

# ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS FUENTES TERMALES DEL HOTEL MISIÓN COMANJILLA, GUANAJUATO, MÉXICO

Corona Venegas Brenda Maytee (1), Puy Y Alquiza María Jesús (2), Noriega Luna Berenice (3), Vázquez Lara América Yazmin (4)

1 [Licenciatura en Ingeniería en Geología, Universidad de Guanajuato] | [bm.coronavenegas@ugto.mx] (Estilo (“ADSCRIPCIÓN AUTORES” Candara, 9 pts. Color gris 50%))

2 [Departamento de Ingenierías Minas, Metalurgia y Geología, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [ ]

3 [Departamento de Ingeniería Civil, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [ ]

4 [Licenciatura en Ingenierías Ambiental en Aguas Subterráneas, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [americav399@gmail.com]

## Resumen

Se realizó un estudio a un tapete bacteriano extraído de las aguas termales ubicadas en el Hotel Misión Comanjilla, Guanajuato, México., con la finalidad de identificar la gran diversidad de los microorganismos autóctonos que se encuentran en estas fuentes termales. El proyecto consistió en observar las diversidad de bacterias que se presentan en un tapete bacteriano, usando el método de la tinción de gram para poder identificar y aislar los diversos tipos de microorganismos para después trabajar con estos sometiéndolos a diferentes pruebas (cambios de temperatura, cambios de cultivo, etc.) La observación las bacterias en microscopía óptica, en un laboratorio de Microbiología, puede realizarse por diferentes procedimientos como son la observación directa de microorganismos “in vivo” o el tratamiento con colorantes mediante tinción positiva y negativa, procesos dirigidos a incrementar el contraste y por consiguiente a optimizar el resultado.

## Abstract

A study was carried out and a selection of bacteria extracted from the hot springs located at the Mission Comanjilla Hotel, Guanajuato, Mexico, was carried out in order to identify the great diversity of the autochthonous microorganisms found in these hot springs. The project consisted of observing the differences of bacteria that occur in a bacterial tape, using the gram stain method to identify and isolate the different types of microorganisms so that they work with these subjects to different tests. of culture, etc.) The observation of bacteria in optical microscopy, in a Microbiology laboratory, can be treated by different procedures such as the direct observation of microorganisms “in vivo” or the treatment with dyes by positive and negative staining, processes aimed at increase the contrast and therefore optimize the result.

### Palabras Clave

Aguas termales; Bacterias Halotolerantes; Morfología Colonial; Enzimas Hidrolíticas; Biopolíesteres.

## INTRODUCCIÓN

En las aguas termales se pueden encontrar algas, diatomeas, rotíferos bacterívoros, protozoos y bacterias. Entre éstas últimas se encuentran: las ferrobacterias, organismos autótrofos que se hallan en las aguas ferruginosas y precisan del hierro para cubrir sus exigencias vitales; las manganobacterias, que precisan el manganeso para vivir; sulfobacterias, que intervienen en el ciclo del azufre; y bacterias halófilas, que resisten altas concentraciones de sal. Estos microorganismos constituyen la flora normal de este tipo de agua, y por tanto, el hallazgo de otras bacterias impropias de esta localización y que además son patógenas para el hombre, supone una contaminación exógena del agua que la convierte en no potable. [5]

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc. Las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas, proceso llamado fijación. Para bacterias, la fijación por el calor es lo más corriente, aunque también puede fijarse con sustancias químicas como formaldehído, ácidos y alcoholes. Después de la fijación, si se añade el colorante, no se producen ulteriores cambios estructurales en el protoplasma. La fijación se realiza habitualmente en células que han sido fijadas sobre un portaobjetos, tratando después éste con el agente fijador, y siguiendo inmediatamente el proceso de tinción. La fijación produce habitualmente el encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que es realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

La tinción es un método sencillo para incrementar el contraste entre la célula y su entorno y por lo tanto contribuye a mejorar la imagen observada. Las técnicas de tinción con diversos colorantes facilitan la observación al aumentar notablemente el contraste. En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación, procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3 (5): 15-38, 2010 ISSN: 1989-3620 16 diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química. La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias. Este procedimiento consiste en pasar el portaobjetos, con la suspensión bacteriana extendida y seca, a través de una llama de un mechero. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, folmaldehido y ácido acético entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares. [1]

Así también los microorganismos tienen características especiales útiles para la producción de metabolitos y enzimas. Para la aplicación y elaboración de productos alimenticios y dietéticos, biosíntesis de nuevos productos, formulación de detergentes, así como síntesis de fármacos enantioméricamente puros, biodegradación de residuos tóxicos y bioclásticos. [3]

A partir de los beneficios que se obtienen en el estudio de las fuentes de aguas termales y los organismos unicelulares en la actualidad, nació la inquietud de la comunidad científica por realizar un estudio a las aguas termales que tenemos en el estado de Guanajuato con el fin de evaluar las bacterias que pueden servir a las industrias que requieren procesos tecnológicos eficientes y limpios que soporten temperaturas y pH extremos, es por ello que, el aislamiento de nuevos microorganismos de estos ambientes o sus enzimas constituye una alternativa para la obtención de bacterias con características particulares para atender la creciente demanda del mercado biotecnológico. [4]

Los recientes estudios ecológicos sobre la microbiota de manantiales termales han cambiado nuestra visión de la biodiversidad microbiana y de su composición, estructura y función. En los últimos años se han descrito varios tipos de comunidades microbianas 154 Panorama actual de las Aguas Minerales y Minero-medicinales en España Adobe InDesign en diferentes manantiales calientes (Ward et al.1998) y se han aislado un gran

número de nuevas bacterias termófilas (Stetter, 1996). Estos aspectos generales se han incrementado con estudios sobre la aplicación de estos microorganismos en la biotecnología, debido a la alta resistencia al calor de sus enzimas. [2]

Es así que el objetivo de este estudio fue tener una visión de la gran diversidad de microorganismos que viven en estas fuentes termales así como el aislar y desarrollar cepas microbianas que puedan tener un fin biotecnológico

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de microorganismos.** Se recolectaron muestras de aguas termales del Hotel Misión Comanjilla, Guanajuato, México, se transportaron al laboratorio y se guardaron en refrigeración. Con las muestras se realizaron tinciones de Gram para poder observar con ayuda de un microscopio los diferentes tipos de bacterias que se encuentran en estas fuentes termales.

**Tinción de Gram.** La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico y con el que el estudiante debe estar perfectamente familiarizado. Su utilidad práctica es indiscutible y en el trabajo microscópico de rutina del Laboratorio de Microbiología las referencias a la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos, negativos, etc) se basan justamente en la tinción de Gram. Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, gram-positivas y gram-negativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrica, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias). Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares.

**Bacteria Gram Positiva** Tiene una capa gruesa de peptidoglicano (mureina) y dos clases de ácidos teicoicos. Ácido Lipoteicoico que está en la superficie, empotrado en la capa de peptidoglicano y unido a la membrana citoplásmica. Y ácido teicoico de la Pared que está en la superficie y se une sólo a la capa de peptidoglicano. El ácido Teicoico es el responsable del determinante}

**Bacteria Gram Negativa:** Tiene una capa delgada de peptidoglicano (mureina) unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido. En el lipopolisacárido, la porción de lípido está embebida en el fosfolípido y el antígeno O polisacárido está en la superficie. El lípido se llama Lípido A y es tóxico, pero el lipopolisacárido entero se llama Endotoxina. La pared de la célula tiene poros llamado Porines para el transporte de sustancias de peso molecular bajo. Entre la membrana citoplásmica y la pared celular hay un espacio periplásmico con enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibióticos y proteínas de transporte.

**Preparación de un Frotis (Tinción de Gram):** Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una gota del material que se va a teñir. El material se frota directamente sobre el portaobjetos, donde puede visualizarse con facilidad. (IMAGEN 1).

El material colocado en el portaobjetos se deja secar al aire o bien se pasa varias veces por la zona azul de la llama de un mechero de Bunsen hasta que el vidrio esté tan caliente que moleste al tacto pero no queme. (IMAGEN 2).



**IMAGEN 1:** Aquí se muestra con se coloca la muestra en el portaobjetos con ayuda de un asa.



**IMAGEN 2:** En esta imagen se puede observar la distancia a la que se exponían las láminas con la muestra.

A continuación se tiñe la muestra por coloración de Gram.

Se le adiciona cristal violeta por un minuto, escurrir el colorante y lavar con agua destilada. (IMAGEN 3)



**IMAGEN 3:** Podemos ver cómo es que se realizaba las tinciones.



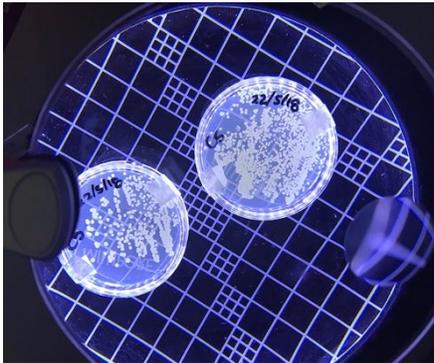
**IMAGEN 4:** En esta imagen podemos ver el microscopio que utilizamos para observar los portaobjetos con la muestra.

Se le agrega lugol por un minuto, después se lava suavemente con un chorro de agua destilada, se pone el frotis en forma vertical y usando un fondo blanco, decolorar añadiendo gota a gota alcohol-cetonico durante 10 o 15 segundos, el momento exacto para terminar la decoloración con agua es cuando dejan de fluir “hilos de colorante” por el frotis. Este es el paso crítico de la tinción, lavar inmediatamente con un chorro de agua suave.

Se le agrega safranina por un minuto, después se lava suavemente con un chorro de agua destilada hasta que quede sin colorante.

Una vez que la preparación está totalmente seca, observar con ayuda del microscopio (IMAGEN 4) en los objetivos de 10, 45, y 100x, poniendo en este último el aceite de inmersión.

Después se procedió a aislar los diferentes tipos de morfologías bacterianas que se encontraron en las muestras de agua. Luego, se sembraron alícuotas de 0,1 ml de las diluciones en agar tripticasa de soya conteniendo cloruro de sodio 5% a 37°C durante 24 horas. Los aislados fueron seleccionados según tamaño, color y consistencia de las colonias [IMAGEN 5,6]. Para la determinación del tipo de pared celular y forma bacteriana se utilizaron cultivos frescos de 14 h. Pruebas fisiológicas. Los aislados se inocularon en caldo tripticasa de soya conteniendo cloruro de sodio 0, 5, 10, 15 y 20%. Luego, los cultivos bacterianos se incubaron aprox 37°C por 24 h, la densidad celular se determinó por espectrofotometría a 600 nm. Para determinar el pH óptimo de crecimiento se utilizó el caldo tripticasa de soya cuyo pH fue ajustado a 6,0; 7,0 y 8,0 con NaOH 1N o HCl 1N. Del mismo modo, se determinó la temperatura óptima. s una descripción puntual y concreta, ajustada a la investigación realizada, la cual debe ser congruente con el objetivo e hipótesis planteados en el estudio realizado.



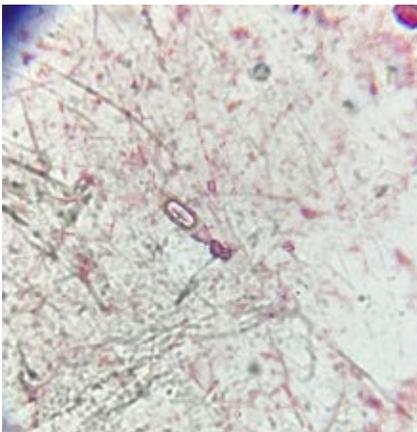
**IMAGEN 5:** En esta imagen se muestra un cultivo de bacterias que presenta una colonia muy abundante.



**IMAGEN 6:** En esta imagen podemos observar un cultivo de bacterias con un color naranja y un crecimiento diferente a la otra colonia.

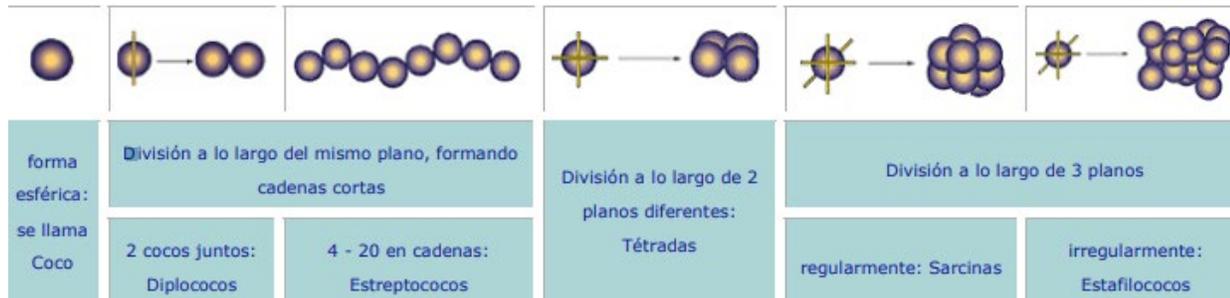
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras que se tomaron del tapete bacteriano para trabajar con ellas usando el método de la tinción de gram se visualizaron las morfologías más básicas y también podemos encontrar algunas diatomeas. [IMAGEN 5]



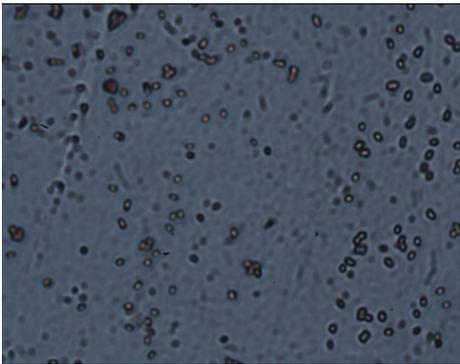
**IMAGEN 5:** En la imagen se puede observar que en la muestra del tapete también se pueden encontrar diatomeas.

Cocos: Micrococos, aparecen aislados y dispersos tras la división celular. Diplococos, aparecen por pares. Estreptococoss, tienden a unirse formando cadenas. Estafilococos, aparecen en grupos irregulares, a veces de gran tamaño. (IMAGEN 6,)

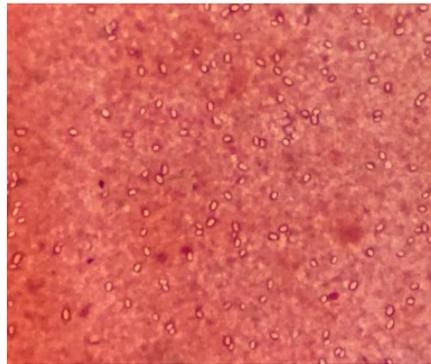


**IMAGEN 6:** Se pueden observar las diversas formas en las que se presentan los cocos.

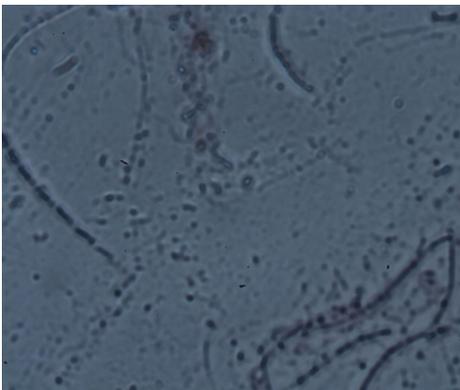
Bacilos: grandes variaciones morfológicas: fusiformes, estreptobacilos, cocobacilos. (IMAGEN 6)



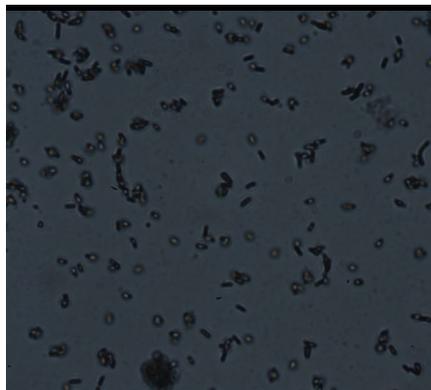
**IMAGEN 7:** En la imagen podemos observar muchos bacilos con una forma un poco ovular.



**IMAGEN 8:** Aquí observamos otra forma en la que se presentan los bacilos en la muestra.



**IMAGEN 9:** En la imagen podemos observar una una gran formación de biobacilos.



**IMAGEN 10:** En la imagen se puede observar dos formas diferentes de bacilo, unos mas largados y oreos de una forma más redondeada.



**IMAGEN 6: Variedad de formas que pueden presentar los bacilos.**

En las aguas termales existen diversos microorganismos que dependen de las características fisicoquímicas del agua, suelo, clima y región geográfica para su crecimiento y desarrollo

Las colonias de cada especie bacteriana que se aislaron mostraron que son diferentes ya sea en tamaño, color, consistencia etc., y pueden ser diferenciadas sobre estas bases. Cada colonia aislada está constituida de un solo tipo de bacterias, ya que se supone que es la descendencia de una sola célula y por tanto, un cultivo puro. Para estudiar las características físicas, químicas, fisiológicas, etc., de una bacteria, se necesita que ésta sea aislada en cultivo puro y el aislamiento en caja Petri es el primer paso para ello, siendo el segundo paso la siembra de una porción de una colonia en un medio de cultivo en tubo, verificando su pureza después de la incubación apropiada, mediante observación al microscopio. La morfología de las colonias es importante por lo anteriormente expuesto y debe familiarizarse el alumno con ella.

**Tabla 1: Características más constantes que llegan a presentar las colonias de bacterias**

Características de las Morfologías de las Bacterias	
1. Forma	Puntiforme, circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide, etc.
2. Tamaño	: Estimar el diámetro en mm.
3. Superficie	Lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos, etc.
4. Elevación	Aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, umblicada, etc.
5. Borde	Continuo, ondulado, lobulado, erosionado, festoneado, filamentoso, etc.
6. Estructura Interna	Amorfa o granulosa.
7. Color	Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser de color blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.
8. Opacidad	Transparente, opaca, etc.
9. Consistencia	Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc. Usar el asa bacteriológica para determinar la consistencia.

## CONCLUSIONES

De las aguas termales del Hotel Misión Comanjilla, Guanajuato, México estudiadas se encontró poseen una gran diversidad microbiana Sin embargo, se observa una cierta relación entre algunos microorganismos y las aguas con características fisicoquímicas más extremas de pH, temperatura, salinidad y radiactividad. De las aguas termales se aislaron por lo menos 2 tipos de bacterias halotolerantes, la mayoría es Gram negativas

De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró inferir que de las muestras estudiadas del tapete bacteriano se puede trabajar con algunas de las bacterias que se lograron cultivar en las cepas para la realización de pruebas que puedan comprobar su uso en la industria de la biotecnología.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dirección de apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la oportunidad brindada para realizar el verano de investigación en el Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología. A la Dr. María Jesús Puy Y Alquiza por permitirme tener la oportunidad de colaborar en su programa de investigación Y América Yazmin Vázquez Lara por su apoyo en el trabajo de las bacterias en el laboratorio.

Finalmente, un enorme agradecimiento a mi mamá de quien recibí el apoyo incondicional para ser parte de este proyecto.

## REFERENCIAS

- [1]Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias Covadonga Vázquez. Ana Martín. M<sup>a</sup> Isabel de Silóniz. Susana Serrano. Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. C/José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.
- [2]DIVERSIDAD MICROBIANA DE LAS AGUAS MINERALES TERMALES M<sup>a</sup> del Carmen DE LA ROSA JORGE y M<sup>a</sup> Ángeles MOSSO ROMEO Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid
- [3]SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO Yolanda GONZÁLEZ GARCÍA, Juan Carlos MEZA CONTRERAS, Orfil GONZÁLEZ REYNOSO y Jesús Antonio CÓRDOVA LÓPEZ Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara.
- [4]BACTERIAS HALOTOLERANTES PRODUCTORAS DE HIDROLASAS AISLADAS DE AGUAS TERMALES DE TARAPOTO - PERU Halotolerant bacteria producing hydrolytic enzymes isolated from hot springs from Tarapoto - Peru Jackelyn E Borja, Amparo I Zavaleta, Víctor Izaguirre Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú
- [5]Vendrell, M. C.; Sinde, E.; Torres, M.; Gil, P.; Rodríguez, L. A. Estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de o tinteiro en ourense Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol. 2, núm. 2, diciembre, 1998, pp. 92-95 Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México