

# Identificación de bacterias colectadas con filtros de fibra de vidrio en tres estaciones de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca

## **I. DATOS GENERALES**

---

Nombre: Linda Zafiro Yáñez Arellano

Matrícula: 2152026190

## **II. LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN**

---

Del 23 septiembre 2019 a 01 Junio 2020

Laboratorio de Ecología Microbiana

## **III. UNIDAD, DIVISIÓN Y LICENCIATURA QUE CURSA O HAYA CURSADO**

---

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

## **IV. NOMBRE DEL PROYECTO EN EL QUE SE PARTICIPÓ**

---

Estudio de Microcontaminantes Atmosféricos como Factores de Riesgo a la Salud de la Población

## **V. NOMBRE DEL ASESOR**

---

Dra. María Teresa Núñez Cardona-Laboratorio de Ecología Microbiana (DEHA)

M. en C. Samuel González García-Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular (DAS)

## **VI. INTRODUCCIÓN**

---

El aire no posee microorganismos propios, pero se conoce que estos son capaces de crear estructuras especializadas que les ha permitido resistir y sobrevivir en este medio; son capaces de dispersarse en ambientes exteriores e interiores gracias a las corrientes de aire, las cuales se encargan de recoger los microorganismos presentes en otros ambientes naturales como el suelo, el agua, las plantas y la microbiota del ser humano. Además, algunas actividades industriales, comerciales, sociales y de movilidad vial han contribuido a la producción de desechos biológicos, físicos y químicos, emitiendo material particulado los cuales ayudan al camuflaje de los microorganismos y a la dispersión de estos (Mendez et al. 2015).

La contaminación del aire, se considera un serio problema ambiental, debido a la presencia en la atmósfera de materiales peligrosos, tales como metales e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), estos últimos son contaminantes prioritarios del aire, por sus propiedades extremadamente peligrosas para la salud humana (Quijano et al. , 2014)

Debido al uso excesivo de combustibles y otros productos derivados del petróleo, durante las dos últimas décadas, la cantidad de compuestos aromáticos liberados al medio ambiente han aumentado de forma considerable. Estos compuestos también se encuentran naturalmente en el medio ambiente, otras fuentes de los mismos incluyen los producidos por actividades humanas como la agricultura (uso de insecticidas, herbicidas, etc.) y la industria (disolventes, conservadores de maderas, detergentes, etc.), las cuales conducen a aumentar su acumulación en la naturaleza (Çınar, 2004).

La presencia de los compuestos aromáticos en el ambiente genera problemas como: 1) la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales, por lo que los hidrocarburos aromáticos son contaminantes comunes en el suelo y en la tierra, 2) la selección del tratamiento adecuado de las aguas residuales y 3) los efectos tóxicos sobre los humanos y los seres vivos en general ya que son carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos (Shrivastava, 2011), por ello, el interés de conocer sus niveles en el ambiente y son considerados como contaminantes prioritarios, por la Agencia Norteamericana de Protección del Medioambiente (US-EPA) y la Internatinal Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 2010).

Los microorganismos dispersados por el aire tienen una gran importancia biológica y económica debido a que estos pueden producir enfermedades en plantas, animales y humanos; causan alteración de alimentos y materiales orgánicos, además de contribuir al deterioro y corrosión de monumentos, así como de metales.

La Microbiología del aire inició en el siglo XIX, con Pasteur y Miquel quienes diseñaron métodos para estudiar los microorganismos en este ambiente y descubrir la causa de algunas enfermedades. Desde entonces numerosos investigadores han trabajado en este campo tanto en el aire exterior como en recintos cerrados. Las enfermedades transmitidas por el aire, producidas por bacterias, virus y hongos, son, entre otras las respiratorias (neumonía, tosferina, tuberculosis, legionelosis, resfriado, gripe), sistémicas (meningitis, sarampión, varicela, micosis) y alérgicas (De la Rosa et al., 2002)

Por tal motivo, el presente trabajo busca contribuir al conocimiento de la diversidad de bacterias presentes en el aire, provenientes de tres estaciones de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (Oxtotitlan y Ceboruco)

## **VII. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar bacterias viables colectadas con filtros de fibra de vidrio en la RAMAT, para caracterizarlas e identificarlas

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad de los cultivos bacterianos para utilizar compuestos aromáticos como fuentes de carbono y energía
- Determinar factores de patogenicidad en los aislados bacterianos

## VIII. METODOLOGÍA UTILIZADA

---

**Sitio de muestreo:** Se trabajó con dos sitios de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico del Valle de Toluca (Oxtotitlán y Ceboruco). Se utilizaron filtros de fibra de vidrio con muestras colectadas el 26 de Marzo del 2018 y se conservadas en refrigeración a 4°C.

**Procesamiento de las muestras:** Con los filtros de fibra de vidrio, en condiciones estériles, se tomó una fracción ( $\frac{1}{4}$  del filtro), el cual fue colocado en caldo nutritivo, a partir de este cultivo, se hicieron diluciones de hasta  $10^{-3}$  con pipetas serológicas estériles de 1.0 mL en tubos de ensaye que contenían 9.0 mL de solución salina al 0.08%. Con 0.1 mL de cada dilución se inocularon cajas Petri conteniendo agar nutritivo; los cultivos fueron incubados durante 24 h a 28°C

**Aislamiento y obtención de cultivos puros:** Las colonias bacterianas crecidas en agar nutritivo, se seleccionaron al azar, tratando de aislar las colonias más separadas, con diferente forma y color. Se sembraron en cajas Petri con agar nutritivo, dividida en 8 partes. La pureza de los cultivos fue comprobada mediante observaciones al microscopio óptico, previa tinción de Gram. Una vez que se verificó la pureza de los cultivos bacterianos, estos fueron conservados en viales que contenían agar nutritivo inclinado.

### Utilización de compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía

Se analizó la capacidad de los cultivos bacterianos para utilizar compuestos orgánicos (alcoholes y ácidos) como única fuente de carbono y energía. Para ello, se utilizó un medio base (tabla 1), después de ser esterilizado por autoclave (121°C durante 20 minutos), se le adicionó, por separado, 5.0 mL de los siguientes compuestos orgánicos: ácido butírico, ácido propiónico, alcohol etílico, acetona, 1-butanol, ácido clorhídrico, metanol, 2-propanol, tolueno y xileno. Se utilizó medio mínimo (base) como blanco esto es, sin fuente de carbono.

Tabla 1. Composición del Medio Base enriquecido con los sustratos orgánicos (Núñez-Cardona comunicación personal)

Compuesto	Cantidad
Agua destilada	1000 mL
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 mL
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.0 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.4 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{NaCl}_2$	20.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Solución elementos traza	1.0 mL
Solución cloruro férrico	1.0 mL

## **Producción de enzimas extracelulares**

Se prepararon medios de cultivo para determinar si los cultivos puros eran capaces de producir las enzimas extracelulares: ADNasa, amilasa, catalasa, lipasa, gelatinasa, ureasa, así como su capacidad de hemólisis, todas en cajas Petri.

Pruebas Bioquímicas: Se prepararon los medios para determinar en los cultivos bacterianos la capacidad de reducir nitratos y nitritos; de utilizar como fuentes de carbono y energía al citrato, glucosa, lactosa, manitol, fructuosa, maltosa, sacarosa y sorbitol; la producción de sulfhídrico, indol, esto último en medio SIM.

## **IX. ACTIVIDADES REALIZADAS**

<i>Tabla 1. ETAPAS</i>
Obtención de cultivos bacterianos a partir de su captación en filtros de fibra vidrio (enero de 2018)
Aislamiento y obtención de cultivos puros
Pruebas para determinar la capacidad de los cultivos de producir enzimas extracelulares y de crecer en compuestos aromáticos
Determinación de factores de patogenicidad en los cultivos bacterianos

## **X.- OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS;**

Se lograron aislar bacterias viables colectadas con filtros de fibra de vidrio de dos estaciones (Oxtotitlan y Ceboruco) de la RAMAT. Por cuestiones de pandemia (COVID-19) el tercer sitio de muestreo no se completó.

Se determinó la capacidad de los cultivos bacterianos para utilizar compuestos aromáticos como fuentes de carbono y energía; se determinaron los factores de patogenicidad en los aislados bacterianos así como su capacidad de producir enzimas extracelulares

## **XI. RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

En la estación de Oxtotitlan, los ocho cultivos puros obtenidos colonias transparentes, con forma celular de cocos (1 célula) y todos fueron Gram positivos. Como puede observarse en la figura 1, los ocho cultivos son capaces de producir amilasa y ADNasa, además tienen capacidad de producir hemólisis.

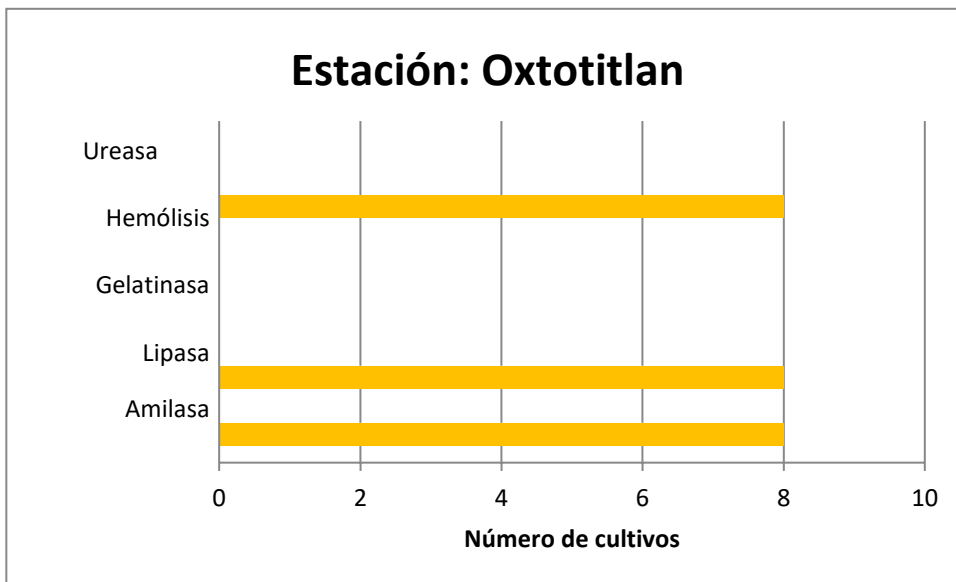


Figura 1. Número de cultivos bacterianos, de la estación Oxtotitlan con capacidad de producir enzimas extracelulares

Por otro lado, de los 32 cultivos provenientes de Ceboruco, el 100% presentaron un color crema, dos con forma de coco (Gram positivos) y 30 de cocobacilo (Gram negativo), todos con arreglo unicelular.

De los 32 cultivos, únicamente se alcanzó a realizar pruebas bioquímicas a 16, en la figura 2 se presentan los resultados. Los cultivos que presentaron forma de cocos y Gram positivos, cuatro fueron capaces de producir gelatinasa, amilasa y ADNasa y con actividad hemolítica, en tanto que 14 cultivos con forma de cocobacilos (todos Gram negativos), produjeron gelatinasa, amilasa y ADNasa.

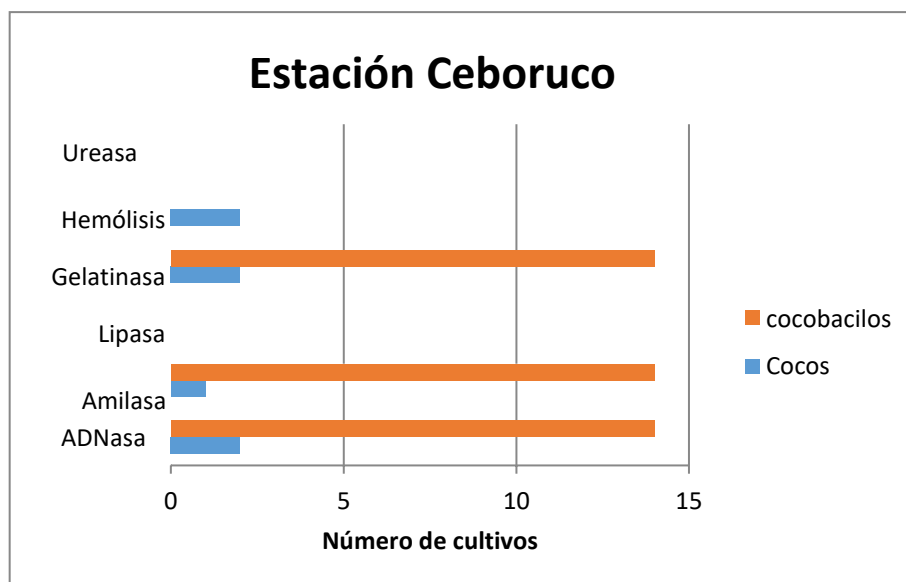


Figura 2. Número de cultivos bacterianos, de la estación Ceboruco con capacidad de producir enzimas extracelulares y con capacidad de hemólisis

Los resultados relacionados a la capacidad de los cultivos bacterianos, de la

estación Oxtotitlan con capacidad de utilizar compuestos orgánicos (alcoholes y ácidos) como única fuente de carbono y energía, se muestran en la figura 3. Como puede observarse, los cultivos bacterianos provenientes de esta estación utilizaron principalmente, como fuente de carbono y energía al 2-propanol y alcohol etílico, seguido de metanol y acetona. Estos compuestos son comúnmente utilizados para desinfectar superficies en laboratorios y hospitales, por lo que los microorganismos se hacen resistentes a estos, adaptándose para sobrevivir gracias a su capacidad de para utilizarlos como fuentes de carbono y energía.

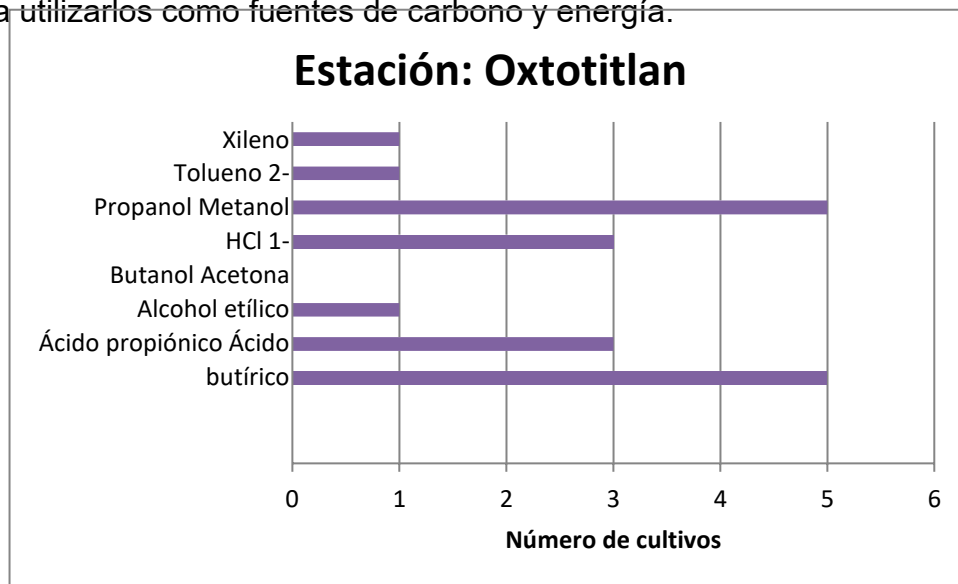


Figura 3. Número de cultivos bacterianos, de la estación Oxtotitlan capaces de utilizar compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía

Por último, para el caso de las pruebas bioquímicas, los ocho cultivos provenientes de la estación Oxtotitlan fueron capaces de catabolizar a la sacarosa, maltosa, fructuosa, lactosa y glucosa. Los azúcares, tanto en forma de monosacáridos, como disacáridos y polisacáridos, constituyen la fuente de carbono ideal para la producción industrial de microorganismos debido a su bajo costo (Madigan et al., 2004)

## ESTACIÓN OXTOTITLAN

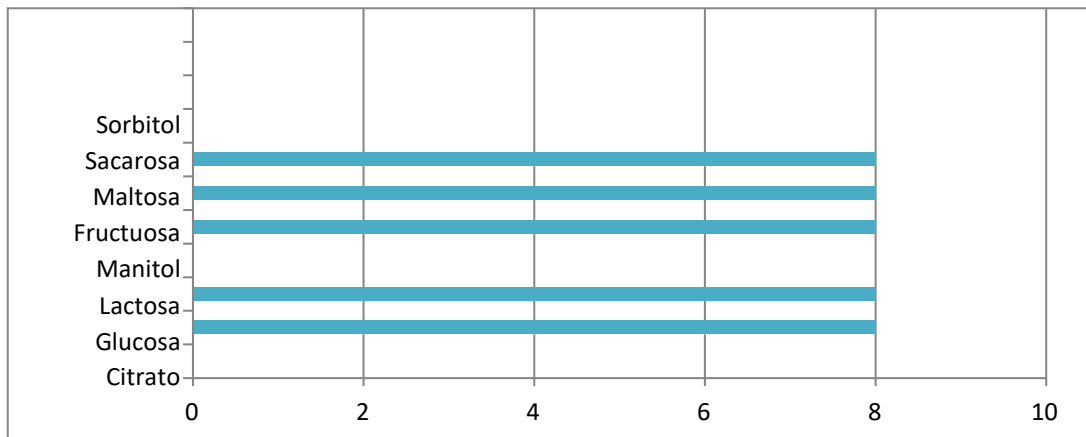


Figura 4. Número de cultivos, provenientes de Oxtotitlan, que catabolizan a los sustratos ensayados

Para el caso de Ceboruco, se realizaron pruebas bioquímicas a 16 cultivos bacterianos puros. Los resultados mostrados en la figura 5, resaltan la utilización de lactosa por parte los cocos Gram positivos y la utilización de fructuosa por parte de los cocobacilos Gram negativos, sin embargo, solo dos de los 14 cocobacilos tienen la capacidad de utilizar este carbohidrato como fuente carbono de energía, seguido de maltosa, donde únicamente uno la utiliza.

Las bacterias de ambas estaciones no produjeron indol ni sulfhídrico. La actividad de las bacterias sobre aminoácidos que contienen azufre frecuentemente produce liberación de sulfhídrico, lo cual se demuestra empleando sales de metales pesados como el hierro. El sulfhídrico reacciona con tales metales dando una coloración oscura al medio de cultivo, donde se ha demostrado que este ácido es considerado por diferentes investigadores como el principal causante de los problemas de corrosión bacteriana en los sistemas de distribución y almacenamiento de aguas naturales (Duque et al. 2004)

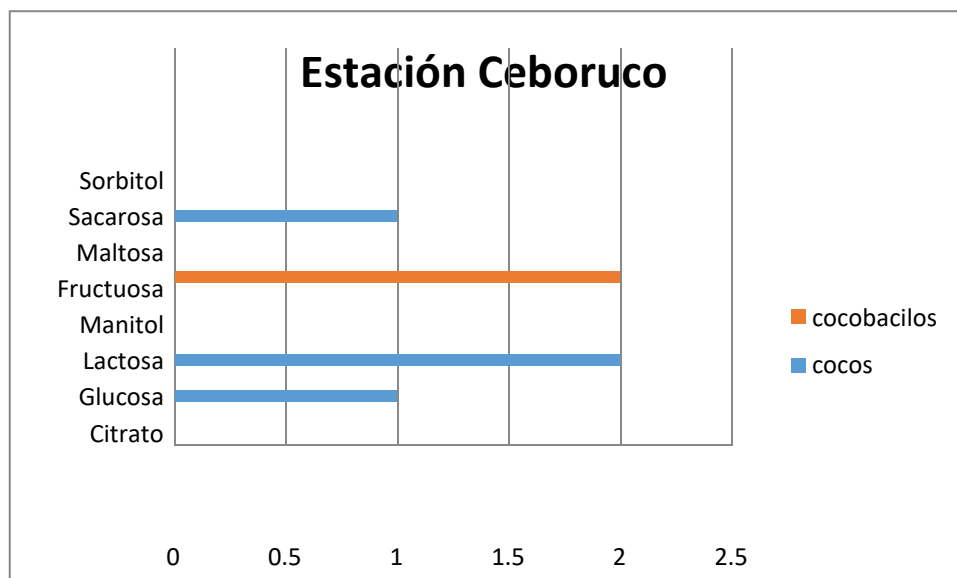


Figura 5. Número de cultivos, provenientes de Ceboruco, que catabolizan a los sustratos ensayados

## **CONCLUSIONES**

Se observó cómo las bacterias provenientes de Oxtotitlan prefieren utilizar principalmente alcoholes como el 2-propanol y alcohol etílico, como fuentes de carbono y energía, en vez de compuestos aromáticos. Los alcoholes utilizados por las bacterias de este sitio se utilizan principalmente en laboratorios, hospitales e industrias como desinfectantes. El uso de los microorganismos con la capacidad de degradar este tipo de compuestos, son una herramienta para una tecnología limpia y sustentable con el medioambiente, permitiendo que la biodegradación sea un método práctico y eficaz para disminuir el problema de la contaminación. La producción de enzimas extracelulares es producida por bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas y es independientemente de su morfología celular.

Se observaron diferencias en cuanto a la diversidad morfológica de las bacterias, en la estación Oxtotitlan, se detectó solo una forma celular (cocos), mientras que en Ceboruco fueron dos (cocos y cocobacilos).

## **XII. RECOMENDACIONES**

---

Las pruebas realizadas en el presente trabajo son reproducibles, ya que se han utilizado para diferentes estudios de licenciatura y de maestría, por lo que son métodos recomendables y confiables. Sin bien no hubo crecimiento con distintos sustratos, se pueden realizar modificaciones en las concentraciones para futuros ensayos.

## **XII. REFERENCIAS**

---

De la Rosa M, Mosso M, Ullán C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental*, (5): 375-402.

Duque Z, Chicote E, Sarró M, Moreno D, de Romero M, Pérez O. (2004). Corrosivity of H<sub>2</sub>S-producing bacteria isolated from formation waters used in secondary crude-oil recovery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 27(2): 83-92.

Madigan, MT, Martinko, JM, Parker J. (2004). *Brock Biología de los microorganismos*. P. imprenta: Pearson. Madrid; Buenos Aires. (ESAR)

Méndez-Puentes CA, Camacho-Suárez JG, Echeverry-Hernández S. (2015). Identificación de bacterias y hongos en el aire de Neiva, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 17(5):728-737.

Çınar Ö. (2004) Biodegradation of central intermediate compounds produced from biodegradation of aromatic compounds. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(5):341-345.

Quijano, MJ, Quijano A, Meléndez I. (2014). Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (haps) en el PM<sub>2.5</sub> del aire de Pamplona-Colombia. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1):25-33.

Shrivastava R, Phale P. (2011) Biodegradation of mono-aromatic compounds by bacteria. *Microorganisms in Environmental Management*: 451-462.



## **XII. ANEXOS**

---

### **Preparación de medios de cultivo**

- 200 mL Caldo Nutritivo (vaciar en tubos de ensaye)

Pesar 1.6 g de caldo nutritivo y disolver en 200 mL de agua destilada

- 200 mL agar nutritivo + rojo de fenol/para cajas Petri

Pesar 3.0 g de agar bacteriológico, 1.6 g de caldo nutritivo y 3.0 g de base caldo Rojo de Fenol.

- 500 mL de agar nutritivo/ para cajas Petri

Pesar 7.5 g de agar bacteriológico y 4.0 g de caldo nutritivo.

### **Tinción de Gram (modificado por Hucker (1957))**

Reactivo de Cristal Violeta-Oxalato de amonio

<b>Solución A</b>		<b>Solución B</b>	
Cristal violeta	0.2 g	Oxalato de amonio	0.8 g
Alcohol etílico al 96%	200 mL	Agua destilada	80 mL

\*Combinar las soluciones, filtrar y dejar reposar durante 24 horas.

### **Lugol**

<b>Solución A</b>		Agua destilada	240 mL
Iodo (cristales)	1.0 g	<b>Solución B</b>	
Ioduro de potasio	2 g	NaHCO <sub>3</sub> al 5%	60 mL

\*Combinar las soluciones, filtrar y dejar reposar durante 24 horas

## Técnica para tinción de Gram

1. Hacer un frotis del cultivo y dejar secar.
2. Cubrir la preparación con la solución de cristal violeta-oxalato de amonio durante un minuto.
3. Lavar con agua.
4. Aplicar la solución de Lugol durante un minuto.
5. Lavar con agua.
6. Decolorar con alcohol etílico al 95% durante 45 segundos.
7. Lavar con agua.
8. Aplicar colorante de contraste (safranina) durante 30 segundos.
9. Lavar con agua.
10. Dejar secar.
11. Observar al microscopio de campo claro 100x

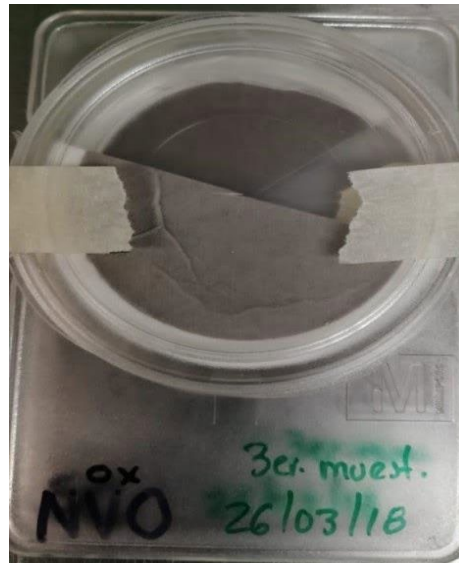


Figura 6. Filtro de fibra de vidrio con la muestra

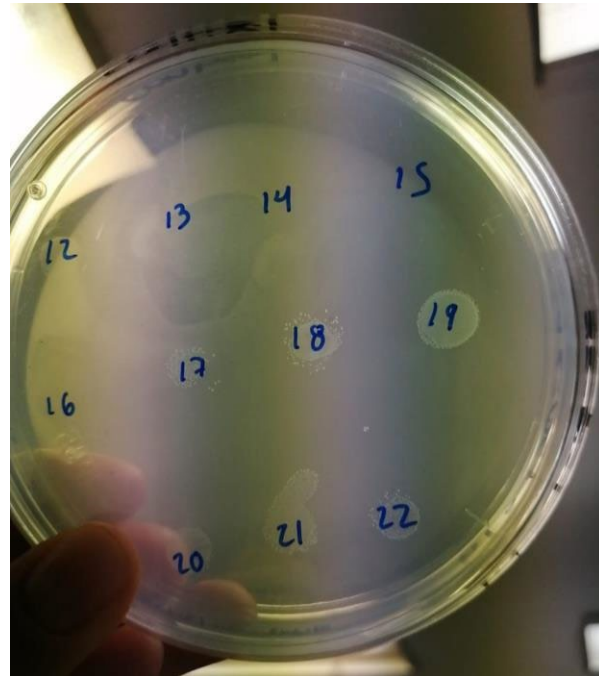


Figura 7. Crecimiento de los cultivos bacterianos en medio preparado con 2-propanol.



Figura 8. Pruebas Bioquímicas aplicadas a los cultivos bacterianos

## **REUNIONES ACADÉMICAS ESPECIALIZADAS DONDE SE DIFUNDIERON LOS RESULTADOS:**

Linda Zafiro Yáñez Arellano, María Teresa Núñez Cardona, Cecilia Chula Quinto, Raúl Venancio Díaz Godoy. Capacidad de cultivos bacterianos provenientes de Oxtotitlan y Ceboruco (Estado de México) para utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Encuentro Académico Día del Biólogo 2020. UAM-X, 24 de enero de 2020.

Linda Zafiro Yáñez Arellano, María Teresa Núñez Cardona, Cecilia Chula Quinto, Raúl Venancio Díaz Godoy. Producción de gelatinasas (proteasas) por bacterias aerotransportadas. XVII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, CIO (León Guanajuato), 21-25 de septiembre de 2020.

Cecilia Chula Quinto, María Teresa Núñez Cardona, Linda Zafiro Yáñez Arellano, Raúl Venancio Díaz Godoy, Jaime Moreno Alcántara. Utilización de alcoholes como fuente de carbono y energía por cultivos bacterianos provenientes del aire del Valle de Toluca, (Estado de México). XVII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, CIO (León Guanajuato), 21-25 de Septiembre 2020.

Cecilia Chula Quinto, María Teresa Núñez Cardona, Linda Zafiro Yáñez Arellano, Raúl Venancio Díaz Godoy. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aerotransportadas del Valle de Toluca. Encuentro Académico Día del Biólogo 2020. UAM-X, 24 Enero 2020.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana por brindarme las instalaciones y enseñanzas durante este largo camino.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento al proyecto 266751 y al Doctor Raúl Venancio Díaz Godoy, responsable Técnico de este, por la beca otorgada para la realización de este servicio social (29876)

Quiero agradecer a la doctora María Teresa Núñez Cardona (responsable técnica en la UAM del proyecto SEP-CONCyT 266751) quien estuvo presente a lo largo del proyecto, por sus enseñanzas, observaciones, tiempo y paciencia, su conocimiento invaluable fue parte esencial para llevar a cabo este proyecto de servicio social