

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAS AGUAS DEL RÍO TAMBO

ISOLATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM TAMBO RIVER

M. Zapana Oquendo¹, B. Acero Castellanos¹, W. Roque Quispe¹, E. Huisa Balcon¹,
K. Jara Llacho¹, O. Tito Nova¹, Julio César Bernabé Ortiz²

(1) Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa – Perú, Principales.

(2) Escuela Profesional de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa - Perú.

RESUMEN: El cauce de las aguas del río Tambo se encuentra cercano al futuro proyecto minero Tía María, ubicado en la provincia de Islay del departamento de Arequipa. En el presente trabajo de investigación se realizó el proceso de aislamiento y caracterización molecular de bacterias de las aguas del río Tambo con el objeto de establecer un precedente de la microbiota presente en este cuerpo de agua superficial. Para este propósito, se recolectó una muestra de agua superficial y a partir de esta se sembró en medio agar nutritivo, se incubó por 1 semana a temperatura ambiente. Se seleccionaron 2 cepas y se realizó 5 repiques para purificar cada una de estas. Luego, se les realizó pruebas de tinción de Gram y pruebas de sensibilidad a antibióticos y; finalmente todas estas cepas fueron secuenciadas, previa extracción de ADN. Las cepas aisladas pertenecen a los géneros *Acinetobacter* (2 cepas).

Palabras clave: Río Tambo, Tía María, aislamiento, caracterización molecular, bacterias, agua superficial, cepas, *Acinetobacter*.

ABSTRACT: The course of the waters of the Tambo River is close to the future Tía María mining project, located in the province of Islay of the department of Arequipa. In this research work, the process of isolation and molecular characterization of bacteria of the waters of the Tambo River was carried out in order to establish a precedent of the microbiota present in this body of surface water. For this purpose, a sample of surface water was collected and from this was seeded in nutritious agar medium, incubated for 1 week at room temperature. Two strains were selected and 5 rings were made to purify each of these. Then, they were tested for Gram stain and antibiotic sensitivity tests and; finally all these strains were sequenced, after DNA extraction. The strains isolated belong to the genera *Acinetobacter* (2 strains).

Keywords: Tambo River, Tía María, isolation, molecular characterization, bacteria, surface water, strains, *Acinetobacter*.

INTRODUCCIÓN

La Cuenca del río Tambo está ubicada en el flanco sur-occidental de la Cordillera de los Andes, limita por el oeste con la cuenca Quilca-Vítor-Chili, por el norte con las cuencas Camaná, Coata y Lipa, por el este con la cuenca llave, y por el Sur con las cuencas llave, Ilo-Moquegua y Honda. Varía en altitudes entre 0 a 5 800 m.s.n.m., en la divisoria de aguas con las cuencas vecinas (Nuñez & Gómez, 2012).

Desde el punto de vista geológico, la cuenca del río Tambo ha debido constituir en sus orígenes una gran cuenca de sedimentación, la cual ha sido el escenario de diversos eventos geológicos, que han condicionado la deposición de sedimentos de facies tanto marina como continental.

Los depósitos minerales han sido originados por la alteración hidrotermal y se les considera tanto de relleno de fisura como de reemplazamiento metazomático, originados por soluciones hidrotermales.

La mineralización está representada por especies minerales de cobre (chalcocita, bornita, brochantita, etc.) y de plomo-plata (plata nativa, galena, tetraédrica, etc.).

En el aspecto no metálico, debe anotarse la existencia de un variado conjunto de depósitos, destacándose entre ellos los materiales de ornamentación y los de construcción. (Arbulú, 2018)

La Identificación de Fuentes Contaminantes de la cuenca Tambo, dio como resultado 52 fuentes de contaminación, comprendidas por 8 vertimientos de aguas residuales municipales, 23 vertimientos de aguas residuales domésticas, 6 vertimientos industriales, 2 vertimientos recreacionales, 9 botaderos de Residuos Sólidos, 5 pasivos mineros (Autoridad Nacional del Agua, 2013).

El presente trabajo de investigación se basa en el establecimiento de un precedente de las bacterias presentes en la microbiota de las aguas del río Tambo antes del posible establecimiento del proyecto minero Tía María.

Para ello, se recolectó una muestra de agua superficial y se sembró en medio agar nutritivo, se incubó por 1 semana a temperatura ambiente para luego realizar 5 repiques de los cuales se logró aislar 2 cepas.

Correspondencia:

E-mail:
Celular:

METODOLOGÍA

Toma de la muestra

Se realizó la toma de muestra a 20 cm. de profundidad en las aguas del río Tambo de la ciudad de Arequipa, Perú, con coordenadas 17° 00'48,8"S y 71° 39' 24,2"W, la muestra se almacenó en frascos de plásticos estériles de 100 mL, y las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

Aislamiento

Se preparó el medio de cultivo pesando 2,8 g. de medio agar nutritivo, el cual fue provisto por el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, lugar donde se realizó el trabajo de investigación. Después del pesado del agar, este se agregó a un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada, se disolvió y se cubrió con papel Craft para finalmente ser llevado a un horno con temperatura a 120 °C y 1 atm de presión durante 10 minutos. Se dejó que el medio se enfríe y procedió a ser trasvasado a 4 placas Petri estériles con la ayuda de un mechero para evitar la contaminación del medio, finalmente se esperó su solidificación para su próximo uso.

La muestra tomada se cultivó en el medio Agar nutritivo preparado usando la técnica de siembra por extensión con el objeto de asegurar el mayor crecimiento en variedad de especies de bacterias de las aguas del río Tambo. Se esperó 7 días para el correcto crecimiento de las colonias.

Luego del crecimiento de colonias, se seleccionaron dos cepas de bacterias denominadas "TAMBO01" y "TAMBO02", en las cuales se realizó posteriormente el aislamiento en el cual se realizaron 5 repiques por el método de estrías. El período de repiques se realizó en alrededor de 1 mes.

Obtención del cultivo puro

Para la obtención del cultivo puro se preparó una solución Tritón x100 (0,01M), la cual fue trasvasada a dos tubos Eppendorf. Con la ayuda de un asa de Kohle, previamente esterilizada y luego enfriada, se tomó la muestra del quinto repique, se introdujo el asa con muestra en el tubo Eppendorf y se revolvió hasta lograr una mezcla total. Se cerró el tubo y se procedió a un proceso de agitación durante 5 minutos, para lograr una homogenización completa. Luego, se usó una micropipeta para tomar una muestra de 50 µL de la mezcla homogénea del tubo Eppendorf para colocarla en una placa Petri con medio Agar nutritivo. En simultáneo, con la ayuda de un asa de Drigalsky previamente esterilizada en alcohol, se procedió a la expansión de la muestra por toda la placa, se flameó la tapa de la placa para evitar la contaminación del exterior, se tapó y se cubrió con papel Craft para su preservación.

Prueba de Tinción GRAM

Para revelar la forma de la bacteria, agrupación y grupo taxonómico al que pertenece, se realizó la identificación con tinción Gram a las 2 cepas bacterianas "TAMBO01" y "TAMBO02". Para ello, se higienizó una lámina portaobjetos con alcohol y papel, se colocó ¼ de una gota de agua destilada y se insertó el asa de Kohle, la cual previamente fue esterilizada y fue usada para tomar una muestra del cultivo puro, se extendió la muestra en la placa y se dejó secar durante 30 minutos.

Luego, se cubrió la lámina con 2 gotas de Cristal Violeta, se esperó 1 minuto y se procedió a su lavado con agua, inmediatamente se cubrió con 2 gotas de Lugol, se esperó

1 minuto y se procedió a su lavado con 10 gotas de Acetona y luego con agua, finalmente se cubrió la placa con 2 gotas de Safranina, se esperó 1 minuto y se procedió a su lavado con agua.

Para su posterior observación en el microscopio, se cubrió la lámina con aceite de inmersión y se procedió a observar a través del microscopio con un aumento de x100, teniendo como resultado que la cepa "TAMBO01" presenta una coloración roja característica de una bacteria gram-negativa, mientras que la cepa "TAMBO02" presenta una coloración azul correspondiente a una bacteria gram-positiva.

Almacenamiento y preservación de las cepas

Una muestra de ambas cepas "TAMBO01" y "TAMBO02" fueron preservadas en medio de cultivo glicerol al 20%, para lo cual con la ayuda de una micropipeta se agregó 0.5 mL del medio de preservación en un tubo Eppendorf por cada cepa. Luego, con la ayuda de un asa de Kohle se tomó una muestra de cada cepa y se sumergió en el medio de cultivo preparado. Finalmente, ambos tubos fueron etiquetados, envueltos y refrigerados para su preservación.

Prueba de Susceptibilidad a Antibióticos

La prueba de sensibilidad a antibióticos se realizó mediante la prueba de difusión por disco en agar nutritivo, se utilizaron los siguientes antibióticos: Cefadroxilo, Cefuroxima, Claritromicina, Cefalotina, Tetraciclina y Amikacina.

El procedimiento consistió en los siguientes pasos, primero se marcó sobre la base de la placa Petri, los seis puntos sobre los cuales se colocaran las muestras de antibióticos, luego se procedió a colocar sobre el medio Agar nutritivo 4 gotas de agua purificada, para que con una bagueta esterilizada se tome muestra de la bacteria de estudio y se esparza sobre estas gotas para que a continuación con un asa de Drigalsky se proceda a la siembra por extensión y finalmente se procedió a colocar los discos de antibióticos sobre los puntos que se habían marcado desde el inicio del procedimiento con la ayuda de unas pinzas. Se incubaron las placas en un horno a 28 °C y se observaron resultados 2 veces cada 24 horas.

Identificación Molecular

1. Aislamiento de ADN y amplificación del gen *RNAR* 16S para bacterias.

Las placas con cultivo puro de las cepas seleccionadas "TAMBO01" y "TAMBO02" fueron enviadas al Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo, en donde el ADN de las cepas nativas fue aislado de la siguiente manera, con una asa se tomó una de las colonias de la placa petri, la cual fue resuspendido en 600 µL de buffer de lisis 1X en un eppendorf, luego se incubó en hot block por 45 minutos a 65 °C, después de este periodo se agregó 300 µL de Fenol-Cloroformo y 100 µL de microperlas 500µm, se agitó en vortex a 1500 rpm por 3 minutos y se llevó a la centrifugación por 10 minutos a 15000RPM. El sobrenadante se recolectó y fue colocado en un nuevo eppendorf al cual se la añadió 500 µL de isopropanol, se llevó a centrifugación por 10 minutos a máxima velocidad, después el sobrenadante fue eliminado, se conservó el pellet, el pellet se vuelve a lavar con 600 µL de etanol al 75%, se llevó a centrifugación por 2 minutos y se descartó el sobrenadante; el pellet que contiene el ADN se hace secar a temperatura ambiente y luego fue resuspendido con 100 µL de agua destilada estéril.

Posteriormente se realizó la amplificación del gen **RNAr16S** mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

2. Secuenciación de productos de PCR.

A 20 µL de ADN purificado se le añadió 1 µL de Primer para secuenciar (el gen ARNr 16S para bacterias) los tubos fueron etiquetados y enviados Functional Biosciences, Inc. (USA) Para su secuenciación, en donde fueron secuenciados y corridos en un secuenciador. Las secuencias fueron chequeadas y corregidas.

3. Filogenia molecular.

Las secuencias del gen RNAr 16S de las cepas seleccionadas "TAMBO01" y "TAMBO02", que fueron obtenidas por secuenciación, fueron analizadas individualmente y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (blast) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), y luego se construyó árboles filogenéticos para determinar las distancias genéticas y porcentaje de similitud con otras especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento

Se logró aislar 2 cepas en el medio agar nutritivo en placas diferentes. El aislamiento de estos microorganismos de la muestra indica la aparición de 2 cepas de bacterias denominadas "TAMBO01" y "TAMBO02".

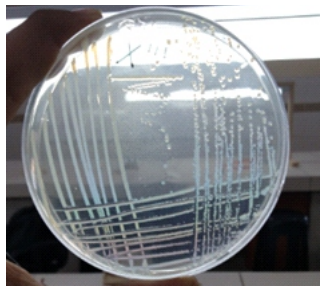


Fig. 1. Resultado del quinto repique de la cepa "TAMBO01"

Prueba de tinción GRAM

Se realizó la caracterización microscópica por medio de la tinción gram, la cual indicó que la cepa "TAMBO01" es un bacilo Gram negativo, mientras que la cepa "TAMBO02" es un coco Gram Positivo.

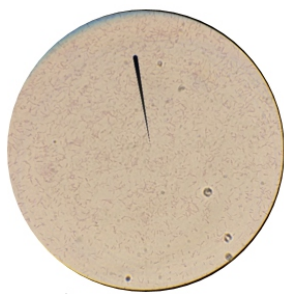


Fig. 2. Vista a través del microscopio de la cepa "TAMBO01"

Prueba de Sensibilidad a Antibióticos

Para la prueba de difusión de disco, después de 24 horas se observa un comportamiento similar en ambas cepas "TAMBO01" y "TAMBO02", ambas mostraron mayor resistencia al Cefadroxilo, Tetraciclina y Cefalotina, esto debido a que el diámetro del halo que se forma alrededor de estos antibióticos es menor en comparación a los otros. El menor diámetro del halo nos indica que la bacteria presenta una mayor resistencia al efecto que produce sobre ella el antibiótico y los mayores diámetros nos permiten identificar los antibióticos más efectivos contra la bacteria de estudio.

Ambas bacterias muestran mayor resistencia a Cefadroxilo, Tetraciclina y Cefalotina, esto se demuestra en su menor diámetro de halo, que indica su capacidad de rechazo al antibiótico.

Para la prueba de difusión de disco, después de 48 horas se observa que en la bacteria "TAMBO01" y "TAMBO02" presentan la misma tendencia de resistencia al Cefadroxilo, Tetraciclina y Cefalotina.

Tabla 1. Zona de inhibición (mm) para antibióticos transcurrido 24 horas

Antibiótico	Zona de inhibición (mm) - 24 horas	
	Bacteria "TAMBO01"	Bacteria "TAMBO02"
Cefadroxilo	10	10
Cefuroxima	20	16
Claritromicina	20	19
Cefalotina	14	14
Tetraciclina	12	10
Amikacina	24	24

Tabla 2. Zona de inhibición (mm) para antibióticos transcurrido 48 horas

Antibiótico	Zona de inhibición (mm) - 48 horas	
	Bacteria "TAMBO01"	Bacteria "TAMBO02"
Cefadroxilo	10	12
Cefuroxima	22	16
Claritromicina	20	20
Cefalotina	14	14
Tetraciclina	12	12
Amikacina	24	24

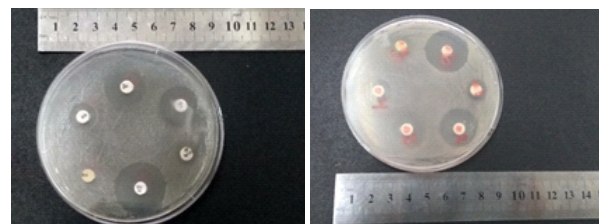


Fig. 3. Resultado de la Prueba de Susceptibilidad a Antibióticos TAMBO01 (izquierda) y TAMBO02 (derecha)

Secuenciación

A continuación, se muestra el árbol filogenético de la primera cepa bacteriana aislada denominada "TAMBO01". La muestra, marcada en amarillo, presenta 99% de similitud con *Acinetobacter tjernbergiae*, siendo una nueva variedad de acuerdo al análisis filogenético, a la cual llamaremos ***Acinetobacter kemorw*** (inicialmente denominada "TAMBO01")

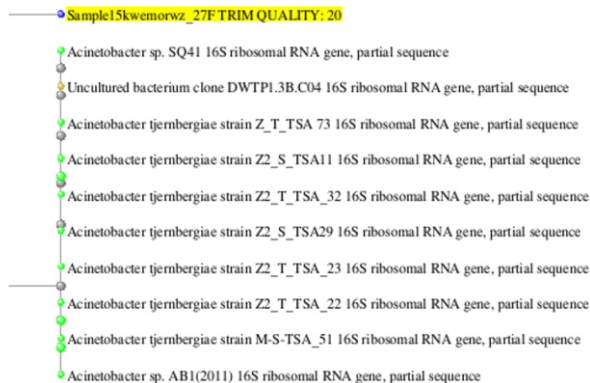


Fig. 4. Árbol filogenético construido en base al gen 16S rARN obtenido de la secuencia de la bacteria denominada "TAMBO01".

A continuación se muestra el árbol filogenético de la segunda cepa bacteriana aislada denominada "TAMBO02".

La muestra, marcada en amarillo, presenta 99% de similitud con *Acinetobacter lwoffii*, siendo una nueva variedad de acuerdo al análisis filogenético, a la cual llamaremos ***Acinetobacter wromek*** (inicialmente denominada "TAMBO02")

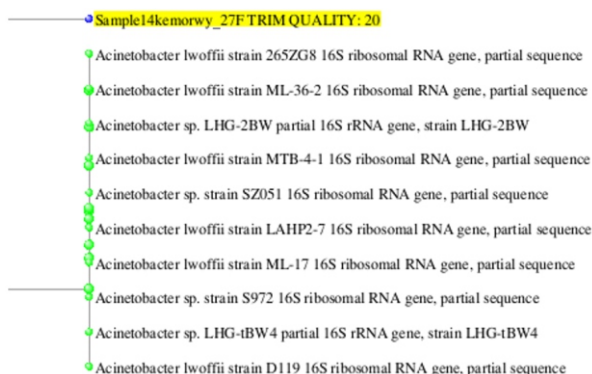


Fig. 5. Árbol filogenético construido en base al gen 16S rARN obtenido de la secuencia de la bacteria denominada "TAMBO02".

Registro en GenBank

Ambas bacterias identificadas como *Acinetobacter kemorw* (inicialmente denominada "TAMBO01") y *Acinetobacter wromek* (inicialmente denominada "TAMBO02") correspondieron a nuevas especies, por tanto, fueron registradas en GenBank.

Una vez enviados los documentos necesarios, se recibieron los códigos de registro para *Acinetobacter kemorw* (MH631035) y *Acinetobacter wromek* (MH631036).

Posibles Aplicaciones de la Bacteria A. kemorw

Esta parte se derivó del árbol filogenético de la bacteria, tomando en cuenta cualidades de bacterias que tienen similitud de un 99%, a las cuales podemos llamar parientes de la bacteria recién tratada.

Se ha podido observar la *A. kemorw* presenta familiaridad con la *Acinetobacter junni*, *Acinetobacter johnsonii* y *Acinetobacter haemolyticus*.

Con respecto al *A. junni* presenta propiedades degradadoras de petróleo. Además, esta bacteria tiene un parentesco con *Acinetobacter HM_AF14*. La cual tiene unos valores altos de remoción por biosorción de zinc, cobre, cromo y mercurio (Fateme, et.al. 2013). La *A. johnsonii* tiene resistencia a metales pesados y altas concentraciones de zinc y arsénico. Además, tanto como la *A. junni* y *A. haemolyticus* son especies muy vecinas entonces comparten cualidades de degradadores de compuestos orgánicos como fenol, diésel, etc.

En una investigación la especie *Acinetobacter johnsonii* se aisló y purificó a partir de suelo agrícola contaminado con ciprodinilo con el fin de obtener la secuencia completa del genoma de *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1. Se determinó también que es un degradador de ciprodinilo, un fungicida comúnmente usado (Wang, et al. 2013).

Posibles Aplicaciones de la Bacteria A. wromek

Esta parte se derivó del árbol filogenético de la bacteria, tomando en cuenta cualidades de bacterias que tienen similitud de un 99%, a las cuales podemos llamar parientes de la bacteria recién tratada.

Como ya se mencionó antes la *A. wromek* presenta familiaridad con la *Acinetobacter lwoffii*, la cual presenta una característica muy curiosa puesto que esta bacteria presenta resistencia a metales pesados y al arsénico. Esto se demostró tras estudiar la estructura genética de esta bacteria, encontrando que contenían genes que codificaban resistencia a diversos metales pesados, incluidos mercurio, cobalto, zinc, cadmio, cobre, cromo y compuestos de arsénico (Mindlin, et.al. 2016).

Bajo lo anteriormente expuesto se desarrolló una investigación adicional acerca de la biopelícula bacteriana y su papel fundamental en la biorremediación de metales pesados de aguas residuales. En este proyecto se analizaron las biopelículas de distintas bacterias entre estas la *A. lwoffii* que por su producción frágias de curli proteínaceas y polisacáridos ricos en celulosa y sabiendo que los polisacáridos secuestran los metales pesados, lo que lleva a concluir que esta bacteria podría aplicarse para eliminar los metales pesados del agua residual (Mosharaf, et.al. 2018).

También se desarrolló una investigación la cual hace mención a la biodegradación de polihidroxialcanoatos de longitud media, para lo cual se estudió 2 poblaciones bacterianas las *Pseudomonas chlororaphis* y *Acinetobacter lwoffii*, de nuestro interés la segunda, ya que estas producen una enzima con la cual producen la despolimerización lo que indica que esta nueva especie *Wromek* tendría una posible aplicación atribuida a la biodegradación (Sharma, et al. 2019).

Por último, se desarrolló el efecto de las nanopartículas de Fe-0 (Fe-0 NPs) sobre la fermentación de macroalgas y la producción de hidrógeno. Además del análisis microbiano de cepas productoras de hidrógeno pertenecientes al género *Clostridium* y *Terrisporobacter sp* y el *Acinetobacter lwoffii*. Sim embargo, se demostró que las

dos primeras son favorables para la formación de ácidos, mientras que se eliminó la especie *Acinetobacter lwoffii* la cual resultó ser beneficiosas para la mineralización orgánica (Yin, et al. 2019).

Entonces podemos concluir que por la cercanía que presentan la *A. lwoffii*, y la *A. wromek*, esta última podría presentar características similares y podría usarse para tratar metales pesados, la biodegradación de polímeros y la mineralización orgánica.

CONCLUSIONES

Se logró un correcto aislamiento, identificación y caracterización molecular de las bacterias *Acinetobacter kemorw* y *Acinetobacter wromek* presentes en las aguas del río Tambo.

REFERENCIAS

- [1] Arbulú, J. (2018). Estudio Hidrológico de la Cuenca del Río Tambo. Moquegua.
- [2] Autoridad Nacional del Agua. (2013). Informe de la Identificación de Fuentes Contaminantes en la Cuenca del Río Tambo. Arequipa.
- [3] Fatemet B., Bejestani, Ghane M, Mirhosseininia M. y Ozra B. (2013) Isolation and phylogenetic analysis of zinc resistant *Acinetobacter* sp. and its potential for bioremediation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 12(26), pp. 4123-4128. doi: 10.5897/AJB2013.12128
- [4] Nuñez, S., & Gómez, D. (2012). Reporte Preliminar de Zonas Críticas por Peligro Geológico Cuenca Río Tambo.
- [5] Mindlin S., Petrenko A., Kurakov A., Beletsky A., Mardanov A., y Petrova M. (2016). Resistance of Permafrost and Modern *Acinetobacter lwoffii* Strains to Heavy Metals and Arsenic Revealed by Genome Analysis. *Biomed Res Int. Published online 2016 Oct 4*. doi: 10.1155/2016/3970831
- [6] Mosharaf MK, Tanvir MZH, Haque MM, Haque MA, Khan MAA, Molla AH, Alam MZ, Islam MS y Talukder MR. (2018) Metal-Adapted Bacteria Isolated From Wastewaters Produce Biofilms by Expressing Proteinaceous Curli Fimbriae and Cellulose Nanofibers. *Front Microbiol.* 2018 Jun 25;9:1334. doi: 10.3389/fmicb.2018.01334.
- [7] Sharma, P., Mohanan, N., & Sidhu, R. (2019). Colonization and degradation of polyhydroxyalkanoates by lipase-producing bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 461-475.
- [8] Wang, W., Chen, X., Yan, H., Hu, J., & Liu, X. (2019). Complete genome sequence of the cyprodinil-degrading bacterium *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, 246-249.
- [9] Yin, Y., & Wang, J. (2019). Enhanced biohydrogen production from macroalgae by zero-valent iron nanoparticles: Insights into microbial and metabolites distribution. *BIORESOURCES TECHNOLOGY*, 100-117.

Recibido el 11 de octubre del 2018 y aceptado para su publicación el 28 de diciembre del 2018