

Caracterización de bacterias halófilas aisladas de un cultivo a cielo abierto tipo raceway de espirulina

Mendoza Jiménez Leslie, Patiño Hernández Violeta Montserrat, Martínez-García Martha, Garduño Solórzano Gloria, Monsalvo-Reyes Alejandro C., Campos-Contreras Jorge E.

Bioquímica Molecular, UBIPRO, Herbario FESI. Universidad Nacional Autónoma de México. FES-Iztacala. Avenida de los Barrios No. 1
Colonia Los Reyes Iztacala, Estado de México, CP 54090.

marmartinezgar@hotmail.com

Fecha de aceptación: 12 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Los microorganismos halófilos tienen su origen en los tres dominios de la vida: *Archea*, *Bacteria* y *Eucarya*. Con el objetivo de caracterizar morfológica y molecularmente 6 cepas bacterias halófilas aisladas de un cultivo a cielo abierto en sistema "raceway" de espirulina, se realizó una prueba fisiológica para definir el rango de salinidad en el que las cepas bacterianas presentan crecimiento, éstas se inocularon en agar nutritivo a diferentes porcentajes de NaCl, en intervalos de 5, desde 5 hasta 20%. Además, se les aplicó la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa. El análisis molecular constó del aislamiento de DNA genómico y mediante la PCR se amplificó y secuenció la región del 16S DNAr. Las secuencias obtenidas se analizaron con el algoritmo del BLAST del NCBI. La comparación de las secuencias de las cepas estudiadas, así como los datos morfológicos y bioquímicos mostraron que pertenecen a los géneros: *Bacillus*, *Halomonas* y *Pseudomonas*.

Palabras Clave: *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, halófilas, 16S DNAr.

ABSTRACT

The halophilic microorganisms have their origin in the three domains of life: *Archea*, *Bacteria* and *Eucarya*. Due to the fact of characterize morphologically and molecularly six strains of halophilic bacteria isolated from an open sky growing in a race-way system of spirulina. A physiological test was made to define the range of salinity where the bacterial strains demonstrate growth; these were inoculated in nutritive agar in different percentages of NaCl in intervals of 5, from 5 to 20%. Also, a Gram's dying process was applied as well as catalase and oxidase biochemical tests were made. The molecular analysis was about isolating genomic DNA, the 16s DNAr was amplified by PCR. The sequences gotten were analyzed with the BLAST in the database NCBI. The comparison between the sequence of strains studied as well as the morphological and biochemical data showed that these belong to the gender of *Bacillus*, *Halomonas* and *Pseudomonas*.

Key words: *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, halophiles, 16S DNAr.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se conoce la existencia de organismos capaces de adaptarse a nichos ecológicos llamados ambientes extremos, estos organismos se les conocen como extremófilos. Entre los que se encuentran microorganismos halófilos que tienen su origen en los tres dominios de la vida: *Archea*, *Bacteria* y *Eucarya*, representados por *Haloquadratum*, *Salinibacter* y *Dunaliella* respectivamente. Estos organismos son capaces de sobrevivir a condiciones que para otros serían adversas, como salinidad hasta 5 M de NaCl (Ma *et. al.*, 2010). Los ambientes hipersalinos se localizan en zonas calientes y secas como los lagos salinos y suelos salados de México (Shimmin, 1997).

Las bacterias halófilas pueden clasificarse dependiendo de la salinidad en que se desarrollan como: extremos con crecimiento arriba de 20% de NaCl en el medio, moderados entre 10 a 20% y débiles entre 0.5 - 10% (Mata, 2006). Su adaptación se debe a que la membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo, en el que se producen cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (Madigan *et al.*, 2003).

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico, se basa en la acumulación masiva de compuestos solutos compatibles en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo (Ramírez *et. al.*, 2006).

Estas bacterias halófilas, además de su importancia ecológica representan una fuente de compuestos y enzimas que son utilizadas en la industria, por lo que es necesario reconocer su diversidad de especies y su uso potencial en biotecnología. Este proceso comienza con la identificación fenotípica de cepas bacterianas, la cual se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas contra aquellas de cultivos tipo. La fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. Algunas características son estudiadas al microscopio en fresco y tras tinción Gram generalmente que revela la forma, agrupamiento, estructura de las células y tamaño. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento con una incubación previa de 18 a 48 h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo. Existen pruebas que se utilizan en la identificación preliminar, con verificación de la actividad de la Catalasa y la Oxidasa (MacFaddin, 1997).

Para bacterias cuya identificación resulta difícil usando los parámetros microbiológicos convencionales, se emplea identificación molecular basada en el ADNr 16S, que es la región más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana (Rodicio *et al.*, 2000).

En los últimos años, el análisis genómico de comunidades de microorganismos de ambientes salinos se aborda utilizando la secuenciación masiva –metagenómica- (Caton *et al.*, 2004, Couradeau *et al.*, 2011, Canfora *et al.*, 2014), lo cual no en todos los casos, va acompañada del aislamiento de las cepas, esto limita al conocimiento a solo de la secuencia de los genes estudiados como marcadores. No obstante, según el interés del estudio se hace necesario, además de la detección de los organismos en el sitio a partir de los datos de la secuencia, y se requiere contar con las cepas aisladas.

La búsqueda de especies bacterianas representa un objetivo primordial en el entendimiento de la biología de organismos en ambientes salinos naturales o artificiales. En particular en estos últimos, ha sido abordado en menor escala, por lo cual resulta interesante analizar los sistemas de cultivos a cielo abierto “raceway” de producción de espirulina. Esta cianobacteria crece en aguas mineralizadas, alcalinizadas y en ocasiones calientes (Rodríguez y Triana, 2006), lo cual establece condiciones de un medio selectivo que permite también el desarrollo de otras bacterias. De esta forma, dichos medios de

cultivo constituyen una fuente para el aislamiento de bacterias halófilas, las cuales pueden crecer en consorcio con la cianobacteria, lo anterior representa la oportunidad de encontrar nuevas especies y enzimas con mayor potencial de aplicación biotecnológica. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica y molecularmente a bacterias halófilas provenientes de un cultivo a cielo abierto tipo raceway de espirulina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas bacterianas 1B, 2B, 5aB, 5bB, 7aB y 6B fueron previamente aisladas de un cultivo a cielo abierto de espirulina en Zacualco, Jalisco, México. Se les aplicó la tinción Gram para observarlas en un microscopio Motic BA310 con un aumento de 100x y así conocer su morfología.

Se realizaron pruebas bioquímicas de la catalasa y oxidasa, utilizando TIPIBACT de BioRad. Como prueba fisiológica de salinidad, en placas de Agar Nutritivo a diferentes porcentajes de NaCl (0, 5, 10, 15 y 20%) se inocularon las 6 cepas bacterianas y se incubaron a 30° por 5 días.

Se realizó la extracción de DNA genómico utilizando los reactivos de MoBio™ (Ultra Clean Tissue & Cell DNA Isolation) de las seis cepas siguiendo las indicaciones del instructivo de uso. Para visualizar el DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 0.8%. En amortiguador TBE 0.5%, y un marcador de peso molecular KAPA Express DNA Ladder, Biosystems y se corrió por 40 min a 80 Volts. Al término de la corrida el gel se sumergió en Bromuro de etidio diluido, 5 min y se observó el gel bajo luz ultravioleta. La reacción de PCR de amplificación de la región 16S de DNAr se llevó a cabo utilizando los primers RD1Eubac (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' y FD1Eubac (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') con la enzima MyTaq™ DNA Polimerasa de BIOLINE. La reacción de amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1.2% en las condiciones mencionadas anteriormente. La reacción de secuenciación del amplicón del gen 16S se llevó a cabo usando el kit Big Dye Terminator versión 3.1, y se corrió en un equipo ABI / Hitachi 3130xl Genetic Analyzer de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala.

Para el análisis de la secuencia del 16S se utilizaron los recursos del NCBI-BLAST *Basic Local Alignment Search Tool* (herramienta de alineamiento local por pares) para identificar la taxonomía de las cepas. Además, se construyó un árbol filogenético usando el programa Genious v8.1.

RESULTADOS

Como resultado de las pruebas microbiológicas convencionales (Tabla 1), se encontraron dos bacilos con espora, dos de ellos con Gram positivos (6B y 7aB), una cepa Gram negativa (1B), un bacilo Gram positivo (5aB), dos cocobacilos Gram negativos (2B y 5bB). Todas las cepas presentaron un resultado positivo a las pruebas de catalasa y oxidasa.

Tabla 1. Resultados de cepas, en función de pruebas morfológicas.

Cepa	Gram	Forma	Oxidasa	Catalasa
1B	Negativo	Bacilo	+	+
2B	Negativo	Cocobacilo	+	+
5aB	Positivo	Bacilo	+	+
5bB	Negativo	Cocobacilo	+	+
6B	Positivo	Bacilo con espora	+	+
7aB	Positivo	Bacilo con esporas	+	+

En la tabla 2, se muestra el resultado de la prueba fisiológica de las cepas, cinco mostraron crecimiento óptimo a una concentración de 5% de NaCl, la cepa 1B y 2B se desarrollaron hasta una concentración de 15% de NaCl en el medio.

Tabla 2. Prueba fisiológica de tolerancia a la salinidad (NaCl) de cepas bacterianas.

Cepa	Característica	5%	10%	15%	20%
1B	<i>Halomona sp.</i>	+	+	+	-
2B	<i>Halomona sp.</i>	+	+	+	-
5aB	<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-
5bB	<i>Pseudomona alcaligenes</i>	+	-	-	-
6B	<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	-
7aB	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-

Los resultados del BLAST se muestran en la tabla 3, se analizaron alrededor de 1400 pares de bases (pb), a excepción de la cepa 6B, de la cual solo presento 897 pb. En este mismo cuadro, se indican los números de acceso y los datos de la especie correspondiente con la que presentó mayor similitud; se encontraron dos *Halomonas* no cultivadas (cepas 1B y 2B), una *Pseudomonas alcalophila* (cepa 5Bb); en tanto que del género *Bacillus* correspondió a *Bacillus subtilis* (cepa 5aB), *Bacillus pumillis* (cepa 6B) y *Bacillus axarquiensis* (cepa 7aB). Todas con un porcentaje de identidad mayor a 98% con una excepción (cepa 5Bb) que presentó 75.5%.

Tabla 3. Cepas relacionadas según el análisis del BLAST

Cepa	Número de Pares de Bases (pb)	% identidad	Número Acceso GenBank	Característica
1B	1464	99.1%	EU305583	<i>Halomona</i> no cultivada
2B	1432	99%	EU44679	<i>Halomona</i> no cultivada
5aB	1420	75.7%	AM990996	<i>Bacillus subtilis</i>
5bB	1442	98.8%	JK85384	<i>Pseudomonas alcalophila</i>
6B	897	98.5%	JN217491	<i>Bacillus pumillis</i>
7aB	1464	99.7%	DQ993670	<i>Bacillus axarquiensis</i>

Con base en el alineamiento de las secuencias del 16S DNAr, se construyeron los arboles filogenéticos para las dos cepas de *Halomonas* (Figura 1) y la cepa de *Pseudomonas* (Figura 2).

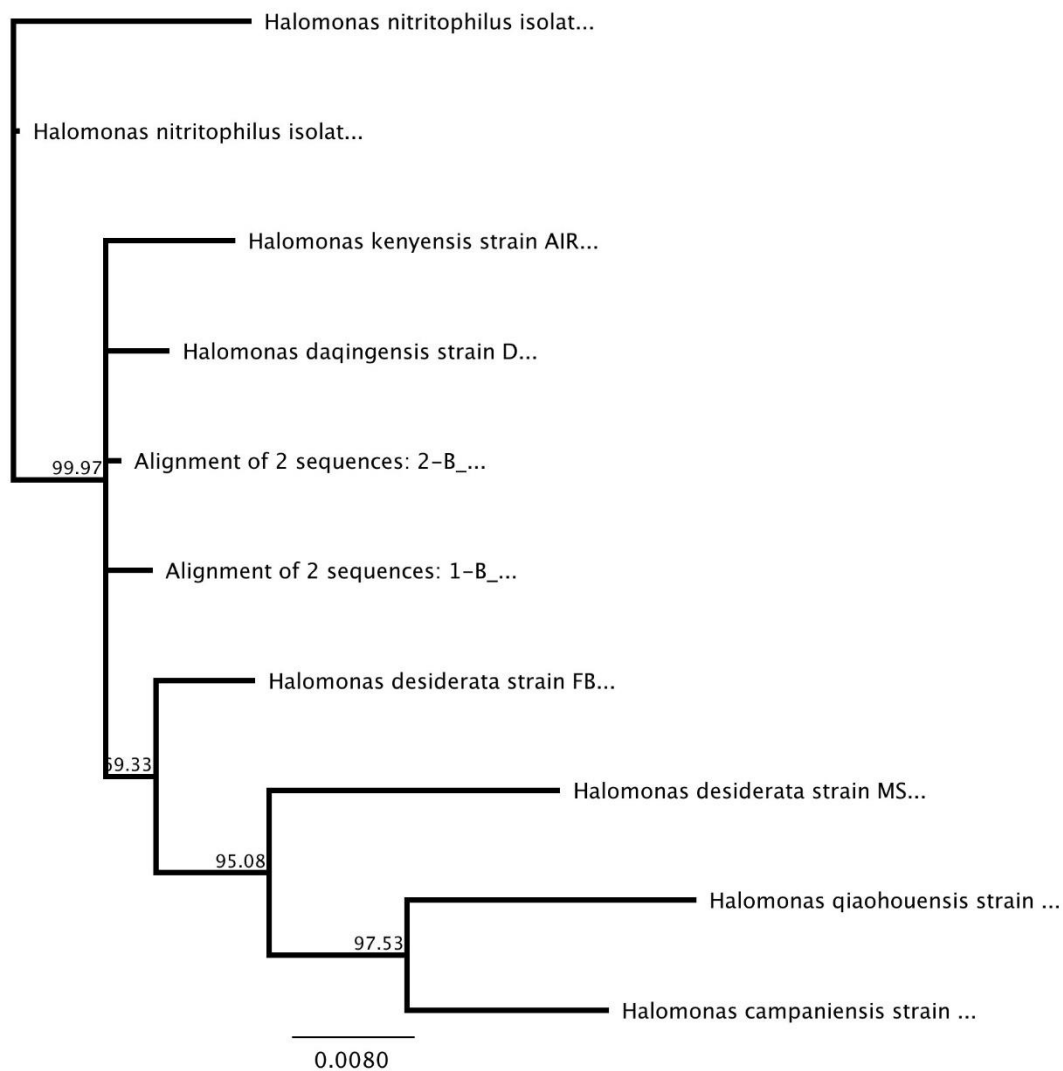


Figura 1. Árbol consenso obtenido con 1435 pb pertenecientes a una secuencia parcial de la región del 16S, obtenido con el método Neighbor-Joining usando el modelo HKY con 10,000 repeticiones

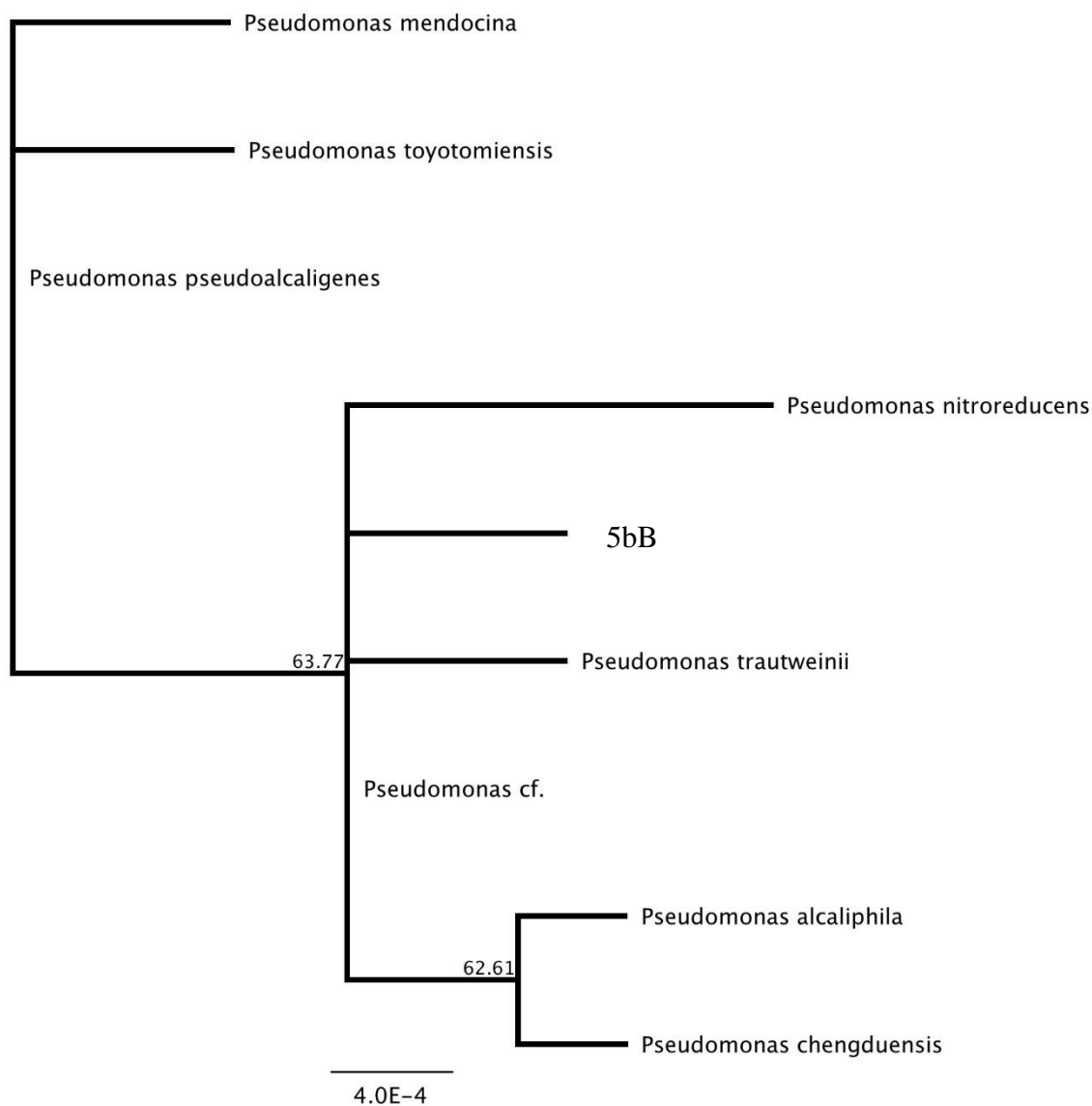


Figura 2. Árbol consenso obtenido con 1378 pb pertenecientes a una secuencia parcial de la región del 16S, obtenido con el método Neighbor-Joining usando el modelo Tamura-Nei con 10,000 repeticiones.

DISCUSIÓN

En la naturaleza conviven organismos en diferentes hábitats ya sea agua, suelo y aire, en condiciones distintas de temperatura, humedad, y en este caso la salinidad. Estos organismos se han registrado para conocer la diversidad existente bajo dichas condiciones particulares, tal es el caso de la zona de reserva de la Biósfera de Cuatro Ciénegas, donde se han aislado organismos halófilos que incluyen bacterias del género *Halomonas* (Castro *et al.*, 2011), además se reportan diferentes taxa de cianobacterias (Benavides *et al.*, 2004), lo anterior evidencia el crecimiento en consorcio de éstos organismos de manera natural.

Las cepas estudiadas se aislaron de un sistema de cultivo artificial tipo raceway a cielo abierto de espirulina, esta cianobacteria crece a una concentración de NaCl aproximadamente de 25g/L a 35 g/L. En general esta forma de cultivo no es axénica y es difícil mantener una sola especie, debido a la facilidad de contaminación biológica, que puede incluso suponer la presencia de bacterias u otros microorganismos (Ruiz, 2011). El estudio profundo de estos complejos sistemas permiten inclusive desarrollar patentes, recientemente se patentó la producción de ácido sulfhídrico partir de azufre mediante un consorcio microbiano alimentado con espirulina (Cotoras y Martínez, 2014).

Estudios en microorganismos halófilos han demostrado su capacidad de crecimiento y adaptación a un óptimo de 10% (NaCl). Se han descrito halófilos moderadas con predominancia de los géneros como las *Halomonas* del filo *proteobacteria*, las cuales son capaces de crecer con altas concentraciones de sal dentro de un rango del 5 al 25%. Las pruebas fisiológicas permitieron comprobar el estándar de crecimiento característico de este tipo de microorganismos halófilos; dos cepas estudiadas son capaces de crecer concentraciones de NaCl, 15% de NaCl 1B y 2B (Tabla 2), lo cual las ubica dentro de las bacterias halófilas moderadas. El resto de las cepas son cepas Gram positivas, mismas que mostraron crecimiento en 5% de NaCl, por lo que se les puede considerar halófilas débiles. En cuanto a las técnicas bioquímicas todas las cepas analizadas presentaron un resultado positivo en prueba de catalasa y oxidasa (Tabla 1), esto concuerda con las características de las cepas con las presentan similitud (Tabla 3).

Las bacterias identificadas utilizando la región 16S fueron las cepas 1B y 2B mostraron similitud con *Halomonas* (Tabla 3 y Figura 1), son bacterias Gram-negativas, algunos representantes del género son extremófilos y son capaces de tolerar altas concentraciones de sal para el crecimiento (Mata, 2006). Además, según la posición de estas cepas dentro del árbol filogenético (Figura 1), éstas *Halomonas* pudieran pertenecer al grupo 2 (de la Haba *et al.*, 2011), donde se encuentran especies como *H. daqingensis*, la cual forma gránulos de polihidroxialcanoato B (Qu *et al.*, 2011) con importancia biotecnológica. Además, esta cepa muestra actividad denitrificante.

El género *Bacillus* contiene microorganismos, Gram-positivos, con forma de bastón, algunas con endosporas, puede ser aerobio, estricto o anaerobio facultativo. Este tipo de microorganismos presenta un rango de distribución amplio, 3 aislados se identificaron como *Bacillus*, la cepas 6B, 5aB, 7aB (Tabla 2). Por otro lado, el análisis realizado a la cepa 5Bb la agrupo con el género *Pseudomonas*, estos microorganismos se reportan como Gram negativos y oxidasa positivos (Tabla 1 y Figura 2).

La microflora alcalina presente en cultivos de *Spirulina* spp. Es generalmente rara y no patógena, como algunas microalgas y bacterias reductoras (Becker, 1982). En comparación con las cepas analizadas en las que se encontró la presencia de *Pseudomonas* reductora que constituye una excelente barrera contra la mayoría de los contaminantes, como bacterias, levaduras, hongos y algas. También se encontró la presencia de dos *Halomonas* y tres cepas del género *Bacillus* que podrán representar a las raras que menciona Becker.

Además, de considerar el hecho de que la cosecha de la cianobacteria se comercializa con diferentes fines, es de utilidad conocer los géneros bacterianos y si éstas son inocuos para el consumo de los productos que se obtengan a partir de estos cultivos (Ruiz, 2011) tal es el caso de las cepas en estudio, ya que ninguna especie con las que se les relaciona es reportada como patógena (Becker, 1982).

CONCLUSIÓN

Las bacterias aisladas de un cultivo a cielo abierto tipo raceway de espirulina bajo un análisis polifásico mostraron que pertenecían a los géneros *Halomonas*, representadas por dos cepas moderadamente

halófilas, tres cepas de *Bacillus* y una de *Pseudomonas* que mostraron ser halófilas débiles. En ninguno de los casos, las cepas estudiadas presentaron similitud con bacterias reportadas como causales de enfermedad, más bien se agruparon con aislados ambientales y de uso potencial biotecnológico, lo que implica que estas cepas pudieran convertirse en recursos microbiológicos aprovechables.

RECOMENDACIONES

Se requiere definir la especie de cada una de las cepas bacterianas analizadas, en particular las pertenecientes a los géneros *Halomonas* y *Bacillus*, se recomienda el uso de otros marcadores moleculares, contenido de G:C, un mayor número de pruebas de actividades bioquímicas y/o enzimáticas, perfil de ácidos grasos, y microscopía electrónica de transmisión.

REFERENCIAS

- Becker E. W., Venkataraman L. V. (1982). Biotechnology and exploitation of algae – The Indian Approach -. *Gesellschaft fiir Technische Zusammenarbeit (GTZ) – Agency for Technical cooperation (GTZ)*.
- Benavides J. E., Garza G. Y., Charles A. V., Rodríguez M. J. (2004). Aislamiento de microorganismos halófilos y cianobacterias de ambientes semidesérticos. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Canfora L., Bacci G., Pinzari F., Lo Papa G., Dazzi C., Benedetti A. (2014). Salinity and Bacterial Diversity: To What Extent Does the Concentration of Salt Affect the Bacterial Community in a Saline Soil? *PLoS ONE*, 9(9), e106662. doi:10.1371/journal.pone.0106662
- Castro P. L., Flores G. A. C., Rodríguez V. A., Aguilar González A. A., Aguilar González C. N., Rodríguez H. R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de Cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Rev. Cient. Univ. Auton. Coahuila*, 3: 33-43.
- Caton T. M., Witte L. R., Ngyuen H. D., Buchheim J. A., Buchheim M. A., Schneegurt M.A. (2004). Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microb. Ecol.* 48: 449–462.
- Cotoras T. D., Martínez Luco C. P. (2014). Producción de ácido sulfhídrico partir de azufre mediante un consorcio microbiano. Universidad de Chile. Pú. Núm.: WO/2014/067023/A1.
- Couradeau E., Benzerara K., Moreira D., Gérard E., Kaźmierczak J., Tavera R., López-García, P. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE*, 6(12), e28767. doi:10.1371/journal.pone.0028767
- De la Haba R. R., Sánchez-Porro C., Ventosa A. (2011). Taxonomy, phylogeny, and biotechnological interest of the Family *Halomonadaceae*. En: Halophiles and hypersaline Enviroments: Current Research and Future trends. Eds. Ventosa A., Oren A., Ma Y. Springer. Berlin. p. 27-64.
- Ma Y. H., Galinski E. A., Grant W. D., Oren A., Ventosa A. (2010). Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Appl. Envriomen. Microbiol.* 76: 6971-6981.
- MacFaddin J. (1997). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3° Ed., Médica Panamericana.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2003). Diversidad Procariótica: *Archea*. En: Madigan, Martinko, Parker. Brock Microbiología de los Microorganismos. Tenth edition. Ed. Pearson-Prentice Hall, Madrid.

Mata G. J., (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas Idiomatica* y *Salipiger*. Tesis de Doctorado. Universidad de Grana. España.

Qu L., Qiliang L., Zhu F., Hong X., Zhang J., Sahao Z., Sun X. (2011). *Halomonas daqiaonensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium isolated from a littoral saltern. *Inter. J. Sys. Evol. Microb.*, 61: 1612-1616.

Ramírez D. N., Serrano R. J., Sandoval T. H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Rev. Mex. De Ciencias Farmacéuticas*, 37: 56-71.

Rodicio M. R. y Mendoza M. C. (2000). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, METODOLOGÍA y aplicaciones en microbiología clínica Departamento de Biología Funcional 238-45. España. Recuperado el 22 de mayo del 2015, de http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=13059055&pidet_usuario=0&pcontactid=&pidet_revista=28&ty=127&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v22n04a13059055pdf001.pdf

Rodríguez C. R. A., Triana S. F. C. (2006). Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (=Arthrospira) bajo condiciones de Laboratorio. Tesis de Lic. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, Bogotá.

Ruiz M. A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente: 24-25, 34.

Shimmin D. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. University of British Columbia, Vancouver, Canada. 1: 90-104.