



Aislamiento y caracterización microbiológica de microorganismos tolerantes y/o resistentes a manganeso presentes en sedimento de la presa de la Purísima, Guanajuato.

Negrete-Ortíz Jorge Alberto¹; Márquez-Lucio María Azucena¹ y Alejo-Iturvide Francisco¹

¹ Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería Bioquímica, albertngret@gmail.com

¹ Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Ingeniería Bioquímica, zucet01@gmail.com

¹ Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Departamento de Licenciatura en Biología, fralejo04@gmail.com

Resumen.- El presente documento da a conocer el trabajo de investigación realizado en sedimentos de un cuerpo de agua ubicado en la comunidad La Purísima en el Estado de Guanajuato, el cual tiene como principal objetivo, aislar y caracterizar la microbiota autóctona del sedimento. El estudio se enfoca en la presencia del manganeso (Mn) en el sedimento y en la capacidad de supervivencia, así como de los posibles mecanismos de tolerancia y/o resistencia que tienen los microorganismos autóctonos. Se realizaron aislamientos y se evaluó el metabolismo de los aislados, así como ensayos que indican la concentración mínima inhibitoria (CMI) en partes por millón (ppm) de Mn.

Palabras clave.- Aislados, Autóctonos, Caracterizar, Concentración mínima inhibitoria (CMI), Cuerpo de agua, Manganeso, Partes por millón (ppm), Presa de La Purísima, Resistencia, Sedimento, Tolerancia.



Introducción

Con el crecimiento de la industria se ha presentado un aumento considerable en la descarga de desechos industriales al medio ambiente, principalmente suelo y agua, lo que ha conllevado a la acumulación de metales pesados, especialmente en áreas urbanas. (Ruchita Dixit, y otros, 2015)

La contaminación de sedimentos y cuerpos receptores de aguas con metales pesados es un problema ambiental importante en todo el mundo. La presencia de metales pesados en el ambiente generalmente induce cambios morfológicos y fisiológicos en las comunidades microbianas. No obstante, los ambientes contaminados son fuentes también de microorganismos metal-resistentes. (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009), por lo que son sitios con enormes posibilidades de encontrar microbiota nativa que pueda ser útil en el desarrollo de nuevos métodos de biorremediación.

Los metales juegan un rol integral en los procesos de vida de los microorganismos. Algunos de estos metales fungen como nutrientes esenciales. Por otro lado, existen metales que simplemente no cuentan con un rol biológico en la célula. El calcio, cobalto, cromo, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio, níquel y zinc juegan roles biológicos esenciales en la célula. Sin embargo, a altas concentraciones cualquier metal es considerado como tóxico para los microorganismos (Bruins, Kapil, & Oehme, 2000). La concentración intracelular de iones de metales pesados debe controlarse estrechamente y la resistencia a metales pesados es solo un caso específico de la demanda general de cada célula viva de algún sistema de homeostasis de metales pesados. No obstante para tener cualquier efecto fisiológico o tóxico, la mayoría de los iones de metales pesados tienen que entrar en la célula (Nies, 1999).

El manganeso (Mn) es un abundante metal de transición que se sabe experimenta ciclos de oxidación y reducción bioquímicos en sistemas de agua dulce y marinos. El manganeso soluble, Mn (II), se puede encontrar en fuentes de agua dulce debido a las reacciones de intercambio de electrones que tienen lugar en presencia de bacterias reductoras de metales en condiciones anóxicas en la

Vol. 6 (2019) 7º Encuentro de Jóvenes Investigadores



interfaz agua/sedimento (Falkinham, y otros, 2010). Por otro lado, el manganeso es uno de los contaminantes más abundantes en aguas superficiales y subterráneas, teniendo mayor presencia en estas últimas (Kouzbour, y otros, 2017). A pesar de los procesos biológicos en los cuales se encuentra involucrado el manganeso, el exceso de este metal desordena inevitablemente el metabolismo celular. Su toxicidad puede estar indicada por la CMI que se define como la concentración más baja para inhibir completamente el crecimiento celular. Existe información reportada que la CMI de Mn^{2+} es inferior a 30 mM, por ejemplo en algunos microorganismos como *Escherichia coli* es de 20 mM, para un *Bacillus circulans* una concentración de 24 mM y para *Sacharomyces cerevisiae* se ha reportado 10 mM (Shao & Sun, 2007).

Objetivo general

Aislar y caracterizar microorganismos autóctonos de sedimentos tomados de la presa de La Purísima, Guanajuato.

Objetivos específicos

- Aislar microorganismos autóctonos en diferentes puntos de los sedimentos presentes en la presa de La Purísima.
- Caracterizar la morfología y el metabolismo de los aislados.
- Realizar un antibiograma a los aislados.
- Evaluar la CMI en ppm para los aislados en presencia de Mn.

Justificación

La calidad y disponibilidad del agua de los ríos en México resulta ser un tema de gran relevancia en la actualidad debido al impacto que tiene en el desarrollo regional y nacional, sin embargo, los problemas en este sector son graves. La presencia de metales pesados en el ambiente generalmente induce a cambios morfológicos y fisiológicos en las comunidades microbianas. (Ezzouhri, Castro, Moya, Espinola, & Lairini, 2009)

El manganeso es importante para la defensa contra el estrés oxidativo, especialmente en bacterias Gram-positivas, además de que la adquisición de

Vol. 6 (2019) 7º Encuentro de Jóvenes Investigadores



manganeso ha demostrado ser crucial para la supervivencia y la virulencia de algunos géneros de enterobacterias, ya que en exceso, los iones de metales de transición son tóxicos para la célula y por lo tanto, las bacterias han desarrollado sistemas sofisticados que detectan el exceso de iones de metales de transición y los eliminan por el flujo de la célula o el secuestro del exceso de iones metálicos dentro de ellas (Turner, y otros, 2015).

Metodología

A. Toma de muestra

El muestreo se realizó de acuerdo con lo establecido en la norma mexicana NMX-AA-014-1980. Cuerpos receptores. Muestreo (Diario Oficial de la Federación, 2010). La Tabla 1 muestra las coordenadas de los puntos que fueron muestreados.

Tabla 1. Localización geográfica de los puntos de muestreo en la Presa la Purísima

Punto de muestreo	Geoposicionamiento
1	N:20° 53' 42.0" W:101° 16' 45.5"
2	N:20° 53' 31.7" W:101° 16' 47.5"
3	N:20° 53' 18.2" W:101° 16' 48"
4	N:20° 53' 0.6" W:101° 16' 50.8"

B. Aislamiento de los microorganismos a partir de las muestras.

El aislamiento se realizó por banco de diluciones seriadas a partir de las muestras de sedimento. Se tomaron 10 gr de sedimento y se añadieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 90 ml de agua peptonada previamente esterilizada. El sistema de dilución seriada consistió en adicionar 9 ml de agua peptonada y 1 ml de la solución madre hasta lograr una dilución de 10^{-4} para posteriormente inocular las placas de Petri. Se adaptó un medio de cultivo denominado yeast-peptone-glucose (YPG) propuesto por (Hurst, y otros, 2007), dentro de su composición, cuenta con cloruro manganeso ($MnCl_2$), lo cual hace más fácil la identificación de



cepas tolerantes y/o resistentes al manganeso. Se adicionó 200 ppm de manganeso a las placas de Petri con medio YPG.

C. Caracterización morfológica, pruebas bioquímicas y antibiograma

Una vez aislada la cepa con la capacidad de tolerar la presencia de $MnCl_2$ se estudiaron las características morfológicas, se realizó una tinción diferencial de Gram, pruebas bioquímicas y un antibiograma siguiendo la técnica de Kirby-Bauer (R. & Guzman U., 1984)

D. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Una vez realizada la caracterización morfológica y bioquímica se cultivó la cepa en el mismo medio definido YPG, bajo diferentes concentraciones de Mn (300, 500, 1000, 2000, 3000 y 3500 ppm), partiendo de una concentración inicial usada para el asilamiento preliminar (200 ppm). Para este ensayo se preparó una solución madre de $MnCl_2$ al 1M.

Resultados

A. Toma de muestra

En la Figura 1 se muestra el muestreo de acuerdo a la NMX-AA-014-1980. Cuerpos receptores. Muestreo. Para ello se empleó una draga sumergiéndose a diferentes profundidades (Tabla 2), colectando el material en recipientes estériles de 1Lt.



Figura 1. Colecta de sedimento, empleando una draga.



Tabla 2. Tabla resumen del muestreo en la presa de La Purísima, Guanajuato.

Punto de muestreo	Geoposicionamiento	Profundidad	Temperatura
1	N:20° 53' 42.0" W:101° 16' 45.5"	5.9 metros	23°C
2	N:20° 53' 31.7" W:101° 16' 47.5"	7.9 metros	22°C
3	N:20° 53' 18.2" W:101° 16' 48"	11 metros	22°C
4	N:20° 53' 0.6" W:101° 16' 50.8"	12.5 metros	22°C

B. Aislamiento los microorganismos

El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo partiendo de diluciones seriadas y resiembras de aquellas placas cuyas unidades formadoras de colonias (UFC) fueran representativas. En la Figura 2 se observan las muestras de sedimento procesadas en matraces Erlenmeyer de 250 ml. La Figura 3 muestra las placas cuyas UFC fueron representativas del crecimiento microbiano y la Figura 4 muestra las placas resembradas partir de las placas de la Figura 3. La Figura 5 muestra aquellas placas que se resembraron a partir de las placas mostradas en la Figura 4. En esta resiembra se selección solo una de las dos placas debido a que la característica morfológica en ambas indicó la misma morfología. La Figura 6 muestra la resiembra final y un ejemplo de una placa con la técnica de sembrado masivo para apreciar la coloración de la cepa.



Figura 2. Matraces Erlenmeyer con las muestras de sedimento en agua

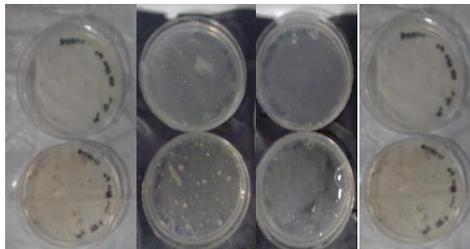


Figura 3. Placas Petri inoculadas a partir de diluciones; Placas representativas con mayor formación de UFC



Figura 4. Resiembra de las placas con mayor UFC



Figura 5. Resiembra de los aislados en medio YPG; selección de una sola placa.



Figura 6. A) Última resiembra en medio YPG; B) Ejemplo de coloración marrón en medio, técnica estriado en masivo

Caracterización morfológica, pruebas bioquímicas y antibiograma

Para poder evaluar la morfología del aislado se tomó en cuenta la última resiembra de manera que las observaciones macroscópicas que se aprecian en las placas son las siguientes: morfología colonial circular color blanco, sin embargo, en presencia de $MnCl_2$ el color de la colonia y el medio se torna marrón pasadas las 48 horas de incubación, las colonias crecen de manera lisa, con una elevación plana y bordes enteros, poseen una consistencia cremosa y el paso de luz sobre la placa se torna opaco.

De igual manera la evaluación microscópica (Figura 7) se realizó a partir de la última resiembra obteniendo una tinción diferencial Gram-positiva y formas esféricas (cocos).

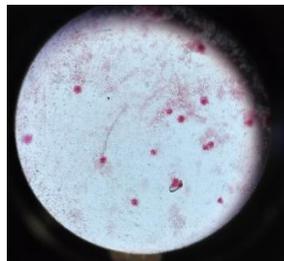


Figura 7 Vista microscópica de una tinción diferencial Gram-positiva; formas esféricas.

La siguiente tabla (Tabla 3) resume la batería de pruebas bioquímicas realizadas a los aislados: El aislado presenta actividad enzimática para oxidar dextrosa pero no oxida ni fermenta tanto sacarosa como maltosa. Tiene la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono, es un microorganismo flagelado ya que presenta movilidad en los medios SIM y MIO, no es productor de indol pero si de ornitina y pasadas 48 horas de incubación produce ácido sulfúrico. No es productor de las



enzimas oxidasa, catalasa, ureasa, fenilalanina desaminasa. Es fermentador de dextrosa y lactosa. En la Figura 8 se muestran las placas con el antibiograma realizado a los aislados, a su vez en la Tabla 4 se resumen los antibióticos probados para este ensayo así como las concentraciones usadas.

Tabla 3 resumen de los resultados de la batería de pruebas bioquímicas realizadas en los aislados

Prueba	Tubo				
	1	2	3	4 C+	5 C-
Caldo básico	A	A	K	K	K
rojo fenol					
Citrato de Simmons	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Oxidación / Fermentación					
Dextrosa	Oxidativo no fermentador	Oxidativo no fermentador	Oxidativo no fermentador	No oxidativo / No fermentador	No oxidativo / No fermentador
Sacarosa	No oxidativo / No fermentador				
Maltosa	No oxidativo / No fermentador				
Reacción Ureasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reacción Vogues-Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reacción rojo de metilo	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Fenilalanina desaminasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
SIM					
Sulfuro	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Indol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Movilidad	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
MIO					
Movilidad	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Indol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ornitina	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
TSI	K/A	K/A	K/A	(-)	(-)
LIA	K/K/H ₂ S	K/K/H ₂ S	K/K/H ₂ S	(-)	(-)
Kliger	A/A/ H ₂ S	A/A/ H ₂ S	A/A/ H ₂ S	(-)	(-)
MacConkey	Lactosa positiva	Lactosa positiva	Lactosa positiva	(-)	(-)
Oxidasa	Negativo				
Catalasa	Negativo				

*C+; control positivo (expuesto), *C-; control sin inocular, *A = ácido, *K = alcalino, *(+) = positivo, *(-) = negativo, *H₂S = producción de ácido sulfúrico.



Tabla 4 Resultados del antibiograma (Multidiscos combinados)

Antibiótico	Concentración (µg)	Sensible	Resistente
Amikacina (AK)	30 µg		
Ampicilina (AM)	10 µg	S	
Cefalotina (CF)	30 µg	S	
Ceftriaxona (CFX)	30 µg	S	
Cloranfenicol (CL)	30 µg		R
Dicloxacilina (DC)	1 µg	S	
Enoxacina (ENX)	10 µg		R
Eritromicina (E)	15 µg		R
Gentamicina (GE)	30 µg		R
Netilmicina (NET)	30 µg		R
Penicilina (PE)	10 U		R
Trimetiprim-Sulfametoxazol (STX)	25 µg		R



Figura 8 Placas con antibiograma vistas frontal y trasera.



C. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria

Los ensayos para determinar la CMI se llevaron a cabo en medio YPG. Las Figuras 9,10 y 11 respectivamente muestra una coloración marrón aparente lo cual puede aseverar dos cosas: a) el manganeso esta siendo oxidado por los aislados y b) Los aislados excretan alguna sustancia que le confiere esta coloración al medio. La concentración mínima inhibitoria es de 3500 ppm (Figura 14).

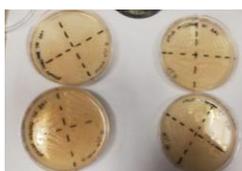


Figura 9 Medio YPG adicionado con 300 ppm de Mn^{+2}



Figura 10 Medio YPG adicionado con 500 ppm de Mn^{+2}



Figura 11 Medio YPG adicionado con 1000 ppm de Mn^{+2}



Figura 12 Medio YPG adicionado con 2000 ppm de Mn^{+2}



Figura 13 Medio YPG adicionado con 3000 ppm de Mn^{+2}



Figura 14 Medio YPG adicionado con 3500 ppm de Mn^{+2}

Conclusiones

Los resultados de la batería de pruebas bioquímicas realizadas a los aislados permiten conocer su metabolismo, así como, inferir el posible género del microorganismo: *Salmonella*, *Proteus* y *Enterobacteriaceae*. El antibiograma realizado a los aislados indica que es una bacteria resistente a 7 antibióticos. Por otro lado la evaluación de la CMI nos permite conocer que la bacteria es altamente tolerante y/o resistente a manganeso con la posibilidad de oxidar el manganeso. Esto es relevante para futura investigaciones ya que desde la perspectiva de bioprospección podría ser usada la capacidad que tiene en procesos de biorremediación.



Referencias

Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198-207.

Diario Oficial de la Federación. (16 de 11 de 2010). Obtenido de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010

Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F., & Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 35-48.

Falkinham, J. O., Dietrich, A. M., Knocke, W. R., Cerrato, J. M., McKinney, C. W., & Pruden, A. (2010). Manganese-oxidizing and -reducing microorganism isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. *Water Research*, 3935-3945.

Hurst, C. J., Crawford, R. L., Mills, A. L., Garland, J. L., Stetzenbach, L. D., & Lipson, D. A. (2007). *Manual of Environmental Microbiology: Third Edition*. Washington, DC. USA: ASM Press.

Kouzbour, S., Azher, N. E., Gourich, B., Gros, F., Vial, C., & Stiriba, Y. (2017). Removal of manganese (II) from drinking water by aeration process using an airlift reactor. *Journal of Water Process Engineering*, 233-239.

Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Springer-Verlag*, 730-750.

R., M. B., & Guzman U., M. (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *BIOMEDICA*, 112-121.

Ruchita Dixit, W., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., . . . Paul, D. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, 2189-2212.

Shao, Z., & Sun, F. (2007). Intracellular sequestration of manganese and phosphorous in a metal-resistant fungus *Cladosporium cladosporioides* from deep-sea sediment. *Springer*, 435-443.

Vol. 6 (2019) 7º Encuentro de Jóvenes Investigadores



Turner, A. G., Ong, C.-I. Y., Gillen, C. M., Davies, M. R., West, N. P., McEwan, A. G., & Walker, M. J. (2015). Manganese Homeostasis in Group A Streptococcus Is Critical for Resistance to Oxidative Stress and Virulence. *mBio*.