

Evaluación de la presencia de bacterias reductoras de hierro en el sedimento del Lago de Amatitlán, Guatemala

María Valeria Ochoa Elías, och18183@uvg.edu.gt / Rodrigo Mejicanos Cifuentes, mej18088@uvg.edu.gt / José Daniel de Paz Gil, Margarita Franco Cifuentes

Departamento de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias y Humanidades, Universidad del Valle de Guatemala.

RESUMEN: La creciente contaminación del medio ambiente ha llevado a buscar alternativas para reducir sus efectos, que comprometen la vida de los organismos en los ecosistemas. Una de estas alternativas es el uso de microorganismos para degradar o eliminar contaminantes ambientales. En este estudio se evaluó la presencia de bacterias reductoras de hierro en el lago de Amatitlán, ubicado en el departamento de Guatemala para en un futuro comprobar su efecto de biorremediación en acuíferos contaminados. Para la investigación se recolectó sedimento de las orillas del lago y se inoculó en un medio selectivo con Fe(III) en condiciones anaeróbicas. Luego de 14 días se realizó una prueba de magnetismo al precipitado por medio de imanes y una tinción Gram para la verificación de la morfología de las bacterias. Las bacterias encontradas en los medios anaeróbicos fueron Gram negativo, lo que coincide con la morfología del género *Geobacter* sp. Asimismo, todos los medios inoculados y anaeróbicos precipitaron un sólido negro que podía ser atraído por un imán, lo que demuestra que puede tratarse de magnetita; mineral reducido por *Geobacter* sp a partir del Fe(III). Al momento de este estudio no hay reportes de aislamientos en territorio guatemaltecos de este tipo de bacterias, las cuales tienen potencial de degradación de contaminantes como metales, en sistemas acuíferos y sedimentos acuáticos. Por lo que es importante evaluar la presencia de estas bacterias, en sedimento húmedos para su posible uso en métodos de bioremediación.

PALABRAS CLAVE: *Geobacter*, reducción de Fe(III), anaeróbico, biorremediación, magnetita.

Evaluation of the presence of iron reducing bacteria in the sediment of Lake Amatitlán, Guatemala

ABSTRACT: The increasing environmental pollution has led to the search for alternatives to reduce its effects, which compromise the life of organisms in ecosystems. One of these alternatives is the use of microorganisms to degrade or eliminate environmental pollutants. In this study, the presence of iron-reducing bacteria in Lake Amatitlán, located in the department of Guatemala, was evaluated in order to test in the future its bioremediation effect in contaminated aquifers. A sample of sediment from the shores of the lake was inoculated in a selective medium with Fe (III) under anaerobic conditions. After 14 days, a magnetism test on the precipitate by means of magnets and a Gram stain to verify the morphology of the bacteria were performed. Bacteria found in the anaerobic media were Gram negative, which coincides with the morphology of the genus *Geobacter* sp. Likewise, all the inoculated and anaerobic media precipitated a black solid mass that could be attracted by a magnet, which shows that it may be magnetite; a mineral reduced by *Geobacter* sp from Fe (III). At the time of this study, and according to our information, there are no reports of isolations in Guatemalan territory of this type of bacteria, which have the potential for pollutants degradation, such as metals, in aquifer systems and aquatic sediments. Therefore, it is important to evaluate the presence of these bacteria in Guatemalan wet sediments for their possible use in bioremediation efforts.

KEY WORDS: *Geobacter*, Fe(III) reduction, anaerobic, bioremediation, magnetite.

Introducción

En los últimos años, ha aumentado el interés en las propiedades bacterianas pues se ha demostrado que su metabolismo es clave para degradar o eliminar contaminantes ambientales (Pieper y Reineke, 2000). Este proceso es conocido como biorremediación e incluye a todos los microorganismos capaces de capturar, degradar u oxidar compuestos tóxicos (Das *et al.* 2016; Pandey *et al.* 2014). Muchos de estos compuestos tóxicos se acumulan en el ecosistema y contienen elementos metálicos, como hierro, cromo y manganeso, que en altas concentraciones son perjudiciales para el medio ambiente (Morcillo *et al.* 2016; Nagajyoti *et al.* 2010). La reducción de hierro (III) es un proceso importante para la degradación de contaminantes, como el petróleo, ácidos orgánicos, en sistemas y sedimentos acuáticos. Se ha demostrado que microorganismos del género *Geobacter sp.*, son capaces de reducir el hierro (III) (Coates, Philips, Lonergan, Jenter y Lovley, 1996).

Las *Geobacter sp.* son bacterias Gram negativo en forma de bastón, con un tamaño aproximado de 1.2 - 2.0 μm de longitud, que poseen flagelos y pili. Tienen características similares a *Desulfuromonas*, *Geopsychrobacter* y *Pelobacter* las cuales son bacterias que recolectan electricidad de materia orgánica en aguas residuales y sedimentos. Estas habitan de forma natural en suelos, sedimentos acuáticos, humedales y ambientes subterráneos. Tienen un papel biogeoquímico importante en la diversidad de entornos naturales, ya que pueden transformar la energía química en energía eléctrica (Coates *et al.* 1996; Methe *et al.* 2003). A pesar de que se han aislado bacterias del género *Geobacter*, la principal limitante es que son microorganismos estrictamente anaeróbicos, lo que dificulta su aislamiento, pues es necesario reconstruir las condiciones sin oxígeno (Mori y Kamagata, 2014). Asimismo, no parece haber estudios donde se aisle este género de bacterias en Guatemala.

La importancia de este estudio reside en las posibilidades de encontrarle a la bacteria *Geobacter* aplicaciones útiles de biorremediación contra la creciente contaminación proveniente del sector textil y agroindustrial, que compromete la vida de los organismos en el bioma tanto en las inmediaciones del lago como en otras partes del país. Esta investigación busca evaluar, mediante el uso de un medio selectivo en condiciones anaeróbicas, si hay presencia de bacterias del género *Geobacter* en sedimentos contaminados que se encuentran en las orillas del lago de Amatitlán.

Materiales y Métodos

Recolección de muestra. Se recolectó sedimento de las orillas del lago de Amatitlán, Guatemala, Guatemala (14.466512,-90.566591) a 5 metros de la orilla y 15 cm de profundidad, la cual fue colocada en tubos cónicos estériles de 15 ml. Se taparon rápidamente los tubos cónicos para conservar el ambiente

anaeróbico y se colocaron en un recipiente con hielo para el traslado al laboratorio 24 horas después.

Preparación de la solución de vitaminas. Se disolvió una cápsula de multi-vitaminico B-complex 50 (the VitaminShoppe) en 250 ml de agua estéril. Se ajustó el pH hasta 6 agregando bicarbonato de sodio.

Preparación de la solución de elementos traza. Se preparó una solución de elementos traza que contenía, en 250 mL: 0.1800 g sulfato de zinc, 0.0316 g cloruro de níquel (II) hexahidratado, 0.1034 g cloruro de calcio dihidratado, 0.0226 g sulfato de potasio aluminio dodecahidratado, 3 g sulfato de magnesio heptahidratado, 0.0100 g molibdato de sodio dihidratado, 0.0106 g sulfato de cobre (II) pentahidratado, 0.0114 g tungstato de sodio, 0.1052 g sulfato ferroso heptahidratado y 1.0132 g cloruro de sodio.

Preparación del cloruro de hierro (III). Se preparó una solución de 100 ml de cloruro de hierro (III) a 0.4 M. Luego se agregó 100 ml de NaOH a 1.2 M para neutralizar el cloruro de hierro consiguiendo así un precipitado de color café. Luego se filtró al vacío usando filtros Whatmann No.5 para obtener el precipitado, el cual era cristales de hierro pobremente cristalizados.

Preparación de medio anaeróbico. Usando las soluciones anteriores se preparó el medio selectivo para *Geobacter spp.* usando el protocolo de DSMZ, realizando modificaciones de acorde con el los reactivos y equipo disponible (DSMZ, (s.f)). Se prepararon 250 ml de medio anaeróbico, el cual contenía 0.1 ml de la solución de vitaminas, 2.5 ml de la solución de elementos traza pasándolo través de un filtro Millipore Millex-GV de 0.22 mm, 0.7576 g de cloruro de amonio, 0.3045 g de bifosfato de sodio, 0.0549 g de cloruro de potasio, 1.2501 g de acetato de sodio, 1.2560 g de bicarbonato de sodio y 15 g de cloruro de hierro (III). Luego se aforó a 500 ml y se ajustó el pH de 7 a 8. Se colocó alrededor de 5 ml del medio en 10 frascos de hemocultivo de 20 ml previamente esterilizados en la autoclave (121 °C). Se taparon y sellaron con los tapones de frascos de hemocultivos para asegurar un medio sin oxígeno. Posteriormente se gasificó 20% con gas CO₂ y 80% N₂ para quitar cualquier rastro de oxígeno presente en la muestra, identificándose como frasco 1. El frasco 2 se dejó sin gasificar como un control negativo de precipitado magnético.

Inoculación de réplicas de la muestra. Se tomó 1 ml con una jeringa del líquido del sedimento y se inoculó en el frasco 1. Luego se disolvieron 20 g de la tierra recolectada en agua desgasificada para diluir la tierra, y se tomó 1 ml para inocular las muestras 1 a la 8 y el control con oxígeno. El control negativo, frasco 2, no se inoculó con muestra. Todos los frascos se colocaron en una jarra anaeróbica con un BBL GasPack Plus marca BD. Se le colocó a cada frasco una jeringa para sacar los posibles gases que genera el metabolismo de la bacteria. Se selló y se dejó incubar por 4 días a 37 °C.

Cuadro 1. Presencia de precipitado y sus características a los 4 días y 14 días de incubación de los frascos de hemocultivo en la jarra anaeróbica a 37°. Signo “+” indica color café barro (Escala Pantone: 2429), “++” café (Escala Pantone:7583), “+++” café oscuro (Escala Pantone: 7552), “++++” negro (Escala Pantone: 447).

Número de muestra	Presencia de precipitado	Color del precipitado	
		a los 4 días	a los 14 días
1	sí	+++	++++
2	sí	++	+++
3	sí	++	+++
4	sí	++	+++
5	sí	++	+++
6	sí	++	+++
7	sí	++	++++
8	sí	++	++++
Control con oxígeno	sí	+	+
Control negativo	sí	+	+

Prueba de magnetismo del precipitado y Tinción de Gram. Luego de los 4 días de incubación se extrajeron 0.5 ml de la muestra y se colocaron en micro tubos de 1 ml. Se observó la coloración y la presencia de precipitado. Se colocaron nuevamente los frascos dentro de una jarra con un nuevo GasPack Plus y se dejó incubar a 37° por 7 días más. Posteriormente, se acercó un magneto para verificar la atracción del precipitado hacia él. Con lo extraído de los tubos se realizó una tinción usando la metodología Gram. Se observaron las tinciones bajo el microscopio.

Resultados y discusión

Para evaluar el crecimiento de la bacteria se observó el color y presencia del precipitado. Se observó que en todas las muestras, con excepción de los controles, se desarrolló un oscurecimiento progresivo del precipitado durante el periodo de incubación (cuadro 1).

Para evaluar la presencia de bacterias y caracterizarlas, se realizó una tinción de Gram. Todas las muestras, excepto los controles, fueron Gram negativo y tuvieron una morfología de bacilos. El control con oxígeno presentó una mezcla de cocos y bacilos Gram negativo y positivo. No se observó contaminación por microorganismos en el control negativo no inoculado. Todos presentaron atracción hacia el magneto excepto los controles, lo que indicó la reducción de hierro (III).

Las propiedades de las bacterias han sido clave para degradar o eliminar contaminantes ambientales en aguas residuales. En investigaciones previas se ha utilizado el género *Geobacter* con fines de biorremediación, es por esto que el objetivo fue evaluar la presencia del género *Geobacter* en sedimentos contaminados en la orilla del lago de Amatitlán, mediante el uso de un medio selectivo en condiciones anaeróbicas.

Se ha evidenciado que *Geobacter* puede reducir otros compuestos como óxido de manganeso (IV) y uranio (IV), por lo que tienen un gran potencial en la biorremediación de ambientes contaminados con estos compuestos como por ejemplo lagos de cráter, lugares donde se filtra el lixiviado y acuíferos salinos. Otros posibles usos que se están investigando en la actualidad para esta bacteria es su uso como Nanowires debido a su capacidad de transferencia de electrones extracelularmente de manera que puedan usarse para generar y transferir electricidad a través de su pili (Lovley, *et al.* 2011).

Se observa en la figura 1 a la izquierda que el precipitado café barro no muestra atracción entre por el imán mientras que a la derecha el precipitado de color negro muestra atracción hacia el imán. El control con oxígeno tampoco muestra atracción por el imán.

El estudio de Coates *et al.* (1996), demostró que las bacterias del género *Geobacter* producen un precipitado negro magnético en condiciones anaeróbicas. Esto como resultado de la reducción de los óxidos naturales del hierro (III) a magnetita, el cual es un



Figura 1. (izquierda) precipitado del control negativo sin atracción por el imán, (derecha) precipitado de la muestra 1 que es atraído por el imán.

mineral fuertemente atraído por los imanes. En efecto, los resultados de nuestro experimento concuerdan con los de Coates, ya que en todas las réplicas se evidenció la presencia de precipitado, el cual, en su mayoría, luego de 14 días de incubación, fue negro. Asimismo, al evaluar la atracción magnética del precipitado, se obtuvieron resultados positivos para todas las muestras que contenían medio inoculado y anaeróbico. La presencia de precipitado magnético es una de las razones por la que se cree que puede haber presencia de bacterias del género *Geobacter* sp. en la muestra de sedimento obtenida del lago de Amatitlán, Guatemala.

Los ámbitos en los que se encuentra la bacteria del género *Geobacter* son sedimentos acuáticos, humedales, arrozales y ambientes de poca profundidad en los que los procesos de reducción de Fe(III) son importantes como aceptor de electrones, ya que son realizados por la bacteria la cual transfiere los electrones a minerales o electrodos. Estas bacterias han sido aisladas de diversos ambientes como acuíferos contaminados con petróleo, agua subterránea contaminada con lixiviado de vertederos, ambientes contaminados con ácidos orgánicos y en sedimentos de sub superficies contaminadas con uranio con desechos orgánicos que promueven la reducción de metales (Lovley, *et al.* 2011). Por lo que el lago de Amatitlán parece un lugar ideal para el crecimiento de esta bacteria, ya que muchos de los desechos sólidos de la ciudad de Guatemala terminan en el lago, como causa de la contaminación producida por más de 700 industrias que desechan residuos sin tratamiento previo, y se convierte en lixiviado (Olayo & Peláez Sánchez, 2015).

La bacteria *Geobacter metallireducens* fue la primera bacteria del género en ser aislada y se encuentra generalmente en sedimentos acuáticos, por lo que se buscó un lugar con sedimento acuático que aumentará la posibilidad de encontrar esta bacteria. Esta especie también se ha demostrado que crece de mejor manera en pH neutros y reduce mejor el Fe(III) con hierro cristalizado desordenadamente como el que se usó en la presente evaluación. Por las razones anteriores, se refuerza la hipótesis de que las bacterias identificadas pueden ser del género *Geobacter*, ya que presentan las características de estas (Nevin *et al.* 2005).

Al realizar la identificación y caracterización de las bacterias presentes, de acuerdo a su morfología y tinción Gram (Cuadro 2), se evidenció que todas las muestras, exceptuando el control positivo y el medio aeróbico, fueron bacilos Gram negativo. Esto concuerda con el estudio de Lovley y colaboradores (2005), quienes llevaron a cabo un estudio similar, ya que sus cepas de bacterias *Geobacter* tuvieron forma de bacilos y fueron Gram negativo. En el control con oxígeno se observaron bacterias con morfología de bacilos y cocos, tanto Gram positivo y negativo. Esto se debió, probablemente, a que el medio fue aeróbico lo que indica crecimiento de bacterias facultativas de otras especies que sobreviven en presencia de oxígeno. Sin embargo, en ningún otro medio se observaron cocos así como tampoco Gram positivos por lo que se puede inferir que no son la misma especie de bacteria, ya que las del género *Geobacter* son estrictamente anaeróbicas. No se observó contaminación por microorganismos en el control negativo, lo que demuestra la validez del método utilizado.

Cuadro 2. Tinciones Gram, morfología y prueba de atracción con magneto de las muestras obtenidas. El signo “+” indica atracción con el magneto, “-” no hay atracción con el magneto.

Número de muestra	Tinción Gram	Morfología	Atracción
1	negativo	bacilos	+
2	negativo	bacilos	+
3	negativo	bacilos	+
4	negativo	bacilos	+
5	negativo	bacilos	+
6	negativo	bacilos	+
7	negativo	bacilos	+
8	negativo	bacilos	+
Control con oxígeno	positivo y negativo	bacilos y cocos	-
Control Negativo	no hay presencia de microorganismos	no hay presencia de microorganismos	-

Debido a la falta de publicaciones acerca de esta bacteria en suelo guatemalteco se recomienda realizar muestreo en otras partes del lago de Amatitlán así como en otros lagos, como el lago de Atitlán, y acuíferos, tanto de agua fresca como contaminada, para evaluar la presencia de esta bacteria. También se recomienda realizar una prueba de solubilidad con citrato de ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) para comprobar que el precipitado obtenido sea específicamente magnetita. La secuenciación de la bacteria sería un paso importante para la identificación de la especie. Por último, se recomienda evaluar la capacidad de biorremediación de la bacteria para sus posibles usos en la recuperación de hábitats contaminados en territorio guatemalteco. De manera que se podrían aprovechar los procesos biológicos de las bacterias del género *Geobacter*, como alternativa para mejorar la calidad del agua en acuíferos contaminados en el país y ayudar a la biorremediación de lagos y ríos.

Conclusiones

En conclusión, se logró determinar la presencia de una bacteria reductora de Fe(III) aislada en el sedimento del lago de Amatitlán que generó un precipitado de color negro con propiedades magnéticas. Lo cual presume que podría ser una bacteria del género *Geobacter*, ya que concuerda con las características de estas. Así mismo, se identificaron bacterias en forma de bacilo Gram negativa, lo que coincide con la morfología de las bacterias de este género. Sin embargo, se recomienda hacer más pruebas con sedimentos de distintas partes del lago de Amatitlán, así como de otros acuíferos, tanto de agua fresca como contaminada, para evaluar así la presencia de este microorganismo y su capacidad de biorremediación en ámbitos contaminados.

Agradecimientos

Agradecemos a Anna Yunuen Soto Fernández, Ángel Cesar Ramírez Sandoval y Claudia Cecilia Alfaro Contreras por su apoyo, conocimiento y recomendaciones durante todas las fases del proyecto de investigación, sin los cuales no se habría podido llevar a cabo. Se agradece también al departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

Aporte de autores

Autor 1 (MVOE): Promotor del concepto de investigación, diseño de los experimentos, supervisor del análisis de datos.

Autor 2 (RMC): Promotor del concepto de investigación, diseño de los experimentos, supervisor del análisis de datos.

Autor 3 (JDdPG): Participó en el proceso de experimentación, redactor y revisor del artículo.

Autor 4 (MFC): Participó en el proceso de experimentación, redactor y revisor del artículo.

Bibliografía

- Coates, J.D., Phillips, E.J., Lonergan, D.J., Jenter, H., Lovley, D.R. (1996) *Isolation of Geobacter species from diverse sedimentary environments Applied Environmental Microbiology*, 62 (5):1531-1536.
- Das, S., Dash, H.R., Chakraborty, J. (2016) *Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (7): 2967-2984.

- DSMZ (s.f). 579. *Geobacter Medium*. Obtenido de:
https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium579.pdf
- DSMZ (s.f). 141. *Methanogenium Medium (H₂/CO₂)*. Obtenido de:
https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium579.pdf
- Morcillo, P., Esteban, M.A., Cuesta, A. (2016) *Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line* Chemosphere, 144: 225-233.
- Methe, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J.F., Dodson, R. J. (2003) *Genome of Geobacter sulfurreducens: metal reduction in subsurface environments*. Science, 302 (5652): 1967-1969.
- Mori, K., Kamagata, Y. (2014) *The challenges of studying the anaerobic microbial world*. Microbes and Environments, 29 (4): 335-337.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010) *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review* Environmental Chemistry Letters, 8 (3): 199-216.
- Nevin, K. P., Holmes, D. E., Woodard, T. L., Hinlein, E. S., Ostendorf, D. W., & Lovley, D. R. (2005). *Geobacter bemidjensis* sp. nov. and *Geobacter psychrophilus* sp. nov., two novel Fe (III)-reducing subsurface isolates. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(4), 1667-1674.
- Pandey, G., Madhuri, S. (2014) *Heavy metals causing toxicity in animals and fishes*. Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences 2 (2), 17-23.
- Pieper, D.H., Reineke, W. (2000) *Engineering bacteria for bioremediation* Current Opinion in Biotechnology, 11 (3): 262-270.
- Olayo, L.F., Peláez Sánchez, R. (2015) *Crecimiento urbano y contaminación del lago de Amatitlán: el caso de Villa Canales y Villa Nueva 2005-2014*.
- Lovley, D.R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M., Flanagan, K.A., Aklujkar, M., Butler, J.E., Giloteaux, L., Rotaru, A-E., Holmes, D.E., Framks, A.E., Orellana, R., Risso, C., Nevin, K.P. (2011) *Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications* Advances in microbial physiology 59: 1-100.