

I.3-ACONDICIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ELECTRÓTROFAS PARA LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

G. Gallegos Ortega^a, V.E. Reyes Cruz^{a*}, J.A. Cobos-Murcia^{a,b}, M.A. Veloz Rodríguez^a, J. Hernández Ávila^a, J.L. Imbert Palafox^c

^aÁrea Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, UAEH, Carr. Pachuca-Tulancingo Km 4.5 s/n, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

^bConsejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Depto. De Cátedras, Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito constructor, Deleg. Benito Juárez, Ciudad de México, C.P. 03940, México.

^cÁrea Académica de Medicina, UAEH, Carr. Pachuca-Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México.

* Autor de correspondencia: reyescruz16@yahoo.com

RESUMEN

El lactosuero es generado durante la fabricación de quesos como la fase en la que se encuentran las proteínas de la leche que no precipitaron. Es altamente contaminante debido a su elevada carga orgánica que provoca elevados valores de demanda química de oxígeno en mantos acuíferos. En México, el vertido de lactosueros en dichos mantos es un constante problema. Para ello, los sistemas bioelectroquímicos constituyen una alternativa viable que posee baja complejidad, tiempo de operación reducido, bajo costo y amigable con el medio ambiente. En ellos las bacterias actúan como donadoras oceptoras de electrones al adherirse a un material sólido, conductor y biocompatible formando una biopelícula, este arreglo se conoce como electrodos microbianos. Por ello, en este trabajo se realizó el acondicionamiento y caracterización de bacterias electrótrofas en lactosuero; mediante cultivos en aerobiosis y anaerobiosis, así mismo se realizan las tinciones de Gram correspondientes. En las muestras bacterianas se embebieron barras de grafito, las cuales se analizaron posteriormente mediante técnicas electroquímicas. Los resultados indicaron que las bacterias son un consorcio anaerobio facultativo de cinco constituyentes Gramnegativos y uno Grampositivo. Los cuales crecieron en extracto de peptona, agares MacConkey y Eosina-Azul de Metileno con diferentes crecimientos micro y macroscópicos, capaces de generar electrodos microbianos estables en lactosuero.

Palabras Clave: Electrodos microbianos, Bacterias electrótrofas, Biopelícula, Grafito, Lactosuero.

ABSTRACT

The whey is generated during cheesemaking as phase in which are protein milk not precipitated. It is highly polluting because of its high organic load generates high values of chemical oxygen demand in aquifers. In Mexico, the whey spilling in aquifers is a constant problem. To this end, bioelectrochemical

sistemas are a viable alternative, because they have low complexity, time reduced operation, low cost and environmentally friendly. In them, bacteria act as donors or electron acceptor adhere to a biocompatible, solid and conductor material forming a biofilm, this arrangement is known as microbial electrode. Therefore, in this work the conditioning and characterization of electron acceptor bacteria in whey; grown by aerobic and anaerobic conditions, also were dyed by Gram stains. Finally, in samples embedded graphite rods which were analyzed later by electrochemical techniques. Results indicate that the specimen is a facultatively anaerobic bacterial consortium incorporated by five Gram-negative and one Gram-positive constituents. They can grow in extract broth peptone, agar MacConkey and eosin-methylene blue with different growth microscopic and macroscopic, capable of generating microbial electrodes stable in whey.

Keywords: Microbial electrodes, Electron acceptor bacteria, Biofilm, Graphite, Whey.

1. INTRODUCCIÓN

El lactosuero es un subproducto generado durante la fabricación de quesos, el cual contiene sales minerales, moléculas lipídicas y protéicas como la lactosa, entre otras [1]. Es un producto altamente contaminante debido a su elevada carga orgánica, misma que al estar presente provoca elevados valores de demanda química de oxígeno en mantos acuíferos [2]. En México, el vertido de lactosueros en los mantos es un problema constante, debido a que no todos los productores cuentan con sistemas de tratamientos [3 y 4]. Por lo que se han desarrollado nuevos métodos que permitan el tratamiento de estos desechos, tales como los sistemas bioelectroquímicos, que constituyen una alternativa viable por su baja complejidad, tiempo de operación reducido, bajo costo y amigable con el medio ambiente [5].

En dichos sistemas los microorganismos (principalmente bacterias) poseen un papel crucial, ya que son ellas las encargadas de llevar a cabo el proceso de transferencia electrónica [5]. Para ello, las bacterias pueden encontrarse de dos formas: en su forma planctónica (libre) o en su forma sésil en la cual se encuentran adheridas en la superficie de materiales (sustratos) mediante fimbrias, pilis o sustancias que fungen como adhesinas y nanoconductores que permite la conductividad eléctrica [6-8]. De tal forma que, al generar dicha adhesión las bacterias generan una biopelícula, esto es atribuido a una estrategia adaptativa. Dicha biopelícula es conveniente para ellas como una forma de protegerse de agentes adversos y de este modo incrementar la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, hidroestabilidad y porque la generación de la biopelícula posibilita la transferencia de material genético. Todos estos factores garantizan a las bacterias su supervivencia [6].

Este arreglo en donde las bacterias son utilizadas para modificar el sustrato conductor (electrodos) con biopelículas se les conoce como electrodos microbianos [9]. Sin embargo, es importante mencionar que para que ocurra una adhesión adecuada sobre el sustrato, este debe poseer características específicas tales como biocompatibilidad, capacidad de conducción eléctrica y estado sólido [10].

En los electrodos microbianos las bacterias fungen como donadoras o aceptoras de electrones durante la polarización positiva o negativa del electrodo. En función de ello, los electrodos microbianos pueden ser divididos en dos tipos: i) bioánodos, cuando las bacterias transfieren los electrones hacia los electrodos, en cuyo caso las bacterias serán electroquímicamente activas y ii) biocátodos a todos

aquellos electrodos modificados por bacterias electrótrofas, es decir bacterias que aceptan los electrones de los electrodos y los incorporan a su metabolismo para mejorarlo y conseguir la transformación de sustratos [5].

En los últimos años se han realizando investigaciones relacionadas con electrodos microbianos, en el estado del arte figuran estudios centrados en bioánodos recubiertos con bacterias electroquímicamente activas como *Geobacter*, *Shewanella*, *Proteobacter* y *Pseudomonas* entre otras. Mientras que el estudio de biocátodos ha sido menos desarrollado; sus aplicaciones principales se han enfocado en la remediación de aguas residuales contaminadas con compuestos clorados, cromo (VI), glucosa y derivados de la celulosa, pero no se han empleado compuestos protéicos como fuente de carbono [8, 11 y 12]. Es por esta razón, que en el presente trabajo se realizó la adaptación de enterobacterias ruminales en lactosuero, así como modificación de barras de grafito con una biopelícula de enterobacterias y se evaluó su comportamiento como biocátodo mediante las técnicas electroquímicas voltamperometría y cronoamperometría.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Toma de muestra

La toma de muestra se realizó a partir de ganado bovino mediante la inserción de una cánula oral a través del tracto digestivo bajo condiciones estériles.

2.2 Crecimiento y aislamiento bacteriano

A continuación, se describen tres análisis que constituyen este apartado, los cuales fueron efectuados en el orden que se muestran.

2.3 Análisis de caracterización microscópica

Se realizaron siembras por estría de lavado ruminal en agares Eosina-Azul de Metileno (EMB), MacConkey y Agar sangre al 5%. Cultivados en condiciones aerobias y anaerobias a una temperatura 38.5 °C. A partir de estas placas se realizaron observaciones microscópicas de las colonias utilizando un microscopio estereoscopio, así como observaciones simples. De las colonias obtenidas se tomaron muestras para la preparación de frotis y teñirlos con la técnica de Gram para realizar las observaciones usando un microscopio óptico.

2.4 Acondicionamiento en lactosuero

Se inocularon 200 µl de lavado ruminal en tubos de ensayo con 19 mL de caldo nutritivo peptona, incubados a 38.5 °C, en condiciones de aerobiosis y anerobiosis, con agitación y en reposo. Del caldo peptona se realizó una resiembra, inoculando en lactosuero ácido con la finalidad de acondicionar las bacterias del lavado ruminal en las condiciones del lactosuero. Este acondicionamiento se llevó a cabo respetando las condiciones de temperatura, oxigenación y movimiento establecidas inicialmente para cada tubo.

2.5 Aislamiento y caracterización de microorganismos

Adicionalmente se realizó el aislamiento de los microorganismos acondicionados en lactosuero, en los agares MacConkey y EMB; con la finalidad de determinar las características de las colonias y características microscópicas tras el proceso de adaptación. Sin embargo, la metodología empleada difiere del estudio del estado inicial, ya que para realizar la siembra por estría y las tinciones de Gram, es necesario obtener bacterias libres de otros productos, para lo cual la muestra fue tratada previamente realizando lavados. El análisis fue realizado por duplicado, evaluando crecimientos después de las 24 y a 72 horas de acondicionamiento en lactosuero.

2.6 Selección e identificación bioquímica

Se identificaron los distintos crecimientos bacterianos mostrados en placa, los cuales fueron aislados del consorcio bacteriano y comparados con sus respectivas microscopías. A partir de éste análisis comparativo se estableció la selección de cepas para la realización de su semicaracterización mediante pruebas bioquímicas para enterobacterias, tales como: Citrato de Simmons, MIO (Movilidad, Indol, Ornitina), TSI (Triple azúcar + hierro), Bilis-Esculina, SIM (Peptona, triptófano y hierro), LIA (Lisina-Hierro).

2.7 Formación de biopelícula

Se introdujeron barras de grafito en tubos de ensayo con bacterias inoculadas y previamente seleccionadas, en donde permanecieron durante 24 horas para lograr el crecimiento bacteriano en la superficie del grafito, es decir; hasta lograr la producción de la biopelícula.

2.8 Estudios electroquímicos

Se realizaron estudios electroquímicos para evaluar la modificación de la superficie de grafito por la formación de la biopelícula. Para ello se utilizó un sistema de 3 electrodos; como electrodo de trabajo fueron utilizados los electrodos de grafito sin modificar y modificados con la biopelícula; utilizando en todos los experimentos la misma área electroactiva, como contra electrodo un alambre de platino y como electrodo de referencia un Electrodo de Calomel Saturado (ECS). Los estudios electroquímicos se realizaron utilizando dos soluciones, una de cloruros 0.1 M en la cual se disolvieron Peptona (caldo nutritivo) al 10% y una solución cloruros 0.1 M y lactosuero ácido al 10%. Se realizaron voltamperometrías a una velocidad de barrido de 1 mV/s en ventanas de potencial de 50 a -550 mV Vs ECS. Del mismo modo, se efectuaron cronopotenciometrías imponiendo una corriente de -1 μ A con el propósito de polarizar el electrodo microbiano, durante 450 s. Los estudios electroquímicos se llevaron a cabo utilizando un potenciostato-galvanostato marca Princeton Applied Research con una interfaz del Software Electrochemistry Power Suite 32.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron crecimientos bacterianos positivos en todos los agares empleados, en aerobiosis y en anaerobiosis (por lo que se consideran anaerobias facultativas); presentando colonias bacterianas de morfologías diversas descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Descripciones macroscópicas de colonias bacterianas presentadas en los agares EMB, MacConkey y Agar Sangre al 5% en aerobiosis y anaerobiosis.

Agar	Código de colonia	Superficie	Forma	Bordes	Coloración	Aspecto y otras características
EMB	1EMB	Convexa	Puntiforme	Redondeados	Negra	-
	2EMB	Convexa	Irregular	Irregular	Morada	Altamente mucoide
	3EMB	Convexa	Irregular	Irregular	Rosa	Altamente mucoide
	4EMB	Convexa	Circular	Redondeados	Negra con halo blanquecino y aspecto verde metálico	Medianamente mucoide
MacConkey	5MCK	Convexa	Irregular	Irregular	Rosa intenso	Altamente mucoide
	6MCK	Convexa	Puntiforme	Redondeados	Rosa	-
	7MCK	Convexa	Circular	Circular	Rosa	-
	8MCK	Plana	Circular	Circular	Rosa intenso	-
	9MCK	Convexa	Irregular	Irregular	Rosa intenso con halo blanquecino alrededor de colonia	Medianamente mojada, cremosa
Sangre al 5%	10AS	Plana	Irregulares	Rizoide	Blaquecina	Aspecto seco y escamoso. Crecimiento abundante y de diferenciación de colonias ilegible. Beta hemólisis positiva

Con base en los resultados mostrados en los agares, los crecimientos en EMB y MacConkey son más legibles con respecto a los mostrados en Agar Sangre al 5%, ya que en EMB y MacConkey se presentaron colonias de cepas diversas con superficies, bordes y formas definidas. Sin embargo, en el Agar Sangre las colonias son de morfología indefinida. Por lo que bajo este resultado se consideró que el agar sangre no es un medio adecuado para su uso en el presente estudio, ya que se trata de un medio enriquecido que no favorece el aislamiento bacteriano. Tras la adaptación en lactosuero se observó que la viabilidad bacteriana se mantiene en el estudio realizado a las 24 horas, mientras que los resultados de las pruebas realizadas a las 72 horas mostraron una viabilidad casi nula, lo cual es indicativo de que el cultivo entró en fase de declive. Esto puede atribuirse a que las bacterias consumieron el sustrato y por lo tanto su viabilidad se vio afectada debido a la falta de nutrientes. Las morfologías bacterianas en el estudio de 24 horas se mantuvieron en su totalidad ya que las morfologías identificadas al inicio se detectaron nuevamente tras la adaptación bacteriana en lactosuero; lo que sugirió que las condiciones proporcionadas por el lactosuero fueron favorables para la supervivencia de las bacterias.

En la tabla 2 se describen morfologías microscópicas detectadas tras una segunda resiembra realizada a partir de las bacterias adaptadas en lactosuero.

Tabla 2. Descripciones microscópicas de bacterianas adaptadas en lactosuero presentadas en los agares EMB y MacConkey.

Agar	Código de colonia	Tinción de Gram	Morfología	Longitud	Arreglo
EMB	1EMB	+	Coco	Normal	Diplococos
	2EMB	-	Bacilos gruesos	Medianos	En palisada. Gránulos metacromáticos presentes.
	3EMB	-	Bacilos gruesos	Cortos	Aislados
	4EMB	-	Bacilos gruesos	Cortos	Aislados
MacConkey	5MCK	-	Bacilos (filamentos)	Largos	No aplica
	6MCK	-	Bacilos gruesos	Medianos	En palisada
	7MCK	-	Bacilos gruesos	Largos	Aislados
	8MCK	-	Bacilos gruesos	Cortos	Aislados
	9MCK	-	Bacilos (filamentos)	Largos	No aplica

A partir del análisis comparativo de las características macro y microscópicas mostradas en las tablas 1 y 2, se determinó que, aunque existan crecimientos de colonias con distintas características macroscópicas, microscópicamente pueden apreciarse similitudes. De este modo se determinó que las

cepas identificadas como 3EMB, 4EMB y 8 MCK se tratan de la misma bacteria, sucediendo lo mismo para las cepas 5MCK y 9 MCK; mientras que 1EMB, 2EMB, 6MCK y 7MCK no muestran similitudes contundentes que los relacionen con otras bacterias observadas microscópicamente en el presente estudio. Esta aseveración se refuerza al realizar las pruebas bioquímicas, en las cuales se corroboraron las similitudes y diferencias entre las bacterias mencionadas al haber encontrado 6 características metabólicas distintas.

Al transcurrir 24 horas de haber embebido las barras de grafito en el caldo con las bacterias seleccionadas, se apreció en la superficie del material una biopelícula como una capa blanquecina. Al ser evaluado el electrodo modificado mediante voltamperometría lineal se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 1; en la cual se observa que la presencia de la biopelícula desplazó el potencial de inicio de la reducción del medio a valores más negativos en ambos casos. En el medio de caldo peptona la reducción comenzó en un potencial de circuito abierto de -70 mV Vs ECS para el electrodo de grafito y en un potencial de -68.4 mV Vs ECS para el electrodo microbiano (Fig 1i). Mientras que para el lactosuero la reducción inició en un potencial de circuito abierto de -174 mV Vs ECS y -275 mV Vs ECS para el grafito y electrodo microbiano respectivamente (Fig. 1ii). Por otra parte, se aprecia en la Figura 1 una disminución en la corriente catódica en todo el intervalo de potencial cuando se tiene la presencia de la biopelícula en el grafito para ambos medios. En el medio de peptona en un potencial de -497 mV Vs ECS se tiene una corriente de -11 μ A para el electrodo microbiano y de -15 μ A para el electrodo de grafito. Mientras que para el lactosuero es de -7 μ A para el electrodo microbiano y de -13 μ A para el electrodo de grafito. Este comportamiento del desplazamiento de potencial y la disminución de la corriente catódica es atribuido a que la biopelícula modifica las condiciones energéticas del grafito.

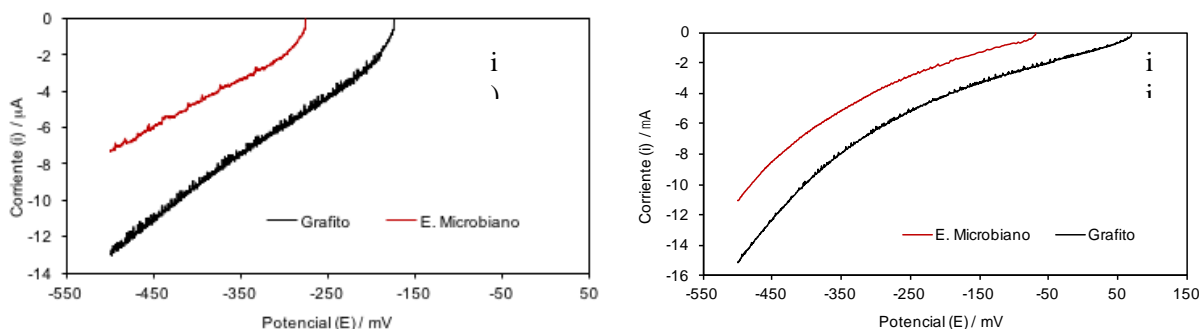


Figura 1. Voltamperograma de electrodo de grafito y electrodo microbiano en i) medio de peptona y ii) lactosuero a una velocidad de barrido de 1 mV/s.

Al comparar los voltamperogramas del electrodo de grafito en ambos medios se apreció una mayor corriente catódica para el medio de peptona respecto al medio de lactosuero. Para un mismo potencial de -497 mV Vs ECS se obtuvo una corriente de -15 μ A y -13 μ A. Presentado el mismo comportamiento en el electrodo microbiano con una corriente de -11 μ A y -7 μ A para el medio peptona y lactosuero respectivamente en el potencial de -497 mV Vs ECS. Este comportamiento de una mayor corriente en el grafito y el electrodo microbiano en el medio de peptona se debió a que este medio es más electrolítico (por la cantidad de sales que contiene) con respecto al lactosuero. Debido a que el

electrodo microbiano se utilizará para proceso de degradación de proteínas solo se realiza el estudio cronopotenciométrico en el lactosuero.

En la Figura 2 se muestran los transitorios cronopotenciométricos cuando se mantiene la corriente constante en $-1 \mu\text{A}$ durante 120 s en lactosuero. En la Figura 2 se aprecia solo una pendiente en los transitorios cronopotenciométricos para el grafito. También se observa un incremento del potencial catódico al tener la biopelícula en el electrodo de grafito y 3 pendientes, en los intervalos de 0 a 60 s, 60 a 100 s y 100 a 450 s. Este comportamiento indica que se están llevando a cabo 3 procesos de reducción, los cuales pueden ser atribuidos a la polarización de la biopelícula, a la reducción del lactosuero y a que la biopelícula se encuentra mediando el proceso de transferencia de carga. Es importante destacar que el electrodo microbiano después de 100 s se mostró estable en el lactosuero debido a que ya no se tuvieron variaciones importantes en la pendiente su transitorio cronopotenciométrico.

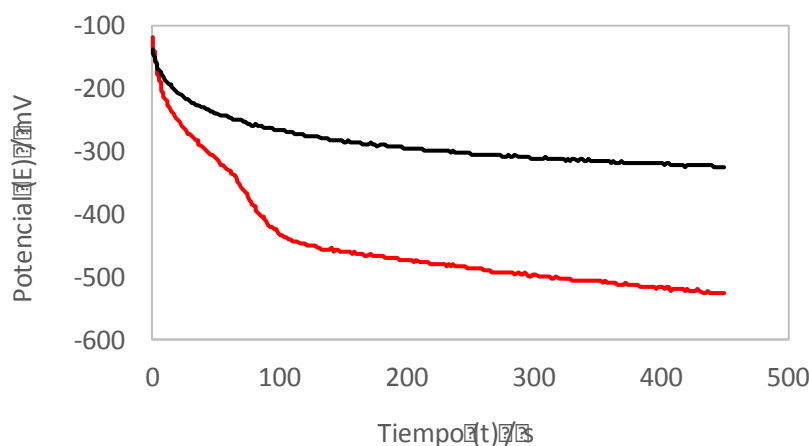


Figura 2. Cronopotenciograma de electrodo de grafito (línea negra) y electrodo microbiano (línea roja) en lactosuero cuando se impone una corriente de $-1 \mu\text{A}$ durante 450 s.

4. CONCLUSIONES

Los resultados indican que las bacterias son cultivables en condiciones aerobias, a pesar de ser de naturaleza anaerobia, por lo que se consideran anaerobias facultativas; lo que facilita su manipulación en presencia de oxígeno sin afectar su viabilidad. Así mismo; se determinó que la presencia de nutrientes es de suma importancia para su preservación, ya que a los volúmenes de caldo y lactosuero trabajados a las 72 horas se mostró una fase de declive; ante este resultado es importante considerar que la muerte bacteriana es justificable por haber sido un estudio a bajos volúmenes de nutrientes. Por otro lado, la identificación metabólica de seis cepas en la muestra de lavado ruminal, indicó que se trata de un consorcio bacteriano y no de una sola cepa.

En cuanto a los estudios electroquímicos realizados al electrodo microbiano, los resultados indicaron que los cambios en la respuesta de corriente y potencial al generar la biopelícula sobre el grafito se debieron a un incremento en la resistencia de transferencia de carga por la presencia de las bacterias, ya

que la transferencia se llevó a cabo hacia las bacterias y no a los compuestos orgánicos electroactivos presentes en el lactosuero. Por lo que se puede aseverar que se trata de bacterias electrótrofas oceptoras de electrones. También mostraron que es posible evidenciar la modificación del electrodo de grafito con enterobacterias del ganado bovino utilizando técnicas electroquímicas. Finalmente indicaron que el electrodo microbiano elaborado puede ser utilizado en procesos electroquímicos que contengan proteínas debido a la estabilidad presentada en el lactosuero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores externan su gratitud al CONACyT por el apoyo financiero otorgado en la beca 710030 así como al Programa de Cátedras CONACyT. Al Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por el apoyo brindado para la realización de las pruebas biológicas y a la Universidad Politécnica de Francisco I. Madero por su apoyo en la toma de muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. R. A. Parra: Revista Facultad Nacional de Agronomía, 2009, vol. 62, pp. 4967-4982.
- [2]. J. Callejas *et al*: Acta universitaria, 2012, vol. 22, pp. 11-18.
- [3]. D. Valencia and M. Ramírez: Elementos, 2009, vol. 73, pp. 27-31.
- [4]. H. Riveros: La agroindustria rural en América latina y el caribe, Prodar, Venezuela, 2001, pp. 132.
- [5]. D. M. Revelo *et al*: Información tecnológica, 2013, vol. 24, pp. 17-28.
- [6]. S. Téllez: Tecnoalimen, 2010, vol 20, pp. 24-28.
- [7]. J. Moreno, R. Moral, J. García, J. Pascual & M. Bernal: De residuo a recurso, el camino hacia la sustentabilidad, Mundi prensa, España, 2015, pp 72.
- [8]. D. M. Revelo *et al*: Información tecnológica, 2015, vol. 26, pp. 77-88.
- [9]. E.J. Gardel: Harvard University's DASH repository, 2013. Doctoral dissertation.
- [10] C.E. Reimers *et al*: Enviromental Science and Technology, 2000, vol. 35, pp. 192–195.
- [11] L. Bin *et al*: Enviromental Science & Technology, 2013, vol. 47, pp. 5353.
- [12] V. Sharma, and P. Kundu: Enzyme and Microbial Technology, 2010, vol. 47, pp. 179-188.