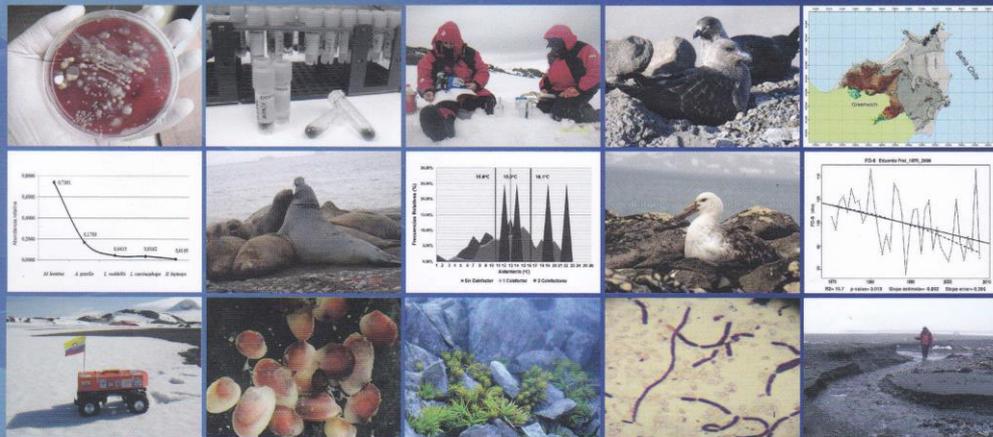


ISSN 1390-1281

Acta Antártica Ecuatoriana

2011



Año 6 - N° 1
PUBLICACIÓN CIENTÍFICA INAE
Instituto Antártico Ecuatoriano



ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE MICROORGANISMOS ANTÁRTICOS PARA EVALUAR SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

M. Ratti¹, D. Catagua¹, J. Vargas¹, L. Monserrate¹, N. Ordóñez², P. Chong¹ y E. Peralta¹

¹Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, ESPOL, Km 30.5 Vía Perimetral, Campus Gustavo Galindo, Ed. PROTAL p. alta, currufer@yahoo.com, david_currufer@yahoo.com, wooradio15@hotmail.com, belomoma2004@yahoo.es, pablox1977@yahoo.com, estherlilia@gmail.com, ²University of Kiel, nadia.ecuador@gmail.com

Resumen

Durante la XIV Expedición Ecuatoriana a la Antártida realizada en el verano austral del 2010, se recolectaron muestras de suelo, agua y sedimento con la finalidad de establecer en CIBE-ESPOL un banco de cepas de microorganismos psicrófilos y psicotrofos. Actualmente se cuenta 435 aislados preservados a una temperatura de -80°C, con un control de viabilidad los cuales están previstos de forma periódica cada 2 meses. La presente artículo informa los avances logrados en la primera fase del proyecto, optimización de aislamiento de bacterias, hongos y levaduras, además de su identificación partiendo de análisis morfológicos y perfiles bioquímicos. Los resultados preliminares reflejan el alto potencial biotecnológico que poseen los microorganismos antárticos como biocontroladores y como fuente de biomoléculas de interés industrial y biomédico. La siguiente fase pretende explotar el acervo genético de los microorganismos aislados por medio de análisis moleculares que apunten a la búsqueda de genes de interés biotecnológico.

Palabras clave: Banco de cepas, biotecnológico, preservación, diversidad.

Abstract

During the Ecuadorian XIV Expedition to Antarctic (antarctic summer of 2010), samples of soil, water and sediment were collected in order to establish a Collection of psychrophilic and psychrotrophic microorganisms at CIBE-ESPOL. Currently, we have a collection of 435 isolates preserved at temperature of -80 °C, with a viability control every 2month. This article reports the progress in the first phase of the project, which includes the optimization of culture to isolation of bacteria, fungi and yeast with respective identifications based on morphological analysis and biochemical profiles. Preliminary results reflect the high biotechnological potential of antarctic microorganisms as biocontrol and as a source of biomolecules of industrial and biomedical importance. The next phase of this project aims to exploit the gene pool of antarctic bacteria, yeast and fungi by molecular analysis pointing to finding genes of biotechnological interest.

Keywords: Bank of strains, biotechnology, preservation, diversity.

1. Introducción

El conocimiento de la diversidad microbiológica existente en el planeta, cobra cada vez mayor importancia, no solo por su papel imprescindible para el equilibrio ecológico; sino que la necesidad de preservarla, se ha incrementado a medida que se descubren múltiples utilidades que derivan de ella en diferentes campos como el agrícola, industrial y médico [1].

El continente Antártico, de estructura ecológicamente frágil, es de gran importancia para la investigación microbiológica, debido a la incidencia de bacterias poco conocidas en su hábitat [2]. La diversidad microbiológica presente en el suelo, sedimento y agua es muy grande con características

únicas y mecanismos que han desarrollado para poder adaptarse y desarrollarse en condiciones hostiles de presión, temperatura y salinidad. Esta versatilidad mostrada por los microorganismos hace posible que puedan transformar una gran variedad de sustratos, entre los que se encuentran compuestos orgánicos e inorgánicos y sean responsables de diversos procesos biogeoquímicos y fermentativos de elevado interés [3] en especial microorganismos psicrófilos, verdaderos extremófilos, que no solo crecen a bajas temperaturas y escasa disponibilidad de nutrientes [4, 5] sino que son capaces de degradar patógenos y contaminantes, superando las difíciles condiciones ambientales imperantes, causadas por estos [6].

El conocimiento de las características fisiológicas y fenotípicas constituye un importante paso en la identificación de los microorganismos. Las pruebas bioquímicas se fundamentan en demostrar si las cepas bacterianas son capaces de transformar un sustrato en particular. La presencia de determinadas moléculas, ya sea de las estructuras de las células o de los subproductos de su metabolismo, pueden ponerse de manifiesto mediante una serie de reacciones químicas adecuadas [7]. Todo esto incrementa la necesidad de preservar los microorganismos, y en particular aquellos que, puedan ser aislados de ambientes extremos, y presenten un gran potencial biotecnológico.

En etapas anteriores de este proyecto se optimizaron los métodos de cultivo, aislamiento y preservación de bacterias, hongos y levaduras antárticos en laboratorios de CIBE-ESPOL. A partir de esos resultados, se realizó análisis morfológicos y pruebas bioquímicas para determinar el perfil de los microorganismos, lo que servirá como base de investigaciones futuras encaminadas a determinar cepas que puedan ser empleadas como fuentes de enzimas (lipasas, amilasas, etc.) y de metabolitos capaces de inhibir el desarrollo de patógenos.

2. Materiales y Métodos

Metodología de campo

Durante el verano antártico de 2010 se recolectaron varias muestras de suelo, sedimento y agua en diferentes puntos de la Isla Greenwich, Isla Dee y Barrientos.

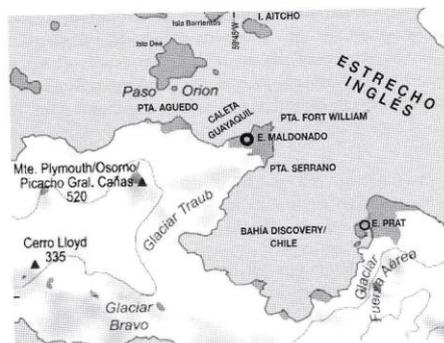


Figura 1. Localización de la Estación Pedro Vicente Maldonado

En el trabajo de campo se establecieron un total de 13 y 9 áreas de muestreo para suelo y sedimento-agua respectivamente, en los alrededores de Punta Fort William (PFW)-IG (suelo 9, sedimento y agua 3) y Punta Ambato (PA)-IG (suelo 1, sedimento y agua 2); Isla Dee (ID) (suelo 1, sedimento y agua 2) e Isla Barrientos (IB) (suelo 2, sedimento y agua 2) "Tabla 1".

Tabla 1. Tabla de coordenadas de las muestras tomadas.

Lugar	Muestra	Características	Coordenadas	
			S	W
PFW-IG	4	Puyango. Zona seca y alta, elevación cercana al glaciar.	62° 27' 19"	59° 45' 07"
	9	Anidación de aves	62° 27' 02,4"	59° 43' 28,9"
	10	Zona de Musgos	62° 26' 54,6"	59° 44' 41,0"
	14	Zona seca plana de piedras	62° 26' 54,4"	59° 44' 09,5"
	15	Zona líquenes	62° 26' 52,4"	59° 43' 43,1"
	3	Zona Plantas Vasculares	62° 26' 59,5"	59° 44' 46,2"
	7	Zona de una amplia diversidad vegetal	62° 27' 00,9"	59° 44' 26,7"
	8	Huesos en descomposición	62° 26' 45,0"	59° 43' 32,0"
IB	16	Zona de deshielo del Glaciar Quito	62° 27' 00,9"	59° 44' 07,7"
	1	Guano de colonias de pingüinos	62° 24' 24,3"	59° 44' 20,9"
PA-IG	2	Vegetación cercana a las colonias	62° 24' 22,5"	59° 44' 16,5"
	11	Suelo Arenoso, bajo impacto antropogénico	62° 26' 29,7"	59° 47' 23,7"
ID	6	Suelo Arenoso con materia orgánica	62° 25' 51,6"	59° 47' 40,6"

Las muestras fueron recolectadas manualmente y transportadas en hieleras a laboratorios del CIBE-ESPOL en Ecuador.

Optimización del aislamiento de microorganismos

Se pesó 1g de suelo, y se colocó en tubos con 10 ml de Agua de Peptona para bacterias y 10 ml de agua estéril para hongos. Los tubos inoculados se los dejó incubar durante 2 horas a 4°C. Para la siembra de muestras de suelo se utilizaron varios métodos (directo y por diluciones); se efectuaron diluciones hasta 10⁻³; se colocaron 30 µl de cada dilución de muestra en cajas petri con agar, y se sembraron por método superficial con ayuda de un asa de dispersión. Los medios de cultivo como: TSA (Trypticase Soy Agar) y AN (Agar Nutritivo) para bacterias; YEC (Yeast Extract Cloramphenicol), SAB (Sabouraud Dextrose Agar), y PDA (Potato dextrose agar) para hongos y levaduras.

Las muestras sembradas en los diferentes medios se las mantuvo en refrigeradoras reguladas a 4°C y en una incubadora refrigerada ajustada a 10°C. La aparición de bacterias, hongos y levaduras se registró en diferentes tiempos para ambas temperaturas de incubación, determinándose la temperatura óptima a base del número de colonias y su velocidad de crecimiento.

Una vez establecida la metodología optimizada sobre los medios de cultivo, y los rangos óptimos de crecimiento se procesaron cinco nuevas muestras antárticas (muestras de suelo 1,3,5,7 y 9) conservadas en los laboratorios del CIBE.

Aislamiento de microorganismos

Una vez obtenido el pool microbianos, se procedía a efectuar un conteo de las UFCs para determinar en cual medio presentaba un mayor crecimiento. El aislamiento se efectuaba, tomando a las colonias bacterianas y levaduras de manera cuidadosa, para evitar la contaminación con otra colonia presente en

el pool, y así obtener una cepa pura. Con una asa de siembra, y procediendo a efectuar un raya o de estrías en los medios sólidos dispensados en las cajas petri. Mientras que los hongos, fueron aislados mediante el uso de una aguja enmangada, dando ligero toque con la punta de la aguja estéril, sobre la colonia del microhongo. Las cajas inoculadas fueron colocadas a 4 y 10°C respectivamente.

Preservación y control de aislados

Los aislados fueron preservados con glicerol al 99,8% como anticongelante en una solución de AP (Agua de Peptona) para bacterias y PDB (Potato dextrose broth) para microhongos y levaduras. Cada muestra fue almacenada con su respectiva réplica en tubos estériles de 2 ml para bacterias, y en tubos de criopreservación de 5 ml para hongos a una temperatura de congelador de -80°C. Todos los aislados tienen sus respectivas codificaciones. A estos aislados se les efectuaron controles de viabilidad para determinar la efectividad de la preservación de muestras a -80°C.

3. Resultados

Evaluación de la optimización del aislamiento de microorganismos

El conteo bacteriano fue posible en todas las diluciones para las muestras 7 y 8, pero para la muestra 4 no se realizó conteo en la dilución 10^{-3} , pues no se registró crecimiento de más de 10 colonias en el medio de cultivo. En las siembras por dilución en TSA las colonias aparecían más separadas que en AN, lo que facilitó el conteo; en AN algunas colonias estaban sobrepuestas entre ellas, lo que dificultó su conteo y aislamiento. En la temperatura de incubación de 4 °C, el conteo de la carga bacteriana fue más alto que la carga microfúngica. Las cargas bacterianas registradas en los medios de cultivo TSA y AN resultaron bastante similares (Figura 2), evidenciándose un conteo superior de bacterias en AN para las muestras 4 y 8, en comparación con aquel registrado en TSA; sin embargo la muestra 7 presentó un mayor conteo en este medio de cultivo.

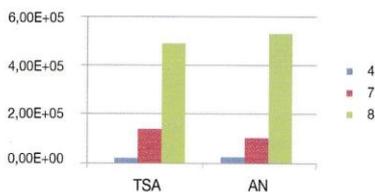


Figura 2. Carga bacteriana (UFC/g) de las muestras 4, 7 y 8 en agar TSA y AN a 4 °C.

La carga fúngica a 4 °C (Figura 3) fue bastante baja en PDA, en especial para las muestras 7 y 8 se obtuvo un mayor conteo de UFC/g en YEC. En la muestra 7 sembrada en SAB no se registró crecimiento de hongos filamentosos, sólo de levaduras. En las siembras por dilución en YEC las colonias fúngicas lucían más separadas que en SAB y PDA, lo que facilitó el conteo y el aislamiento de los microhongos y levaduras.

En general el conteo de la carga fúngica fue más alto que el de la carga bacteriana, en especial para la muestra 8, a la temperatura de incubación de 10 °C. A esta temperatura de incubación, la carga bacteriana fue mayor en TSA para todas las muestras, en especial para la muestra 8 (Figura 4).

La carga fúngica fue mayor en PDA para todas las muestras y el menor conteo de hongos y levaduras fue registrado en SAB. Solo para la muestra 4 se obtuvieron conteos similares para los tres medios de cultivo usados (Figura 5).

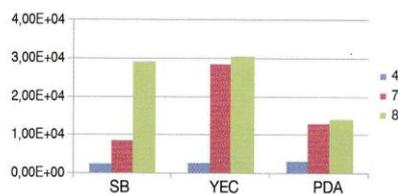


Figura 3. Carga fúngica (UFC/g) de las muestras 4, 7 y 8 en agar SB, YEC y PDA a 4 °C.

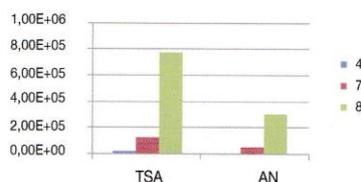


Figura 4. Carga bacteriana (UFC/g) de las muestras 4, 7 y 8 en agar TSA y AN a 10 °C

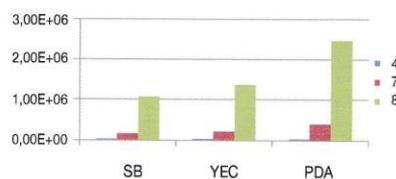


Figura 5. Carga fúngica (UFC/g) de las muestras 4, 7 y 8 en agar SB, YEC y PDA a 10 °C.

Temperatura de óptima de crecimiento

En general a la temperatura de incubación de 10 °C se obtuvo un mayor conteo microbiano de bacterias y hongos en las tres muestras de suelo analizadas. Con excepción del medio de cultivo AN, donde a la temperatura de 4 °C, se obtuvo un mayor conteo de bacterias, inclusive para la muestra 4, este fue superior al registrado en TSA. El conteo bacteriano para las muestras 7 y 8 fue mayor en TSA a 10 °C que en AN, mientras que para la muestra 4 este correspondió a la temperatura de 4 °C en AN.

El conteo fúngico fue bastante superior para las tres muestras en el medio de cultivo PDA, seguido por YEC y SAB. Finalmente, para la temperatura de 4 °C, el conteo de UFC/g bacteriano fue superior al fúngico, mientras que a 10 °C, el conteo fúngico fue superior al bacteriano (figuras 6, 7 y 8).

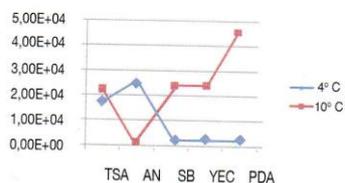


Figura 6. Muestra 4: Conteo microbiano (UFC/g) a 4 °C y 10 °C.

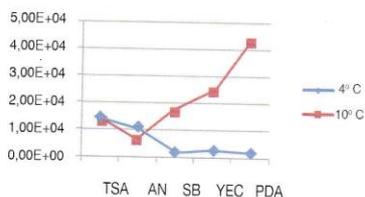


Figura 7. Muestra 7: Conteo microbiano (UFC/g) a 4 °C y 10 °C.

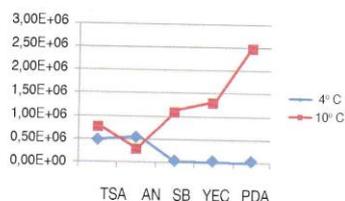


Figura 8. Muestra 8: Conteo microbiano (UFC/g) a 4 °C y 10 °C.

Preservación y control de aislados

Se obtuvieron un total de 266 aislados microbianos, entre bacterias, microhongos y levaduras en las tres muestras de suelo analizadas a 4 °C y 10 °C (Tabla 2) y los cinco medios de cultivo usados. Estas fueron preservadas en el congelador de -80 °C en el Laboratorio de Biología Molecular del CIBE y convenientemente registradas en un archivo excel con su ubicación y código.

Las bacterias y levaduras de las diversas muestras analizadas que fueron preservadas a -80 °C, pudieron recuperarse exitosamente. Esto confirma la eficiente preservación de los aislados antárticos con la metodología planteada para este ensayo. No obstante, es recomendable realizar controles periódicos para garantizar su viabilidad a largo plazo.

Tabla 2. Cantidad de muestras preservadas de diferentes microorganismos sembrados en distintos medios medios y temperaturas.

Microorganismo	Muestra	4 °C			10 °C		
		4	7	8	4	7	8
Bacterias	AN	11	11	11	12	9	7
	TSA	-	-	-	7	8	12
Levaduras	SAB	0	0	7	6	2	5
	PDA	0	0	5	1	2	4
	YEC	0	2	2	0	1	3
Microhongos	SAB	5	0	13	4	2	7
	PDA	9	4	10	19	3	2
	YEC	14	10	10	3	11	12
Total		39	27	58	52	38	52

Una vez establecido los medios y el rango de temperatura, las siguientes muestras de suelo fueron sembradas en TSA y PDA, e incubadas a una temperatura de 10 °C.

Resultados de conteo microbiano de las nuevas muestras sembradas

Se determinó la carga microbiana (UFC/g) en las muestras obtenidas y los resultados del conteo de la carga de microorganismos en las muestras estudiadas se presentan en la tabla 3 y la figura 1. La mayor cantidad de microorganismo se obtuvo en las muestras 1 y 9, pero una mayor diversidad se obtuvo en la muestra 3.

Tabla 3. Cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC/g) en las muestras analizadas.

Muestra	Zona	UFC/g	
		Bacterias	Hongos y Levaduras
1	Isla Barrientos	1,57E+06	1,47E+06
2	Isla Barrientos	5,71E+05	4,00E+04
3	Punta Fort William-Isla Greenwich	2,73E+05	2,90E+05
7	Punta Fort William-Isla Greenwich	2,78E+05	1,42E+05
9	Punta Fort William-Isla Greenwich	8,15E+05	8,98E+05

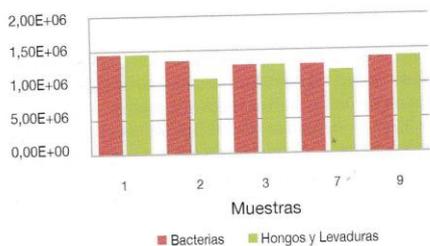


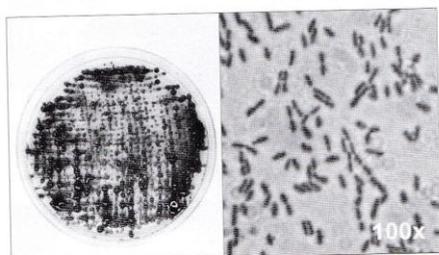
Figura 9. Cuento de bacterias y hongos y levaduras (UFC/g) en las muestras analizadas.

Varias de las muestras aisladas presentaron homología tanto macroscópica como microscópica, razón por la cual han sido preservadas a -80°C antes de pasar por un proceso de análisis bioquímico. Sus respaldos se los conserva a 4°C para su estudio.

En la "Figura 10" se muestran los microorganismos aislados de la muestra 3 de Antártida, en la cual se presentó una mayor diversidad de colonias. A partir de esta muestra se cuenta con una serie de aislados puros de bacterias, hongos y levaduras, que están siendo sometidos a análisis morfológicos, como forma, color de las colonias, tinciones y pruebas bioquímicas para su respectiva identificación.

Entre los microorganismos obtenidos tenemos:

PDA 3-3 2a: Colonias moradas, en un inicio transparentes, mucoides, de crecimiento moderado y difícil manejo, bacilos Gram -, que crece a 25° , su desarrollo en frío es muy regular, sin embargo se aprecian pliegues a temperatura ambiente, pigmento negro difusible en el medio, consistencia cauchosa (Figura 10).

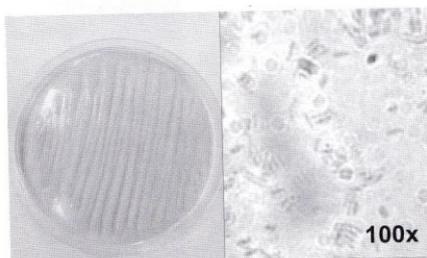


PDA 3-3 2a Violeta /Bacilo Gram-

Figura 10. Colonia bacteriana, y su respectiva microfotografía. Bacteria presenta pigmentos violeta.

PDA 7-3 1a [1]: Colonias amarillas-verdosas brillantes, consistencia mucoide, bacilos Gram - muy pequeños. No crece a temperatura ambiente, netamente

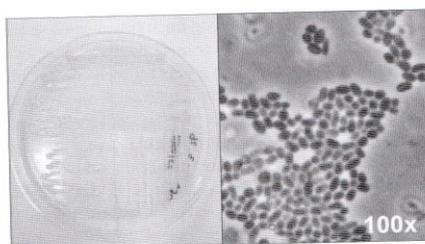
psicrófila, produce pigmento que se difunde en el agar. Este pigmento brilla cuando es sometida a luz UV. (Figura 11).



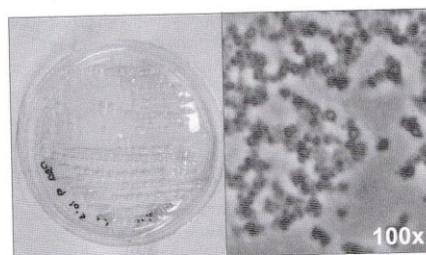
PDA 7-3 1c Verde-Amarilla / Bacilos Gram-

Figura 11. Colonia bacteriana y su respectiva microfotografía. Pigmento que fluoresce bajo luz UV.

PDA 3-3 3b: Amarillo intenso, colonias cremosas, cocos Gram +; no crece a temperatura ambiente, estrictamente psicrófila. Similares características presenta la cepa PDA 9-1 1d.(Figura 12).



PDA 3-3 3b Colonias Amarillas / Gram+



PDA 9-1 1d Colonias Beige / Gram +

Figura 12. Colonia bacteriana y su respectiva microfotografía. Muestra a dos bacterias netamente psicrófilas.

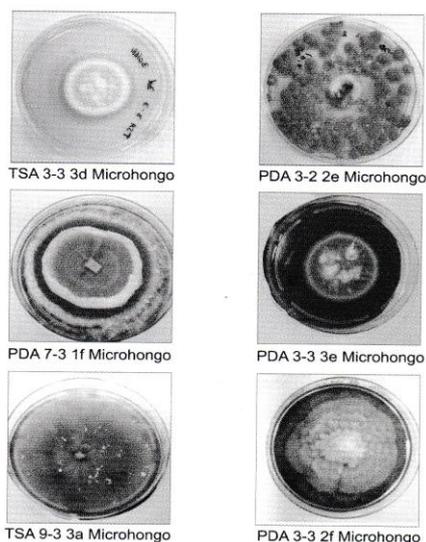


Figura 13. Aislados de microhongos que se encuentran en estudio.

En la actualidad el banco de microorganismos se ha incrementado notablemente, poseyendo un total de 435 aislados y se han procesado ya siete muestras de suelo. En cuanto a las bacterias gramnegativas, se obtuvieron 6 morfotipos distinguibles por la coloración de las colonias: blancas, beige, pardas, anaranjadas, translúcidas y rosadas. Todos los aislamientos fueron bacilos gramnegativos no formadores de esporas. Se determinaron microorganismos netamente psicrófilos y algunos con propiedades morfológicas y fisiológicas de interés, cuya caracterización bioquímica e identificación se realiza en la actualidad. Se ha determinado que si se utiliza el medio PDA sin antibiótico existe crecimiento de bacterias con pigmentación y con producción de polímeros y sustancias antibióticas de sumo interés.

4. Discusión

Mediante este trabajo se pudo estandarizar el proceso de siembra, mantenimiento, crecimiento y preservación de los microorganismos aislados de las muestras de suelo de la Antártida, estableciendo los mejores medios para el cultivo, así como las temperaturas de incubación. Dados los resultados obtenidos en el crecimiento de las muestras (8,7 y 4), se determinó que los medios PDA y TSA, son los idóneos para efectuar siembra de las futuras muestras de la Antártida.

En las últimas muestras obtenidas de la Antártida se logró aislar microorganismos formadores de pigmentos. La mayor cantidad de colonias pigmentadas se obtuvo al emplear PDA, lo que corrobora que el

uso de medios que contengan gelatina, papa o leche, favorece la producción de pigmentos [8]. Dentro de los microorganismos productores de pigmentos, se determinaron algunos netamente psicrófilos y otros con propiedades morfológicas y fisiológicas de interés, incluyendo la producción de pigmentos con actividad antimicrobiana. Su identificación y caracterización se realiza en la actualidad.

Se establecieron las condiciones para la preservación de las cepas microbianas aisladas, comprobándose su viabilidad luego de ser conservadas a -80°C . (Figura 14). En la actualidad se cuenta con un cepario de 435 aislados de bacterias, levaduras y microhongos conservados a -80°C , con un registro completo de sus características.

Alrededor del mundo existen numerosas colecciones de microorganismos que incluyen bacterias, hongos, levaduras, y microalgas provenientes de la Antártida. La Colección Australiana de microorganismos de la Antártida (ACAM), fundada en 1986 en la Universidad de Tasmania, incluye un total de 400 cepas completamente identificadas y está focalizada hacia su potencial uso biotecnológico. [9].

En este artículo se reporta los primeros pasos para el establecimiento de la primera colección de microorganismos antárticos en el Ecuador, ubicado en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. Se espera realizar los respectivos análisis moleculares y bioquímicos, para lograr identificar y caracterizar todos los aislados preservados y continuar la búsqueda de metabolitos con alto potencial biotecnológico. Esto nos permitirá tener una base de las especies presentes en la Antártida, y poder suministrar microorganismos puros a otros centros de investigación en el Ecuador.

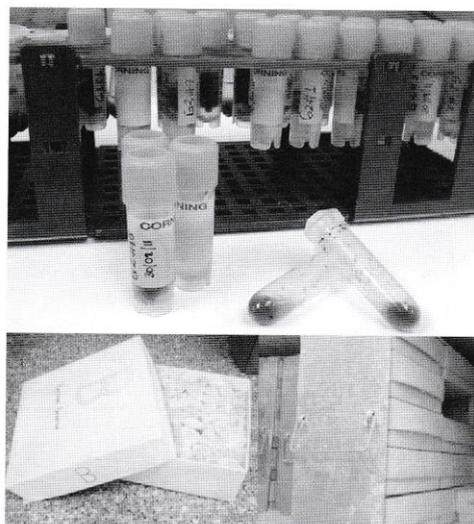


Figura 14. Tubos con los microorganismos almacenadas en sus respectivas cajas.

5. Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Instituto Antártico Ecuatoriano (INAE) y a la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales (FIMCBOR-ESPOL) por el apoyo brindado en el transcurso de esta investigación.

6. Referencias

- [1]. Sánchez, L y Corrales, L., 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. NOVA: publicación científica en ciencias biomédicas 3 (4): 21-29.
- [2]. Helguero, C. y Valencia, M., 1993. Estudios de enterobacterias en las inmediaciones de Punta Fort William, Isla Greenwich. Acta Antártica Ecuatoriana 3 (1) : 71-75.
- [3]. Drake, H., Daniel, S., Küsel, K., Matthies, C., Kuhner, C., Braus-Stromeyer, S., 1997. Acetogenic bacteria: what are the in situ consequences of their diverse metabolic versatility? Biofactors. Vol. 6. (1): 13 - 24. PMID 9233536
- [4]. Feller, G. and Gerday, C., 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. Nat. Rev. Microbiol. (1): 200-208.
- [5]. ZUMFT W. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev., Veo. 61 (4): 533-616. PMID 9409151
- [6]. Mestre, M.C., Vázquez, S.C., Ruberto, L. y Mac Cormack, W.P., 2007. Identificación de los componentes cultivables del consorcio bacteriano degradador de Hidrocarburos "M10". VI simposio Argentino y III Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas .10. al 14 de Septiembre. Dirección Nacional del Antártico/Instituto Antártico Argentino.
- [7]. Tortora, G., Funke, B., Case, C., 2005. Microbiology: An Introduction Brief Edition. Editorial Benjamín Cummings. SBN-10: 0805377522, ISBN-13: 9780805377521
- [8]. Washington, C. y Stephen, D. 2008. Microbiología, Virología y Parasitología, 6ª Edición.
- [9]. ACM: Australian Collection of Microorganisms, Australia http://gcmd.nasa.gov/KeywordSearch/Keywords.do?KeywordPath=%5BData_Center%3A+Short_Name%3D%27AU%2FAADC%27%5D&Portal=amd_au&MetadataType=0.