

Universidad del Mar

Campus Puerto Ángel



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO DEGRADADOR DE METANOL A PARTIR DE UN BIOFILTRO

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de

Licenciado en Biología Marina

Presenta:

Andrea Selene Geronimo Meza

Dirigido por:

M. en C. Yolanda Huante González

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, junio de 2018

RESUMEN

La contaminación por emisiones de compuestos orgánicos volátiles ha sido un problema difícil de tratar, sin embargo se han desarrollado tecnologías entre las que se puede mencionar a la biofiltración. En este proceso los microorganismos son los responsables de la degradación de los contaminantes volátiles, su importancia radica en que llevan a cabo bioconversiones, producción de biomasa y la oxidación parcial o total de algunos compuestos dando lugar a la formación de productos con mayor valor económico y menor implicación negativa para el ambiente. En este trabajo se realizaron cuatro muestreos para aislar e identificar microorganismos presentes en el consorcio microbiano, a partir de la biopelícula de un biofiltro utilizando como fuente de carbono el metanol. Para el arranque del biofiltro el material de soporte utilizado fue perlita, éste se inoculó con lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad del Mar. Se identificaron por métodos moleculares un total de ocho especies de bacterias, tres hongos y una levadura, además se realizó la cuantificación de UFC (unidades formadoras de colonias) para cada módulo entre los cuales no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de muestreo (196×10^5 - 93×10^6 y 64×10^3 - 9×10^4 UFC/g para el módulo superior y 146×10^6 - 53×10^6 y 96×10^3 - 9×10^4 UFC/g para el módulo inferior para bacterias y hongos respectivamente) y se generaron árboles filogenéticos para todas las cepas identificadas. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Fusarium*, *Candida* y *Alternaria* son los géneros identificados en este estudio con antecedentes de posibles degradadoras de metanol.

Palabras clave: Biofiltración, compuestos orgánicos volátiles, *Fusarium* metilotrofos, microorganismos, *Pseudomonas*.

A mis padres porque sin su amor y apoyo no sería lo que hoy he logrado.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la UMAR por la excelente formación académica que me ha brindado.

A mi mamá por ser la mejor y estar conmigo en todo momento, a mi papá por comprenderme y apoyarme en todo.

A mi directora, la maestra Yolanda Huante) por todo su apoyo y comprensión, por guiarme y buscar siempre lo mejor para mí.

A la Dra. Ivonne que a pesar de tener mucho trabajo encontró un espacio para apoyarme en la elaboración de esta tesis.

A mis revisores, Dr. Aitor, Dr. Noe y Dra. Amayali Becerril por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis.

A todos mis profesores porque de cada uno me llevo un gran recuerdo.

A mis hermanos, mi hermana Keyli y mi familia porque siempre se preocuparon por mi bien.

A Karla y Ale porque a pesar de la distancia nuestro cariño y amor sigue tan grande como la primera vez que nos despedimos.

A Yane, Lizbeth, Ado y Toto porque fueron de gran apoyo para tener la fuerza que necesité para estar lejos de casa.

A Pablo y Naye por todo su amor y cariño, recuerden que somos y seremos tríoperfecto.

A mi tuti Caro porque me entiendes y me apoyas siempre, eres la hermana que elegí.

A Hugo por el apoyo, la paciencia y el amor que me has dado.

A Jaimito por ser mi bffo, por toda tu ayuda en el laboratorio y por acompañarme en buenos y malos momentos.

A Lore por todas las caminatas a las 6 am de Cerrada de la luna a Zipol saja

A Anibal por las risas y buenos momentos, siempre estarás en mi corazón.

A Arturo por todo lo que vivimos y aprendimos juntos, por cuidarme y hacerme reír siempre.

A Sadot por ser apoyarme y estar conmigo en muchos momentos buenos y también malos.

A James por ser un buen papá y cuidarme siempre.

A Lili y Edgar por su gran ayuda en la elaboración de los árboles.

A todos mis buenos amigos (Emilio, Edgar, Reno, Miriam, Ema, Pau, Chuc, Jaz, Nayibe, Xochitl, Yael) porque cada uno de ustedes son parte importante en mi vida.

Y a todas las personas que me aprecian y celebran conmigo este logro.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 CONTAMINACIÓN POR COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES	1
I.2 METANOL	1
I.2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL METANOL	1
I.2.2 REACTIVIDAD QUÍMICA	1
I.2.3 USOS DEL METANOL.....	2
I.2.4 METABOLISMO DEL METANOL.....	2
I.2.5 INTOXICACIÓN POR METANOL	3
I.3 PROCESO DE ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES.....	3
I.4 MICROORGANISMOS METILOTROFOS	4
I.5 BACTERIAS METILOTROFAS	4
I.5.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS METILOTROFAS	4
I.5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE BACTERIAS METILOTROFAS	5
I.6 HONGOS METILOTROFOS	6
I.6.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS.....	6
I.7 HÁBITAT DE LOS METILOTROFOS	7
I.8 METILOTROFOS EN LA DEGRADACIÓN DE METANOL	7
I.8.1 LA ALCOHOL DESHIDROGENASA INDEPENDIENTE DE NAD	8
I.8.2 LA ALCOHOL DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE NAD	8
I.8.3 LA ALCOHOL OXIDASA.....	9
I.9 DILUCIÓN DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	9
I.10 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS..	10
I.10.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	11
I.11 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.....	13

II. ANTECEDENTES	14
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
V. OBJETIVO GENERAL	19
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	20
VII.1 CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS	20
VII.1.1 MEDIO MINERAL	21
VII.2 TOMA DE MUESTRA	21
VII.3 PREPARACIÓN DE DILUCIONES DECIMALES.....	22
VII.4 AISLAMIENTO BACTERIANO.....	22
VII.5 AISLAMIENTO DE HONGOS Y LEVADURAS.....	23
VII.6 MICROCULTIVO DE HONGOS Y LEVADURAS	23
VII.7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS	23
VII.8 IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE BACTERIAS AISLADAS DEL BIOFILTRO.....	24
VII.8.1 OXIDASA	25
VII.8.2 CATALASA.....	25
VII.8.3 OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN HUGH-LEIFSON (OF).....	26
VII.8.4 MOVILIDAD.....	26
VII.8.5 TINCIÓN GRAM.....	26
VII.9 IDENTIFICACIÓN POR BIOLOGÍA MOLECULAR.....	27
VII.10 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	27
VII.11 CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS MÉTODO A LARGO PLAZO.....	27
VII.12 CONSERVACIÓN DE LOS HONGOS.....	28
VIII. RESULTADOS	29
VIII.1 MORFOLOGÍA, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, TAXONOMÍA, PATOGÉNESIS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE BACTERIAS.	29

VIII.1.1	CEPA ABSIC (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	29
VIII.1.1.1	Identificación molecular	30
VIII.1.1.2	Taxonomía	30
VIII.1.1.3	Patogénesis	30
VIII.1.1.4	Importancia biotecnológica	31
VIII.1.2	CEPA ALTC (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	31
VIII.1.2.1	Identificación molecular	32
VIII.1.2.2	Taxonomía	32
VIII.1.2.3	Patogénesis e importancia biotecnológica	33
VIII.1.3	CEPA AML (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	33
VIII.1.3.1	Identificación molecular	34
VIII.1.3.2	Taxonomía	34
VIII.1.3.3	Patogénesis	35
VIII.1.3.4	Importancia biotecnológica	35
VIII.1.4	CEPA APTH (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	35
VIII.1.4.1	Identificación molecular	36
VIII.1.4.2	Taxonomía	37
VIII.1.4.3	Patogénesis e importancia biotecnológica	37
VIII.1.5	CEPA APSP1371 (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	37
VIII.1.5.1	Taxonomía	38
VIII.1.5.2	Patogénesis	38
VIII.1.5.3	Importancia biotecnológica	38
VIII.1.6	CEPA APM1373 (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	39
VIII.1.6.1	Identificación molecular	39
VIII.1.6.2	Taxonomía	40
VIII.1.6.3	Patogénesis	41
VIII.1.6.4	Importancia biotecnológica	41
VIII.1.7	CEPA ACBIC (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	41
VIII.1.7.1	Identificación molecular	42
VIII.1.7.2	Taxonomía	42
VIII.1.7.3	Patogénesis e importancia biotecnológica	43
VIII.1.8	CEPA APPHC (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	43
VIII.1.8.1	Identificación molecular	43
VIII.1.8.2	Taxonomía	44

VIII.1.8.3	Patogénesis	45
VIII.1.8.4	Importancia biotecnológica	45
VIII.2	MORFOLOGÍA, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, TAXONOMÍA, PATOGÉNESIS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE HONGOS	45
VIII.2.1	CEPA AFSL (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS).....	45
VIII.2.1.1	Identificación molecular.....	46
VIII.2.1.2	Taxonomía	47
VIII.2.1.3	Patogénesis	47
VIII.2.1.4	Importancia biotecnológica	48
VIII.2.2	CEPA AALALT (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS).....	48
VIII.2.2.1	Identificación molecular.....	49
VIII.2.2.2	Taxonomía	50
VIII.2.2.3	Patogénesis	51
VIII.2.2.4	Importancia biotecnológica	51
VIII.2.3	CEPA ACGL (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS).....	51
VIII.2.3.1	Identificación molecular.....	51
VIII.2.3.2	Taxonomía	52
VIII.2.3.3	Patogénesis	53
VIII.2.3.4	Importancia biotecnológica	53
VIII.2.4	CEPA ATPHI (CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS)	53
VIII.2.4.1	Identificación molecular.....	54
VIII.2.4.2	Taxonomía	55
VIII.2.4.3	Patogénesis	56
VIII.2.4.4	Importancia biotecnológica	56
VIII.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	56
IX.	DISCUSIÓN	61
X.	CONCLUSIONES	64
XI.	REFERENCIAS	65
ANEXO I.	MEDIOS DE CULTIVO BACTERIOLÓGICOS	74
ANEXO II.	MEDIOS DE CULTIVO PARA HONGOS Y LEVADURAS	78
ANEXO III.	TINCIÓN GRAM.....	80

ANEXO IV. REACTIVOS	81
ANEXO V. CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A LAS BACTERIAS.....	83
ANEXO VI. CEPAS DE BACTERIAS USADAS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS BACTERIAS, SE MUESTRA LA DESIGNACIÓN DE LA CEPA, EL NÚMERO DE ACCESO EN EL GENBANK	84
ANEXO VII. CEPAS DE HONGOS USADAS EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS HONGOS, SE MUESTRA LA DESIGNACIÓN DE LA CEPA, EL NÚMERO DE ACCESO EN EL GENBANK	88
ANEXO VIII. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS FISIOLÓGICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo del metanol en humanos	2
Figura 2. Clasificación de bacterias metilotrofas	5
Figura 3. Asimilación del metanol a dióxido de carbono	9
Figura 4. Estructura del biofiltro	20
Figura 5. Descripción gráfica del procedimiento de la realización de las diluciones	22
Figura 6. Técnica de siembra por estría cruzada	25
Figura 7. Catalasa negativa o positiva.....	25
Figura 8. <i>Bacillus sirlalis</i> : A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas (Gram 100x).....	29
Figura 9. Árbol filogenético de la cepa Absic, por el método de Neighbor-joining	30
Figura 10. <i>Leucobacter tardus</i> A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas (Gram 100x)	31
Figura 11. Árbol filogenético de la cepa Altc, por el método de Neighbor-joining	32
Figura 12. <i>Micrococcus luteus</i> A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas 100x.....	33
Figura 13. Árbol filogenético de la cepa Aml, por el método de Neighbor-joining	34
Figura 14. <i>Paenibacillus typhae</i> A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas	35
<i>Figura 15. Árbol filogenético de la cepa Apth, por el método de Neighbor-joining</i>	<i>36</i>
Figura 16. <i>Pseudomonas</i> sp A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas 100x.....	38
Figura 17. <i>Pseudomonas mendocina</i> A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas 100x	39
Figura 18. Árbol filogenético de la cepa Apsp1371 y Apm1373, por el método de Neighbor-joining	40
Figura 19. <i>Caenispirillum bisanense</i> A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas 100x	41
Figura 20. Árbol filogenético de la cepa Acbic por el método de Neighbor-joining	42
Figura 21. <i>Pannonibacter phragmitetus</i> A) Características macroscópicas (Agar soya tripticasa) B) Características microscópicas 100x	43

Figura 22. Árbol filogenético a de la cepa Apphc por el método de Neighbor-joining	44
Figura 23. A) Características macroscópicas (agar rosa de bengala) y B), C) y D) microscópicas de <i>Fusarium solani</i>	46
Figura 24. Árbol filogenético de la cepa Afsl por el método de Neighbor-joining .	47
Figura 25. A) y B) Características macroscópicas (Agar papa dextrosa) C) y D) microscópicas de <i>Alternaria alternata</i>	49
Figura 26. Árbol filogenético de la cepa Aalalt por el método de Neighbor-joining	50
Figura 27. Árbol filogenético de la cepa Acgl por el método de Neighbor-joining..	52
Figura 28. A) y B) Características macroscópicas (agar papa dextrosa) C) y D) microscópicas de <i>Talaromyces pinophilus</i>	54
Figura 29. Árbol filogenético de la cepa Atphi por el método de Neighbor-joining..	55
Figura 30. UFC/g de bacterias obtenidas para cada estrato	57
Figura 31. UFC/g de hongos obtenidas para cada estrato	57
Figura 32. UFC/g de bacterias y hongos del estrato superior	59
Figura 33. UFC/g de bacterias y hongos del estrato inferior	59
Figura 34. Regresión lineal de bacterias respecto al pH.....	60
Figura 35. Regresión lineal de hongos respecto al pH.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Media y desviación estándar de las concentraciones de bacterias y hongos para ambos estratos.....	56
Tabla 2. Cuantificación bacteriana UFC/g durante el periodo de muestreo.....	58
Tabla 3. Cuantificación fúngica UFC/g durante el periodo de muestreo.....	58