

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS Y LEVADURAS PROVENIENTES DE LA REGIÓN GEOTÉRMICA DE “LOS AZUFRES”, MICHOACÁN

Ilse Aracely Quiñones Medina¹, Adán T. Morales Vargas² y Varinia López Ramírez³

RESUMEN

La región geotérmica de “Los Azufres”, es una zona con condiciones de temperatura y pH extremos. Por ello los microorganismos asociados al suelo y brotes de agua de la zona resultan de interés por las capacidades metabólicas que les permiten crecer en tales condiciones. En este trabajo se aislaron hongos y levaduras de al menos cuatro puntos en “Los Azufres” con el fin de determinar su diversidad. Para el aislamiento realizamos diluciones seriadas de muestras de suelo (hasta 10^{-3}), para su posterior inoculación en PDA y agar Saboraud. Se han aislado y caracterizado macroscópicamente 21 cepas cuya principal característica es la capacidad de desarrollarse a 40°C. Con estos resultados hemos iniciado un estudio adicional para explorar el potencial que presentan en el desarrollo de procesos biotecnológicos que involucren enzimas novedosas.

PALABRAS CLAVE

Diversidad microbiana, Zona geotérmica, Biotecnología.

1

^{1,2} Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. Carr. Irapuato-Silao Km. 12.5 Col. El Copal. C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. Tel. (462) 6067900.

³ Dra. Varinia López Ramírez, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Coordinación Lic. en Biología. Carr. Irapuato-Silao Km. 12.5 Col. El Copal. C.P. 36821. Irapuato, Guanajuato. Tel. (462) 6067900 Ext.141 · valopez@itesi.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos han sido ampliamente utilizados por el hombre con el fin de obtener bienes y servicios que mejoren su calidad de vida. El avance tecnológico y científico nos ha permitido conocer los microorganismos o en este caso a hongos y levaduras responsables de la obtención de diversos alimentos y antibióticos. Al mismo tiempo, generar procesos industriales que involucran microorganismos con el fin de hacer más eficientes los procesos, es decir, aumentar la producción a un menor costo y tiempo, sin embargo, el trabajar con hongos y levaduras, al ser microorganismos, implica el acondicionamiento de diversos equipos (temperatura, pH, presión, etc.). Los procesos industriales no necesariamente se optimizan con el acomodo o material de los equipos utilizados, la Biotecnología, busca explotar las características propias de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) o modificar dichas características para obtener una mayor eficiencia en la producción de bienes y servicios, para lograr esto, es necesario llevar a cabo la búsqueda de microorganismos que poseen características especiales, como la tolerancia a altas temperaturas, pH, concentración de sales, etc. Existen diversos estudios registrados de la diversidad microbiana proveniente de las zonas geotérmicas, como el realizado en el parque nacional de Yellowstone en Estados Unidos; Rehai en la provincia de Yunnan en China; la zona volcánica de Taupo en Nueva Zelanda, el sistema geotermal de Copahue–Caviahu en Argentina. (Hadlund et al., 2012; Boothroyd, 2009; Sand, 2003; Chiacchiarini et al., 2003). En estos sitios se ha encontrado una gran variedad de bacterias, hongos y levaduras termotolerantes o termófilas. Debido a las condiciones de las zonas en las que crecen estos microorganismos, han desarrollado características que les permiten vivir a altas temperaturas y pH bajos (Sand, 2003). Los Azufres es una zona geotérmica, que posee manantiales termo-minerales y suelos que se encuentran a pH ácido y alta temperatura (Arellano & Jiménez, 2012). Esta zona ha sido ampliamente estudiada para la producción de energía, sus características de conservación, los diferentes hábitats presentes y la condiciones geotérmicas son adecuadas para realizar estudios de interés biológico en dicha zona, por esto, hemos comenzado a

METODOLOGÍA

1. Obtención de la muestras

Para realizar el muestreo, se seleccionó un área o unidad homogénea (área de apariencia similar en cuanto a textura, vegetación y relieve). Una vez seleccionada la unidad, se escogió un lugar al azar, en donde se tomó la primera muestra, y a partir de ese punto se tomaron 15 sub-muestras en zigzag. Para tomar la muestra se retiraron los primeros 5 cm de superficie eliminando insectos, raíces y organismos superiores. Una vez eliminada esta capa de suelo, se cavo un pozo con una profundidad de 15 cm en forma de V con el fin de obtener una rebanada de suelo homogénea, se retiraron los costados de la rebanada y se almacenó la parte central (NOM-021-SEMARNAT-2000). Todas las sub-muestras se almacenaron a 4°C en una bolsa de polietileno previamente esterilizadas a 121°C durante 15 minutos.

2. Aislamiento

Se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada de 10^{-1} a 10^{-3} . De cada dilución se inocularon dos replicas por estriado en medio PDA y agar Saboraud, con una concentración de 5 ug/ml de cloranfenicol, posteriormente se incubaron a 40°C por un periodo de 5 a 7 días durante los cuales se observó el crecimiento de las colonias. Una vez obtenidas colonias bien definidas, estas se inocularon por duplicado utilizando un sacabocado, este procedimiento se realizó hasta obtener cultivos axénicos (Carranza, 2008; Redman et al., 1999; Arias y Piñeros, 2008).

3. Caracterización

• Macroscópica

La caracterización macroscópica se llevó a cabo mediante la observación de las características de los aislados, considerando color, relieve, tamaño y consistencia de las colonias, para el caso de levaduras, y en el caso de hongos filamentosos, se observó el tipo de micelio, color y tamaño de la colonia.

• Microscópica

La caracterización microscópica se está realizando mediante la técnica de micro-cultivo, y observaciones en fresco, para caracterizar el tipo de micelio y estructuras reproductivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación encontramos que en la zona muestreada existe un amplia diversidad de hongos y levaduras con capacidad termotolerante (Tabla 1). Aunque del primer muestreo no se obtuvieron aislados, esto debido a que la temperatura de los puntos de muestreo era muy alta (entre 65°C y 80°C) y a que las muestras se obtuvieron de sedimento y agua termal y no de suelo donde existe una mayor diversidad de hongos (Redman et al., 1999). Del segundo muestreo se obtuvieron 8 aislados, 7 del punto 5 y 1 del punto 9, del tercer muestreo se obtuvieron 6 aislados, 1 proveniente del punto 1 y los restantes del punto 6, y finalmente del cuarto muestreo se obtuvieron 9 aislados, 5 del punto 5, 3 del punto 4 y 1 del punto 3 (Tabla 1). Todos los aislados obtenidos se desarrollaron en medio PDA, mientras que en agar Saboraud no se obtuvo crecimiento posiblemente a que el pH de éste es cercano al básico y el del medio PDA es ácido, similar al que presentaba el suelo muestreado (Arellano y Jimenéz, 2012).

Tabla 1. Zonas muestreadas de la región geotérmica de “Los Azufres Michoacán”

Punto (Muestreo 1)	Coordenadas	Temperatura (°C)	Aislados obtenidos
1	Lat. 19°49.394'N Long. 100°40.065 O	75	0
2	Lat. 19°49.354'N Long. 100°40.080'O	70	
3	Lat. 19°49.342'N Long. 100°40.098'O	75	
Punto (Muestreo 2)	Coordenadas	Temperatura (°C)	Aislados obtenidos
4	Lat. 19°49.347'' N Long. 100°40.105''O	43	0
5	Lat. 19°49.337'' N Long. 100°40.105 O	35	7
6	Lat. 19°49.342'' N Long. 100°40.079''O	30	0
7	Lat. 19°49.357'' N Long. 100°40.066''O	53	0
9	Lat. 19°49.362'' N Long.	50	1

	100°90.029''O		
Puntos (Muestreo 3)	Coordenadas	Temperatura (°C)	Aislados obtenidos
1	Lat. 19°49.363 ''N Long. 100°40.610''O	42	0
2	Lat. 19°49.345 N Long. 100°40.102''O	35	0
3	Lat. 19°49.345 ''N Long. 100°40.102 O	40	0
4	Lat. 19°49.341'' N Long. 100°40.105''O	50	1
5	Lat. 19°49.355 ''N Long. 100°40.04''O	45	0
6	Lat. 19°49.353''N Long. 100°40.032''O	50	5
Puntos (Muestreo 4)	Coordenadas	Temperatura (°C)	Aislados obtenidos
1	Lat. 19°49.352''N Long. 100°40.045''O	40	0
2	Lat. 19°49.362''N Long.	40	0

	100°40.033''O		
3	Lat. 19°49.361''N Long. 100°40.045''O	35	1
4	Lat. 19°49.358''N Long. 100°40.066''O	35	3
5	Lat.19°49.342''N Long.100°40.09''O	39	5
6	Lat. 19°49.368''N Long. 100°40.106''O	45	0

Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica de los aislados se realizó por etapas dependiendo del punto y número de muestreo, para la zona 5 se obtuvieron 7 cultivos axénicos (MZ5R11.1, MZ5R11.2, MZ5R11.3, MZ5R12.1, MZ5R12.2, MZ5R12.3 y MZ5R13), y de la zona 9 se obtuvo el aislado MZ9R11. El aislado MZ5R11.1 presenta apariencia aterciopelada, en el anverso su color va de blanco (extremos) a verde en el centro y en el reverso su coloración va de blanco a verde claro.

El aislado MZ5R11.2 presenta una textura aterciopelada y una coloración que va de blanco a gris en el anverso y una coloración similar en su reverso, este aislado produce una gran cantidad de exudados transparentes y de textura viscosa. El aislado MZ5R11.3 tiene apariencia plana y presenta una coloración crema-rosácea tanto en el anverso como en el reverso de la caja.

El aislado, MZ5R12.1 muestra una textura aterciopelada con una pigmentación que va de blanca a rosa en el anverso y similar el reverso difiriendo por la aparición de zonas con pigmentación roja. El aislado MZ5R12.2 presenta una presenta una textura pulverulenta y una textura correosa en el lado anverso se observa una coloración que va de amarillo a verde al igual que en el reverso del cultivo.

El aislado MZ5R12.3 presenta una textura aterciopelada, en el lado anverso del cultivo se observa una coloración verde oscura y en el reverso una coloración negra. El aislado MZ5R13 presenta una textura algodonosa y una coloración blanca en el anverso del cultivo y una coloración marrón en el reverso. Por último el aislado MZ9R11 proveniente de la zona 9 presenta una textura algodonosa con una coloración café en el anverso del cultivo y marrón en el reverso (Figura 1).



Figura 1. Hongos aislados del segundo muestreo de la región geotérmica de "Los Azufres", Michoacán. En esta figura se pueden apreciar los aislados MZ5R12.1 (1a), MZ5R11.2 (1b) y MZ9R11 (1c).

Del tercer muestreo se obtuvieron los aislados MZ6R13.4, MZ6R22.2, MZ6R1.32, MZ6R22.1, MZ6R13.3, MZ4R21.3. El aislado MZ6R13.4 es una posible levadura que posee una coloración crema-rosa tanto en anverso como en reverso.

Los aislados MZ6R222 y MZ6R221 poseen una morfología similar, ambos presentan una textura pulverulenta y una coloración que va de blanco a gris tanto en anverso como en reverso. El aislado MZ6R132 posee una textura pulverulenta con una coloración que va de blanco a rojo tanto en anverso como en reverso.

El aislado MZ6R13.3 posee una textura pulverulenta con una coloración marrón tanto en anverso como en reverso. En el aislado MZ4R21.3 se observa una textura pulverulenta y una coloración que va de blanco a marrón tanto en anverso como en reverso.

Del cuarto muestreo se obtuvieron los aislados: MZSR13.1, MZ5R2.1, MZ5R13.3, MZ5R12.2, MZ5R13.4, MZ4R22.5, MZ5R12.3, MZ3R1.1, MZ4R22.4, MZ4R21.2. El aislado MZ5R13.1 posee una textura plana y una coloración que va de blanco a verde tanto en anverso como en reverso, el aislado MZ5R2.1 presenta una textura plana y una coloración que va de blanco a amarillo, los aislados MZ5R13.3, MZ5R12.2, MZ5R13.4 poseen las mismas características morfológicas, tienen una coloración marrón y una textura plana, el aislado MZ5R22.5 posee una textura plana y una coloración crema tanto en anverso como en reverso, el aislado MZ3R1.1 posee una textura aterciopelada y una coloración verde oscuro tanto en anverso como en reverso, el aislado

MZ4R22.4 y MZ4R21.2 muestran un crecimiento similar al de las levaduras, ambos aislados poseen una coloración crema y una consistencia espesa (Figura 2).



Figura 1. Hongos aislados del cuarto muestreo de la región geotérmica de “Los Azufres”, Michoacán En esta figura se pueden apreciar los aislados MZ5R.1 (2a), MZ5R13.4 (2b) y MZ5R13.3 (2c).

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se lograron obtener 23 aislados de la región geotérmica de “Los Azufres” del estado de Michoacán, los cuales fueron caracterizados macroscópicamente. Debido a que estos hongos son provenientes de una zona con pH y temperaturas extremos, poseen una gran adaptabilidad, conferida principalmente por genes de resistencia y sus características metabólicas, es por ello que estos hongos son de gran interés para un posterior estudio para evaluar su potencial biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Arellano, U., & Jimenez, E. (2012). Geotermia. *Revista Mexicana de Geoenergía*, 30-35.
- Arias, Cifuentes, E., & Piñeros, Espinosa, P. (2008). *Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de Muestras de Suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde*. Pontificia Universidad de Javeriana .
- Boothroyd, I. (2009). Ecological characteristics and management of geothermal systems of the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Elsevier*, 1-6.
- Carranza, Díaz, Z. (2008). *Selección e Identificación de Especies de Hongos Ectomicorizas del Estado de Hidalgo más Competentes en Medio de Cultivo Sólido*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo .
- Chiacchiarini, P., Lavelle, L., Giaveno, A., & Donati, E. (2003). First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue–Caviahue system. *Elsevier*, 1-3.
- Diario Oficial de la Federación. (31 de Diciembre de 2002). NOM-021-SEMARNAT-2000. *Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos, Estudio, Muestreo y Análisis* .
- González, T. (2012). Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. *SEM@FORO*, 2-5.
- Hadlund, B., Cole, J., Williams, A., Hou, W., Zhou, E., Dong, H., & Li, W. (2012). A review of the microbiology of the Rehai geothermal field in Tengchong, Yunnan Province, China. *Elsevier*, 2-6.
- Redman, R., Litvintseva, A., Sheehan, K., Henson, J., & Rodriguez, R. (1999). Fungi from Geothermal Soils in Yellowstone National Park. *American Society for Microbiology*.
- Sand, W. (2003). Microbial life in geothermal waters. *Elsevier*, 1-5.