

# UNIVERSITAS SCIENTIARUM

## REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

Volumen 4 N° 2, Julio-Diciembre de 1997

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**





## DISEÑO DE UN MEDIO DEFINIDO PARA EL CULTIVO DISCONTINUO DE CEPAS AUTÓCTONAS DE *THERMUS* SPP.

Aura M. Pedroza, Norma C. Álvarez, Raúl A. Poutou

Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,  
Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 n° 43-82. Santa Fe de Bogotá, D.C. Colombia.  
Raúl A. Poutou. e-mail rp000274@javercol.javeriana.edu.co

### RESUMEN

Se diseñaron tres medios de cultivo (PAP1, PAP2 y PAP3), para estudiar la cinética de crecimiento de dos aislamientos autóctonos (identificados como 8 y 32) de *Thermus* spp. El medio PAP2 resultó ser el más favorable para el cultivo *in vitro* de los aislamientos termófilos favoreciendo la tasa de crecimiento de ambos aislamientos. El mayor logro de este trabajo es el haber diseñado un medio definido para suplir la utilización de agua termal en los experimentos de laboratorio, lo que permitirá adelantar trabajos en la obtención de enzimas termoestables como lipasas, proteasas y amilasas.

Palabras claves: aguas termales, cinética de crecimiento, termófilos, *Thermus* spp.

### ABSTRACT

This study facilitated the design of three culture medium (PAP1, PAP2, PAP3) to study the growth kinetics of two autoctonal isolation strains (identified as 8, 32) of *Thermus* spp. The PAP2 medium was equally efficient in growing both isolates. Our major finding was the design of a culture medium and the substitution of hot spring in the laboratory culture of *Thermus* spp. These findings will facilitate the production of thermostables enzymes as lipases, proteases and amylases.

### INTRODUCCIÓN

Los microorganismos termófilos ofrecen grandes ventajas en los procesos biotecnológicos, gracias a las enzimas capaces de catalizar reacciones bioquímicas a temperaturas superiores, en comparación con microorganismos convencionales. Aumentar la temperatura de los procesos reduce la viscosidad, y la tensión superficial, incrementa la velocidad de difusión, la solubilidad de los compuestos no gaseosos, y disminuye la posibilidad de contaminación, todo lo cual tiene efectos positivos sobre las reacciones de catálisis y la obtención de productos.

Las bacterias termófilas han sido empleadas para la producción de enzimas de restricción, termoestables como *Bsi* E I, aislada de *Bacillus stearothermophilus* o *Tfi* I aislada de *Thermus filiformis* (New England Biolabs 1998). Otras enzimas (polimerasas) amplifican secuencias de ADN, en particular la *Taq* ADN polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus*, ampliamente utilizada en las técnicas de PCR en biología molecular (Stahl *et al.* 1985, Saiki *et al.* 1988).

Por otra parte, la producción industrial de etanol reporta ventajas al realizar el proceso con microorganismos termofílicos. Una elevada tem-

peratura hace más eficiente la destilación del etanol. Algunas bacterias termofílicas pueden realizar la fermentación directa de polisacáridos a etanol mientras las levaduras convencionales como *Saccharomyces cerevisiae* son incapaces de hidrolizar polisacáridos como el almidón.

La lixiviación microbiana con cepas termófilas es más rápida que la realizada por microorganismos mesófilos (Zuber 1978). Industrialmente los microorganismos termófilos también se utilizan en la producción de enzimas como proteasas y lipasas para la industria de detergentes y en la producción farmacéutica. (Atlas & Bartha 1993).

La termoestabilidad de las enzimas de estos microorganismos depende de las fuerzas que estabilizan la proteína (Singleton & Amelunxen 1973, Stellwagen 1978); estas fuerzas incluyen puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos, enlaces a metales y puentes di-sulfuro. Los microorganismos termófilos producen enzimas que no son desnaturalizadas a altas temperaturas; al parecer la sustitución de un aminoácido en uno a más lugares de la enzima permite que esta resista los efectos desnaturalizantes del calor. Adicionalmente, la maquinaria de síntesis de proteínas y las membranas celulares de este tipo de microorganismos son igualmente estables frente a altas temperaturas. (Atlas & Bartha 1993).

Varios medios de cultivos como el medio D, diseñado por Brock y Freeze (1969), el medio 162 diseñado por Degryse et al. (1978), han sido empleados para suplir los requerimientos nutricionales del hábitat natural de este tipo de microorganismos, debido a las altas y variadas concentraciones de iones como sulfato, carbonato y fosfato, que son característicos de las aguas termales, principal fuente de aislamiento de los microorganismos termófilos.

En este trabajo presentamos datos adicionales sobre el comportamiento cinético de varias cepas de *Thermus* en medios de cultivo de laboratorio. Estos medios facilitan el estudio de este microorganismo y sustituyen las aguas termales como medio de cultivo tradicional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos empleados en el estudio

Se emplearon dos aislamientos identificados con los números 8 y 32, previamente conservados en caldo BHI más 30% v/v glicerol (Poutou et al. 1994) y caracterizados bioquímicamente como *Thermus spp.* (Díaz et al. 1998).

### Análisis químico de las aguas termales

Este análisis estuvo a cargo de ANAL-QUIM Ltda.

### Pruebas para la sustitución del agua termal

Se ensayaron varios medios de cultivos, caldo BHI (Oxoid) disuelto en H<sub>2</sub>O termal, caldo BHI (Oxoid) disuelto en H<sub>2</sub>O desionizada, caldo BHI (Oxoid) disuelto en H<sub>2</sub>O destilada y los medios definidos PAP1, PAP2 y PAP3 (Poutou, Álvarez, Pedroza). La composición de los medios definidos PAP se muestra en la tabla 1.

### Cultivo discontinuo en erlenmeyers

Se utilizaron los medios mínimos definidos, PAP1, PAP2 y PAP3. Los ensayos se realizaron en erlenmeyers de volumen efectivo 1L, volumen de trabajo 100 ml, 5% de inóculo crecido durante 12 h, agitación 250 r.p.m., temperatura 60°C. El crecimiento microbiano fue seguido a través del incremento de la absorbancia a 540 nm de longitud de onda; los datos obtenidos fueron graficados después de aplicar un modelo de máxima similitud que responde a la fórmula

$$\text{Abs}/t = \text{Abs}_{\text{max}} / [1 + e^{R(H-t)}];$$

donde  $R=1/2$  de la  $\text{Abs}_{\text{max}}$  ( $\text{Abs}^{1/2}$ ),  $H$ =Tiempo en llegar a  $\text{Abs}^{1/2}$ ,  $t$ = tiempo de fermentación. Este modelo permitió calcular  $\text{Abs}^{1/2}$ ,  $\text{Abs}_{\text{max}}$  y  $t^{1/2}$ .

## RESULTADOS

De acuerdo con el análisis físico-químico las aguas termales de donde provenían los aislamientos en estudio, pueden clasificarse como neutras cloruradas, sódicas bicarbonatadas y sulfurosas (tabla 2), lo cual fue de gran importancia para el diseño de los medios de cultivo, PAP1, PAP2 y PAP3 (tabla 1). Estos medios fueron diseñados por la

Componentes	PAP1	PAP2	PAP3
Ca (HCO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Merck) (mg)	170	170	170
CaCO <sub>3</sub> (Merck) (mg)	44	44	44
CaCl <sub>2</sub> (Merck) (g)	1,41	1,41	1,41
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (Merck) (mg)	528	528	528
FeSO <sub>4</sub> (Merck) (mg)	0.15	0.15	0.15
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> (Merck) (mg)	1	2	2
NaHPO <sub>4</sub> (Merck) (mg)	74	74	74
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck) (mg)	1.8	1.8	1.8
Glucosa (Merck) (g)	12.5	12.5	12.5
Peptona (Oxoid) (g)	3	0	1.5
Extracto de levadura (Oxoid) (g)	0	3	1.5
pH, ajustado con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	6.9	6.9	6.9

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo PAP1, PAPA2 y PAPA3 por litro de H<sub>2</sub>O destilada

adición de nitrógeno orgánico contenido en la peptona y el extracto de levadura, pues se ha reportado la presencia de bajas concentraciones de compuestos orgánicos en este tipo de aguas (Hudson *et al.* 1987); cuidando que el porcentaje de estos componentes no sobrepase el 0.4% p/v del medio de cultivo, pues de hacerlo pudiera inhibir el crecimiento del género *Thermus* (Brock & Freeze 1969).

Componente-Propiedad	Valores
Turbidez (mg/dl)	7.0
Conductividad a 25°C (µS)	572
pH a 20°C	7.2
Dureza total en CaCO <sub>3</sub> (mg/dl)	81
Bicarbonatos (mg/l)	317
Carbonatos (mg/l)	0
Cloruros (mg/l)	50
Sulfatos (mg/l)	52
Nitratos (mg/l)	0.09
Hierro total (mg/l)	0.1
Calcio (mg/l)	29
Magnesio (mg/l)	2.0
Manganeso (mg/l)	0.16
Sodio (mg/l)	100
Potasio (mg/l)	15

Tabla 2. Composición química de las aguas termales analizadas

La concentración de la fuente de carbono (glucosa) fue incrementada con relación al medio de aislamiento BHI (tabla 1), pues varias de las enzimas que participan en la degradación del car-

bohidrato (vía glucolítica, ciclo de krebs y fosforilación oxidativa) han sido aisladas y caracterizadas en varios representantes del género *Thermus* (Freeze & Brock 1970, Miyazaki 1996, Nakamura *et al.* 1995, Okamoto *et al.* 1996).

El ensayo de sustitución del agua termal para el cultivo de los aislamientos reportó valores de absorbencia a 540 nm entre 0.13 y 0.56, después de 12 horas de cultivo a 60°C y 250 rpm (tabla 3).

Medios	Aislamientos	
	8	32
BHI + H <sub>2</sub> O Destilada	0.56	0.29
BHI + H <sub>2</sub> O Desionizada	0.13	0.18
BHI + H <sub>2</sub> O Termal	0.60	0.39

Tabla 3. Crecimiento de las cepas 8 y 32 en los medios líquidos BHI + H<sub>2</sub>O destilada, BHI+ H<sub>2</sub>O desionizada, BHI+ H<sub>2</sub>O termal. Los valores corresponden a la absorbancia a 540 nm de longitud de onda, después de 12 horas de cultivo a 250 rpm a 60°C

## DISCUSIÓN

Los resultados del ensayo de sustitución del agua termal demostraron que para los dos aislamientos resulta indispensable la presencia de los micronutrientes encontrados en el agua termal. En la tabla 3 se observa que el crecimiento en BHI reconstituido en H<sub>2</sub>O desionizada es menor al presentado en el caldo BHI reconstituido en H<sub>2</sub>O destilada, y que ambos resultados se encuentran

por debajo con respecto al crecimiento en BHI reconstituido en H<sub>2</sub>O termal estéril. El haber obtenido resultados de crecimiento muy similares en BHI+ H<sub>2</sub>O destilada y BHI+H<sub>2</sub>O termal, sugirió hacer una comparación entre las cinéticas de crecimiento en los medios PAP1, PAP2, PAP3 y BHI+ H<sub>2</sub>O destilada (tabla 4). Estos resultados demuestran que el medio PAP2 es el más eficiente para el cultivo de los dos aislamientos pues permite incrementar la absorbancia máxima desde 1.438 hasta 2.83 para el caso del aislamiento 8 y desde 0.725 hasta 2.1 para el aislamiento 32, además, de aumentar la velocidad específica de crecimiento a 0.45h<sup>-1</sup> y 0.30 h<sup>-1</sup> respectivamente, así como disminuir el tiempo de duplicación a 90 minutos para la cepa 8 y 138 minutos para la cepa 32 (tabla 4).

La figura 1, permite corroborar, que el medio definido PAP2 ofrece mejores condiciones nutricionales para el desarrollo de los dos aislamientos lo cual se hace manifiesto con los valores de  $\mu$  obtenidos al cultivar los aislamientos en estudio en los medios PAP1, PAP2 y PAP3 (tabla 4).

El mayor logro de este trabajo fue el diseño de un medio definido que permite el cultivo discontinuo de los aislamientos 8 y 32. No obstante se hace necesario implementar un estudio de pulso que permita conocer cuál y/o cuáles de los componentes del medio se comporta como substrato limitante. Esto permitirá mejorar aún más el medio de cultivo y la expresión de enzimas extracelulares termoestables tales como amilasas.

Parámetros cinéticos

Medios	Aislamientos	Abs <sub>max</sub>	Abs <sub>1/2</sub>	t <sub>1/2</sub> (h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Td(h)
BHI+H <sub>2</sub> O destilada	8	1.438	0.719	2.48	0.19	3.6
	32	0.725	0.358	2	0.06	11.6
PAP1	8	0.260	0.150	2	0.14	4.9
	32	NC	NC	NC	NC	NC
PAP2	8	2.83	1.4	4	0.45	1.5
	32	2.1	0.8	3.7	0.30	2.3
PAP3	8	0.4	0.3	6.2	0.16	4.3
	32	0.357	0.18	8.9	0.10	6.9

NC: no crecimiento

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento

td: tiempo de duplicación

Abs max : absorbancia máxima

Abs<sub>1/2</sub>: absorbancia media

t<sub>1/2</sub>: tiempo en llegar a Abs<sub>1/2</sub>

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos de la cinética de crecimiento de los aislamientos 8 y 32 en los medios BHI+H<sub>2</sub>O destilada, PAP1, PAP2 y PAP3, a 250 rpm, 60°C y pH variable. Se destacan en negrillas los resultados correspondiente al medio PAP2 por ser el medio más favorables para el crecimiento de los aislamientos.

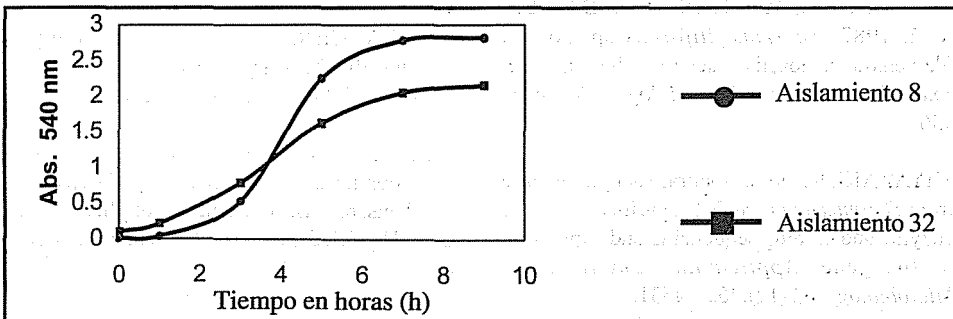


Figura 1. Cinética de crecimiento de los aislamientos 8 y 32 en medio PAP2, 60°C, 250 rpm, pH variable

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Merck, Colombia por su colaboración en el suministro de reactivos. Al personal de custodia y administración de los pozos termales de Iza, departamento de Boyacá. A los investigadores Martín Alonso Bayona y Paula Lucía Díaz por el aislamiento e identificación de los microorganismos empleados en el estudio. A los compañeros del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Finalmente, agradecemos a los revisores anónimos de este trabajo por sus acertados comentarios.

## LITERATURA CITADA

ATLAS, R.M., BARTHA, R. 1993. Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3 Edition The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Bridge Parway. Redwood City.

BROCK, T., FREEZE, H. 1969. *Thermus aquaticus* genus and spp., a non-sporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*. 98:289-297.

DÍAZ, P.L., BAYONA, M.A., POUTOU, R. 1998. Aislamiento e identificación de bacterias termófilas autóctonas. Memorias Primer Congreso Internacional de Microbiología Industrial. 122-126.

FREEZE, H., BROCK, T.D. 1970. Thermoe-stable Aldolasa from *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*. 101 (2) :541-550.

HUDSON, J.A., MORGAN, H.W., DANIEL, R.M. 1987. *Thermus filiformis* sp. nov., a filamentous caldoactive bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37(4):431-436.

MIYAZAKI, K. 1996. Isocitrato dehidrogenase from *Thermus aquaticus* YT1: purification of the enzyme and cloning sequencing and expression of the gene. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (12):4627-4631.

NAKAMURA, T., YOSHIOKA, I., TAKAHASHI, M., TOH, H., IZUI, K. 1995. Cloning and sequence analysis of gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from an extreme Thermophile, *Thermus* sp. *Journal of Biochemistry*. 118:319-324.

NEW ENGLAND BIOLABAS. 1998-1999. Catálogo de productos para biología molecular.

OKAMOTO, A., KATO, R., MASUI, R. 1996. An aspartate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of Biochemistry*. 199 (1):135-143.

POUTOU, R.A., AMADOR, E., CANDELARIO, M. 1994. Banco de células primario: caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología aplicada*. 11 (1): 55-59.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHORT, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (29):487-491.

SINGLETON R., AMELUNXEN, R.M. 1973. Proteins from Thermophilic Microorganisms. *Bacteriology Review*. 37(3):320-342.

STAHL, D.A., LANE, D.J., OLSEN, G.J., PACE, N.R. 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5s rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 49 (6): 1379-1384.

STELLWAGEN, E. 1978. Thermostability of proteins. Biochemistry of thermophily. Edited by Firedman, S.M. Academic Press. N.Y. USA.

ZUBER, H. 1978. Comparative studies of thermophilic and mesophilic enzyme, objectives, problems, results. Biochemistry of Thermophily. Edited by Friedman, S.M. Academic Press. N.Y. USA.