEFP-P1 presenta una morfología convexa acumulada de color crema con forma irregular como lo muestra la ilustración 10.

Tabla 9. Morfología colonial YEFP-P1.

Característica	Descripción
Forma	Irregular
Borde	ondulado
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Color	Crema



Ilustración 10. Características morfológicas de las bacterias extremófilas YEFP-P1.

3.1.2 Aislamiento de cultivos puros en medio líquido

Las 3 muestras colectadas en los baños del Carmen se cultivaron en medio rico sólido, las 3 presentaron crecimiento con un pH 7, después de un tiempo de incubación de 24 horas a 50°C, así como lo muestra la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de los cultivos puros de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2.

Cepa	Crecimiento.
YEFP-P1	+
YEFP-C1	+
YEFP-J2	+

La bacteria YEFP-C1 presenta una morfología convexa acumulada de color crema con forma irregular, de superficie lisa como lo muestra la ilustración 11.

Tabla 12. Morfología colonial del cultivo puro YEFP-C1.

Característica	Descripción
Forma	Irregular
Borde	Ondulado
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Color	Crema

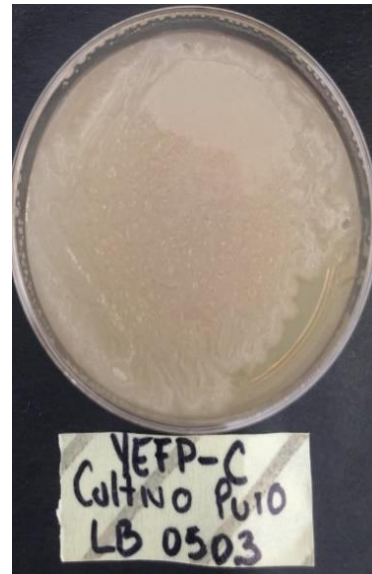


Ilustración 11. Morfología colonial del cultivo puro, YEFP-C1.

La bacteria YEFP-J2 presenta una morfología convexa acumulada de color crema con forma irregular, de superficie lisa y consistencia cremosa como muestra la ilustración 12.

Tabla 12. Morfología colonial del cultivo puro YEFP-J2.

Característica	Descripción
Forma	Irregular
Borde	ondulado
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Color	Crema

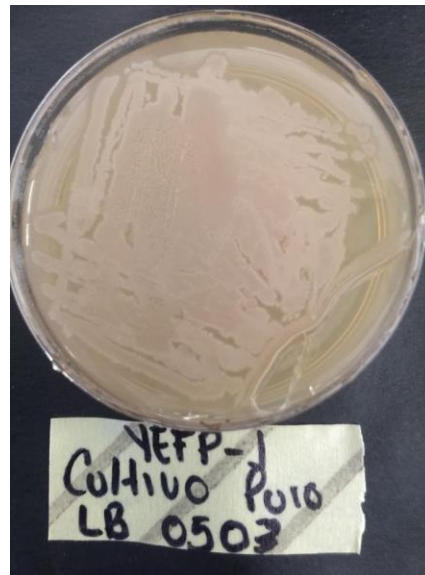


Ilustración 12. Morfología colonial del cultivo puro, YEFP-J2.

La bacteria YEFP-P1 presenta una morfología convexa de color crema con forma irregular, de superficie lisa y borde ondulado como muestra la ilustración 13.

Tabla 13. Morfología colonial del cultivo puro

YEFP-P1.

Característica	Descripción
Forma	Irregular
Borde	ondulado
Elevación	Convexo
Superficie	Lisa
Consistencia	Cremosa
Color	Crema



Ilustración 13. Morfología colonial del cultivo puro, YEFP-P1.

3.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUIMICA

3.2.1 Prueba API 20e

Los resultados de la prueba API 20E siguiendo el protocolo mencionado en el capítulo II, de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2 se presentan en la ilustración 14. La temperatura de la incubación del kit fue de 50 °C con un monitoreo de una hora constantemente hasta obtener a las 24 horas.

La presencia de enzimas o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en las galerías y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada galería con el que muestra la carta de colores de la ilustración 14. De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-).



Ilustración 14. Galerías de la prueba API 20E de las cepas colectadas de los baños del Carmen.

Tabla 14. Resultados de la prueba API 20E de las cepas colectadas de los baños del Carmen.

	YEFP-C1	YEFP-J2	YEFP-P1
ONPG	+	+	+
ADH	-	-	-
LCD	-	-	-
ODC	-	-	-
CIT	-	-	-
HIS	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-

VP	-	-	-
GEL	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	+	-	-
SOR	+	+	+
RHA	-	-	-
SAC	+	+	+
MEL	-	-	-
AMY	+	+	+
ARA	+	+	+

Las 3 cepas YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2 presentan actividad para ONPG, GLU, MAN, SOR, SAC, AMY, ARA, a diferencia de ADH, LCD, ODC, CIT, HIS, URE, TDA, IND, VP, GEL, RHA, MEL, que no tuvo actividad enzimática, e INO que solo dio positivo en la cepa de YEFP-C1.

3.2.2 Tinción de Gram

La descripción microscópica, se tomó de las 3 muestras que se realizó de las cajas ya sembradas en medio rico sólido, en el que crecieron las cepas aisladas. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 15. Resultados de tinción de Gram.

Característica	Color	Forma	Borde	Aspecto	Superficie
YEFP-P 1	Crema	Filamentosa	Liso	Mucosa	Liso
2	Crema	Filamentosa	Liso	Mucosa	Liso
3	Crema	Filamentosa	Liso	Mucosa	Liso
YEFP-C 1	Crema	Circular	Liso	Mucosa	Liso
2	Crema	Circular	Liso	Mucosa	Liso
3	Crema	Circular	Liso	Mucosa	Liso
YEFP-J 1	Crema	Filamentosa	Liso	Mucosa	Liso
2	Crema	Filamentosa	Liso	Mucosa	Liso
3	Crema	Filamentosa	Liso	Mucosa	Liso

La descripción microscópica se tomó de las muestras que se realizaron de los tubos sembrados YEFP-P1, YEFP-C1 y YEFP-J2 por triplicado en medio de cultivo LB en el que crecieron las cepas a temperatura de 50°C. La descripción de las características microscópicas se llevó a cabo según los parámetros detallados en la tabla 6 del capítulo II para las 3 cepas. Los resultados se pueden observar en la tabla 15.

Tabla 16. Resultados de la descripción microscópica.

Característica	Forma	Borde	Aspecto	Tinción Gram.
YEFP-P 1	Filamentosa	Liso	Mucosa	Positivo
2	Filamentosa	Liso	Mucosa	Negativo
3	Filamentosa	Liso	Mucosa	Negativo
YEFP-C 1	Circular	Liso	Mucosa	Negativo
2	Circular	Liso	Mucosa	Negativo
3	Circular	Liso	Mucosa	Negativo
YEFP-J 1	Filamentosa	Liso	Mucosa	Positivo
2	Filamentosa	Liso	Mucosa	variable
3	Filamentosa	Liso	Mucosa	Negativo

Se seleccionaron las cepas YEFP-P1 y YEFP-J2 que dieron positivo, donde las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglucano, pero estas no cuentan con membrana celular externa. La YEFP-C1 es Gram negativa, ya que no son capaces de retener el cristal-violeta después de la decoloración y son teñidas de rojo o rosado, y la pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglucano y una membrana celular externa, cuyo componente estructural único son los lipopolisacáridos. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Los resultados de las cepas seleccionadas se observan en la ilustración 15.

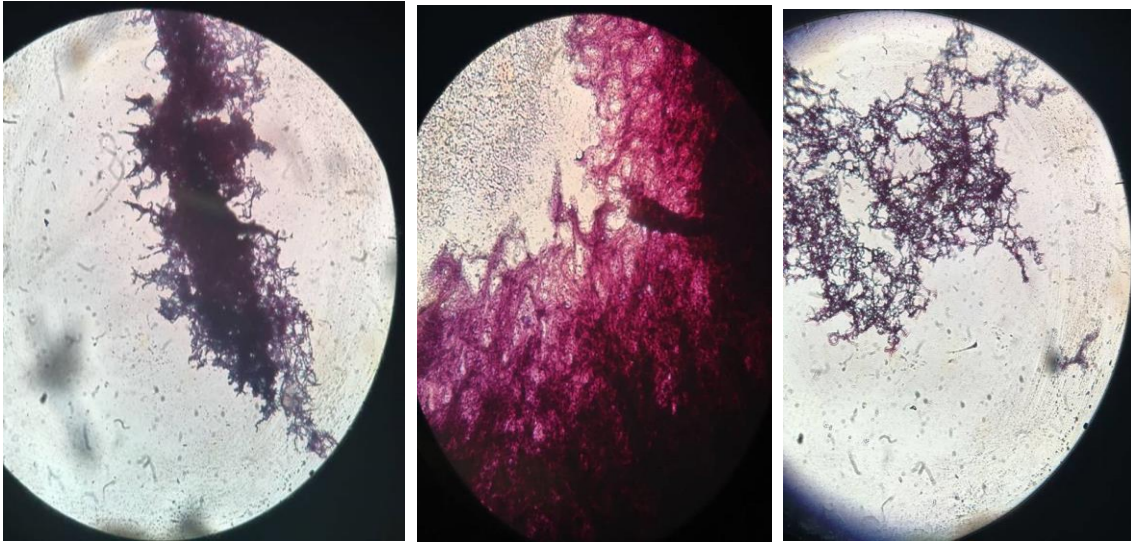


Ilustración 15. Tinción Gram de las cepas seleccionadas, YEFP-P1 (izquierda), YEFP-C1 (Centro) y YEFP-J2 (Derecha).

3.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

3.3.1 Extracción de ADN

Resultados de la extracción de ADN con el DNeasy Blood & Tissue kit (250) con técnica modificada se presentan en la tabla 16.

Tabla 17. Resultados de la extracción de ADN con kit DNeasy Blood & Tissue.

Muestra	DNA (ng/ul)	A 260/280 (ng/ul)	A 260/230(ng/ul)
YEFP-P1	173.2	1.51	0.55
YEFP-C1	83.3	1.60	0.58
YEFP-J2	199.2	1.65	0.32

Tabla 18. Tabla de rangos de la calidad del ADN (Carlos, 2010).

Radio	Valor	Pureza
A260/280	1.8- 2	ADN de pureza óptima
	1.6- 1.8	ADN pureza aceptable
	<1,6	Presencia de compuestos aromáticos
	>2.1	Contaminación con ARN
A260/230	<1,5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

La obtención de DNA fue exitosa ya que se obtuvo buena concentración de DNA.

Como se puede observar las muestras YEFP-C1, YEFP-J2, en la relación 260/280, que permite cuantificar que tantas proteínas tiene el ADN y su pureza, presentó valores de 1.6 lo que sugiere la tabla que tiene probablemente presencia de compuestos aromáticos. Para la relación 260/230, que se permite cuantificar la pureza del ADN es decir contaminantes como restos totales de aromáticos, proteínas y fenoles. Se determinó para estas muestras valores de 0.55 lo que sugiere la tabla que probablemente tiene presencia de sales, carbohidratos, fenoles, proteínas. Y comparado a lo que dicen los valores determinados las muestras son de baja calidad.

Para la muestra YEFP-P1 la concentración de DNA es más alta comparado con las 2 anteriores, sin embargo, el nivel de pureza es menor.

3.3.2 Electroforesis

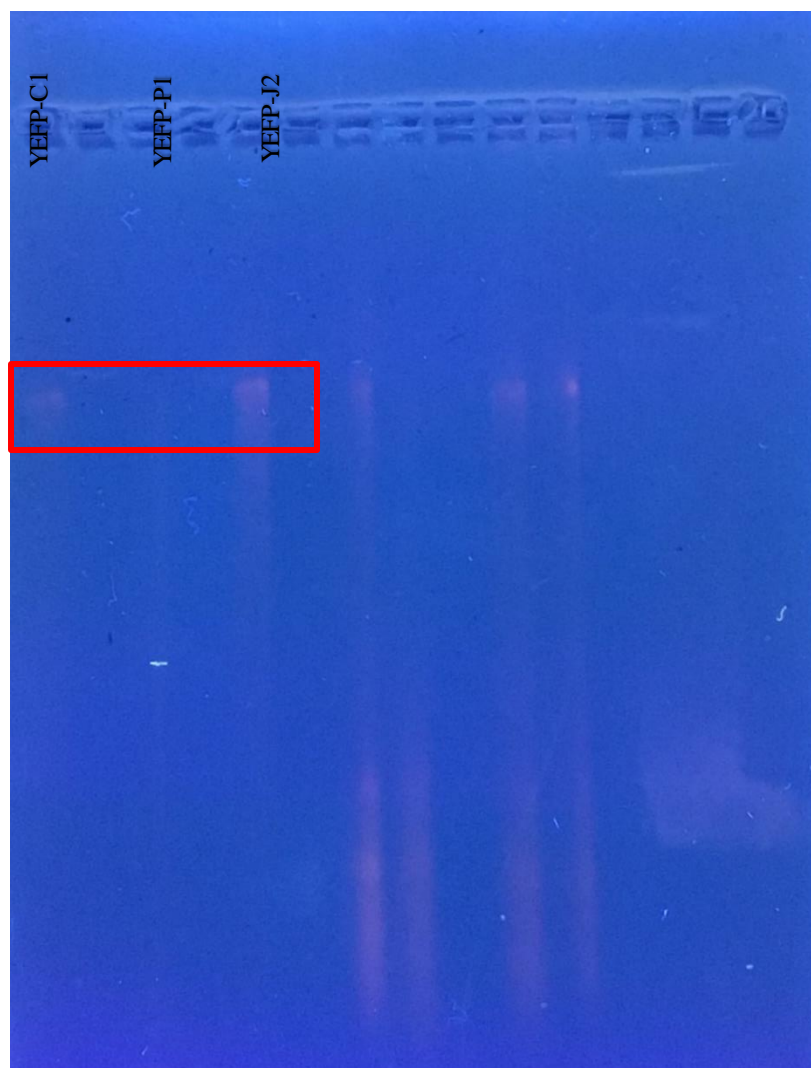


Ilustración 16. Electroforegrama en gel de agarosa al 1% de ADN de las muestras YEFP-P1, YEFP-C1, YEFP-J2.

El Electroforegrama presentada en la ilustración 16, se puede observar que los fragmentos más cortos de ADN se desplazan más rápido a través de los poros de la matriz del gel que los fragmentos más grandes. Después de un tiempo que se luyo el gel, los fragmentos más cortos de ADN estaban más cerca del extremo positivo del gel y los más largos se mantenían cerca de los pozos. Y como se muestra en la ilustración hay presencia de ADN de alto peso molecular, y la cepa YEFP-P1 tiene mayor cantidad que las otras 2 cepas, que es congruente con la tabla 16 de la extracción de ADN.

Capítulo IV

4.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las cepas extremófilas obtenidas crecen a una temperatura de 50°C y pH de 9.

Se utilizaron técnicas dependientes de cultivo para obtener cepas puras aisladas de las muestras de la fuente termal.

Sí se obtuvo ADN de las bacterias extremófilas confirmadas también por la electroforesis.

En el estado de Chiapas no se ha reportado un trabajo similar al presente, sin embargo, se ha registrado que en el lago de los baños del Carmen efectivamente hay bacterias y son extremófilas.

4.1.1 Recomendaciones

Producir y extraer las enzimas para estudiarlas y emplearlas en aplicaciones industriales en el campo biotecnológico lo que permitirá obtener avances científicos.

Es necesario realizar un análisis de agua para obtener las características fisicoquímicas de la fuente termal, lo que nos brinda información del metabolismo de los microorganismos presentes y el tipo exacto de ecosistema en el que se desarrollan.

4.2 COMPETENCIAS REALIZADAS Y/O DESARROLLAS

Las competencias que se realizaron muy aparte de los conocimientos sobre el crecimiento y vida de las bacterias extremófilas, se desarrolló la habilidad de poder aprender a usar algunos equipos con los cuales no habíamos trabajado por ejemplo la NanoDrop, la centrifuga, la autoclave, las micropipetas, el espectrofotómetro, el microscopio, las incubadoras, la cámara de electroforesis. Aprendimos técnicas como por ejemplo la obtención de cultivos Axénicos, la extracción de ADN, electroforesis. Además, el trabajo en equipo que es fundamental para la formación del ingeniero bioquímico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES

Ausebel,

F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2002). SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Hoboken: WILEY.

Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S. M., Siddiqui, K. S., and Williams, T. J. (2011). Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. Microbial biotechnology. 4(4): 449-460.

Carlos. (2010). PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS. BANCO NACIONAL DE ADN, 6.

Constantino López, J. L., Reyes Urbina, J., & Ikarus. (2012). Baños del Carmen. Llenate de Chiapas MAGAZINE, 56.

Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., and Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: lipases. African Journal of Biotechnology 9(31): 4836-4844.

Jia, B., Cheong, G. W., and Zhang, S. (2013). Multifunctional enzymes in archaea: promiscuity and moonlight. Extremophiles. 17(2): 193-203.

Luis SBM, Altava B. Introducción a la química orgánica. Universitat Jaume; 1997.

Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.

Madigan, M. T. y otros (2003): *Brock: Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Prentice Hall Inc, Madrid.

Madison BM. *Application of stains in clinical microbiology*. *Biotech Histochem*. 2001; 76: 119-125.

Prescott, L.M., Harley J. P. y Lein D.A. 2002. *Microbiología* 5º Ed. McGraw- Hill interamerica.

QIAGEN. (2006). *DNeasy Blood & Tissue Handbook*. *DNeasy Blood & Tissue Kit* (250), 62.

Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.

Ramírez D., N., Serrano R., J. A., & Sandoval T., H. (Julio-} de 2006). *Microorganismos extremófilos Actinomicetos halófilos en México*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 17.

Rodríguez, S. M. (2009). *Estudio Epidemiológico-Molecular de la prevalencia de candida spp., en mujeres de la ciudad de Tuxtla gutierrez, Chiapas*. (Tesis Maestría) Universidad Autonoma de Chiapas. Tuxtla Gutierrez, Chiapas.

Sanguiné., A. M. (2013). *Características Fenotípica y genotípica de cepas de Anoxybacillus aisladas en leche en polvo comercial*. *Facultad de ciencias.*, 75.

Sarmiento, F., Peralta, R., and Blamey, J. M. (2015). *Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3: 148.

Scientific, T. (2016). *Espectrofotómetros micro-UV/Vis NanoDrop*. *NanoDrop One*, 342.

Stainer, R., Ingrahan, J., Wheelis, M. y Painter, P. (1996). *Microbiología*. Barcelona: Reverté. 18- 2

Wetmore y Gochenour J. Bact. 72 : 79, 1986 Streengerg and Cooper Can. Med. Assn. J. 83 : 143, 1980