

INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO  
Y PERFIL DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE DOS *Geobacillus* AISLADOS DEL  
VOLCÁN “EL CHICHÓN”

PRESENTA  
ANDY JARENNI GOMEZ VALDEZ

OPCIÓN I: TESIS PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
**INGENIERO BIOQUÍMICO**

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. SANDY LUZ OVANDO CHACÓN

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; ENERO 2017

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 5  |
| II. ANTECEDENTES .....  | 7  |
| 2.1. VOLCÁN “EL CHICHÓN” .....  | 7  |
| 2.2 MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS.....   | 8  |
| 2.3 AMBIENTES TERMÓFILOS .....  | 9  |
| 2.4. BACTERIAS TERMÓFILAS .....   | 10 |
| 2.5 BACTERIAS DEL GÉNERO <i>Geobacillus</i> .....   | 12 |
| 2.6 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....   | 12 |
| 2.7 <i>Geobacillus jurassicus</i> .....   | 13 |
| 2.8 MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS TERMÓFILAS....   | 16 |
| 2.9 ENZIMAS TERMÓFILAS .....  | 17 |
| 2.10 ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL AISLADAS DE ORGANISMOS<br>TERMÓFILOS .....   | 20 |
| 2.11 ESTUDIOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE<br>MICROORGANISMOS AISLADOS DE FUENTES TERMALES ..... | 21 |
| 2.12 SISTEMA DE INVESTIGACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Api-ZYM<br>.....   | 23 |
| III. OBJETIVO.....  | 24 |
| 3. 1 OBJETIVO GENERAL.....  | 25 |
| 3. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 25 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 26 |
| 4.1 OBTENCIÓN DE CEPA .....   | 26 |
| 4.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Geobacillus</i> .....   | 26 |
| 4.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Geobacillus</i> .....   | 26 |
| 4.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA .....   | 28 |
| 4.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....   | 28 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 30 |
| 5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Geobacillus jurassicus</i> EN DISTINTOS<br>MEDIOS DE CULTIVO.....                   | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 5.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                                       | 31 |
| 5.3 Morfología microscópica a 100X de <i>Geobacillus jurassicus</i> en diferentes medios de cultivo .....        | 33 |
| 5.4 Morfología microscópica a 100X de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> en diferentes medios de cultivo..... | 35 |
| 5.4 Identificación de actividad enzimática de <i>G. jurassicus</i> y <i>G. stearothermophilus</i> .....          | 37 |
| VI. CONCLUSIONES .....   | 47 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA .....  | 49 |
| VII. ANEXOS .....  | 55 |

## **INDICE DE CUADROS**

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Aplicación de enzimas aisladas de microorganismos termófilos ....   | 19 |
| Cuadro 2 Interpretación de las lecturas del Kit api-ZYM .....                 | 24 |
| Cuadro 3 Identificación de actividad enzimática en Medio Productor de Lipasas | 38 |
| Cuadro 4 Identificación de actividad enzimática en Medio Base .....           | 39 |
| Cuadro 5 Identificación de actividad enzimática en Medio Papa- Dextrosa ....  | 40 |
| Cuadro 6 Identificación de actividad enzimática en Medio Mínimo .....         | 41 |
| Cuadro 7 Identificación de actividad enzimática en Medio Basal Mineral .....  | 42 |
| Cuadro 8 Identificación de actividades enzimáticas por medio de KIT API-ZYM   | 43 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Vista aérea del volcán “El Chichón” .....  | 7  |
| Figura 2 Cráter del volcán “El Chichón” .....   | 8  |
| Figura 3 Ambiente termófilo .....   | 10 |
| Figura 4 Fijación de carbono por el Ciclo de Calvin .....   | 11 |
| Figura 5 Vista microscópica de <i>G. stearothermophilus</i> .....   | 13 |
| Figura 6 Toma de muestra del cráter del Volcán “El Chichón” .....   | 14 |
| Figura 7 Ciclo del azufre simplificado en aguas termales .....  | 16 |
| Figura 8 Membrana celular con ácidos grasos saturados presente en bacterias termófilas.   | 17 |
| Figura 9 B-Galactosidasa de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> el enrollamiento de este polímero de aminoácidos se debe a la presencia de prolina y leucina.....   | 19 |
| Figura 10 Enzima $\beta$ - galactosidasa producida por <i>Thermus</i> sp. Obtenida a 70° C utilizando p-nitrofenil-alfa-D-galacto- piranosido (PNPAG) como sustrato .....                                       | 18 |
| Figura 11 Cinética de crecimiento de <i>G. jurassicus</i> en diferentes medios de cultivo .....   | 31 |
| Figura 12 Cinética de crecimiento de <i>G. stearothermophilus</i> en diferentes medios de cultivo .....   | 32 |
| Figura 13 Vista al microscopio a 100X de <i>Geobacillus jurassicus</i> cultivado en a) medio productor de lipasas, b) medio base, c) medio papa-dextrosa, d) medio basal mineral y e) medio mínimo.....         | 35 |
| Figura 14 Vista al microscopio a 100X de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> cultivado en a) medio productor de lipasas, b) medio base, c) medio papa-dextrosa, d) medio basal mineral y e) medio mínimo..... | 37 |

## I. INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo se ha pensado que es imposible la existencia de vida en ecosistemas en los que las condiciones de temperatura, concentración de sales, metales, presión son extremas; sin embargo hoy en día los avances tecnológicos han permitido acercarnos a estos ecosistemas y poder conocer, identificar a estos microorganismos extremófilos y clasificarlos en cinco grupos termófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos y psicrófilos; permitiéndonos desarrollar tecnologías aplicables a distintos sectores industriales y biotecnológicos.

Los termófilos son microorganismos que toleran temperaturas óptimas de crecimiento entre 45 y 70°C, el estudio de estos se ha intensificado en los últimos años debido a la termoestabilidad que estos tienen, propiedad que les permiten tener una amplia gama de aplicaciones en procesos industriales o bien son fuentes de metabolitos tales como enzimas termo resistentes. El hábitat de los microorganismos termófilos son los diferentes ambientes extremadamente calientes que registran temperaturas entre los 80 a 120°C, tales como fuentes de aguas termales, áreas volcánicas, fumarolas y sistemas hidrotermales marinos. La gran diversidad de ecosistemas del estado de Chiapas permite tener una fuente de obtención de estos microorganismos de interés industrial y con gran potencial biotecnológico, uno de estos ecosistemas es el lago del cráter del volcán el Chichón ubicado en el municipio de Chapultenango de donde se han aislado dos microorganismos el *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus*.

Evaluar el crecimiento de estos microorganismos es de gran importancia debido a que fuentes bibliográficas reportan que enzimas termoestables obtenidas de microorganismos termófilos tienen gran impacto en la industria química, alimentaria y biotecnológica, por lo que en este proyecto se evaluará el crecimiento y adaptación de estos *Geobacillus* en 5 distintos medios de cultivo líquidos con distintas fuentes de carbono, nitrógeno y sales; así como la actividad enzimática que esos microorganismos desarrollen, empleando para ello un kit APY-ZYM.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 VOLCÁN “EL CHICHÓN”

El volcán Chichón fue descubierto como volcán en 1928, por Federico K. Muller, quien lo catalogó como verdadero volcán. Se encuentra ubicado en el municipio de Chapultenango en el estado de Chiapas en las coordenadas 17° 21' 38" latitud norte y 93° 13' 28" longitud oeste. Colinda al sureste con el municipio de Ostucán y al suroeste con el municipio de Ixtacomitán, sobre la parte norte de la Falla Motagua-Polochi y al norte de la Falla Tecpatán-Ocosingo. Dentro las montañas del norte de Chiapas, a unos 350 km de la trinchera mesoamericana. Influencia directa con los municipios de Francisco León, Chapultenango, Ostucán, Pichucalco e Ixtacomitán. Es un volcán con una edad de aproximadamente 776 000 años y tiene un estado actualmente activo (Figura 1) (Nuñez, 2012).

Tiene un cráter con un diámetro de un kilómetro y en su fondo se encuentra un lago de color verde-amarillo de entre 300 y 500 m con una profundidad de 1.5 m (Figura 2) (Santillan, 2007) con temperaturas que oscilan entre 30 a 72°C. También se reporta un pH que va de 2 hasta 8.5 en distintos puntos (Arellano y Jiménez, 2012), esto se atribuye a las fluctuaciones de la composición fisicoquímica del agua del lago del cráter debido a un sistema hidrotermal que se encuentra debajo del lago que son emanaciones de H<sub>2</sub>S (Armienta, 2014).



Figura 1 Vista aérea del volcán “El Chichón”



Figura 2 Cráter del volcán “El Chichón”

## II.2 MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

En el planeta se encuentra una gran diversidad de ecosistemas en los que habitan organismos capaces de adaptarse y sobrevivir en condiciones extremas. Por ejemplo; desiertos y geiseres. Estos microorganismos llamamos extremofilos, no sólo toleran situaciones límites, sino que necesitan las condiciones extremas para que su supervivencia y multiplicación sea posible. (Medina et al., 2000) Dichos microorganismos se clasifican según las condiciones extremas en las que se desarrollan.

- **Acidófilos:** Son aquellos que se desarrollan en ambientes de alta acidez, con pH óptimo de crecimiento próximo a 3.
- **Alcalófilos:** Son aquellos que se desarrollan en ambientes muy alcalinos con pH óptimo de crecimiento próximo a 9 o más.
- **Halófilo:** Se desarrollan en ambientes hipersalinos.
- **Oligotrofos:** Son aquellos microorganismos que tienen la capacidad de crecer en ambientes con nutrientes limitados.
- **Osmófilos:** Son microorganismos que pueden crecer en ambientes con alta concentración de azúcares.
- **Psicrófilos o Psicrotolerantes:** Se desarrollan en ambientes de temperatura muy baja, como los glaciares.



- **Termófilo:** Se desarrollan en ambientes a temperaturas superiores a 45°C, algunos de ellos, los hipertermófilos tienen su temperatura óptima de crecimiento por encima de los 80°C.

El estudio de microorganismos que habitan en ambientes extremos de pH, presiones barométricas, temperatura y salinidad, ha despertado el interés de los investigadores por ser fuentes de nuevas sustancias bioactivas tales como enzimas termoestables, las cuales tienen una gran demanda en diferentes industrias como la farmacéutica, alimentaria, química y cosmética (Dalmaso et al., 2015) por las características y propiedades que presentan estos microorganismos como sus biomoléculas.

### **II.3 AMBIENTES TERMÓFILOS**

Los hábitats naturales con temperaturas permanentemente altas (por encima de 45 – 50°C) están restringidos a unas pocas zonas de la biosfera, normalmente relacionadas con fenómenos volcánicos, tales como: fuentes termales volcánicas terrestres, fuentes termales submarinas (fumarolas hidrotermales) asociadas a las grandes dorsales oceánicas y materiales en fermentación como acúmulos de abono (compostas) los cuales puede alcanzar temperaturas de 75°C.

Los ambientes termales (figura 3) difieren en sus propiedades químicas y composición elemental, algunas son aguas termales cloradas que contienen cloro, sulfuradas y sulfurosas que contienen azufre, sulfatadas es decir el azufre se combina con sulfato de calcio, sodio o magnesio, etc. esta diversidad de composición permite el crecimiento de una diversidad bacteriana, pocas de las cuales son cultivables, sin embargo la tolerancia de estos microorganismos a crecer en condiciones extremas ha permitido que estas o sus metabolitos tengan un gran potencial biotecnológico (Belkova et al., 2007).



Figura 3 Ambiente termófilo

#### **II.4 BACTERIAS TERMÓFILAS**

En general los microorganismos termófilos que crecen a temperaturas de entre 60 a 80°C son conocidos como heterotróficos extremos, mientras que los que crecen entre 80 a 100°C se denominan hipertermófilos, Los organismos termófilos e hipertermófilos en su mayoría son anaerobios y se caracterizan por tener un metabolismo quimiolitotrófico (organismos que obtienen su energía de la oxidoreducción de compuestos inorgánicos para fijar  $\text{CO}_2$ , generalmente son aerobios, donde el aceptor final de electrones es el  $\text{O}_2$ ) y quimiorganotrofos (organismos que obtienen su energía de la oxidoreducción de compuestos orgánicos).

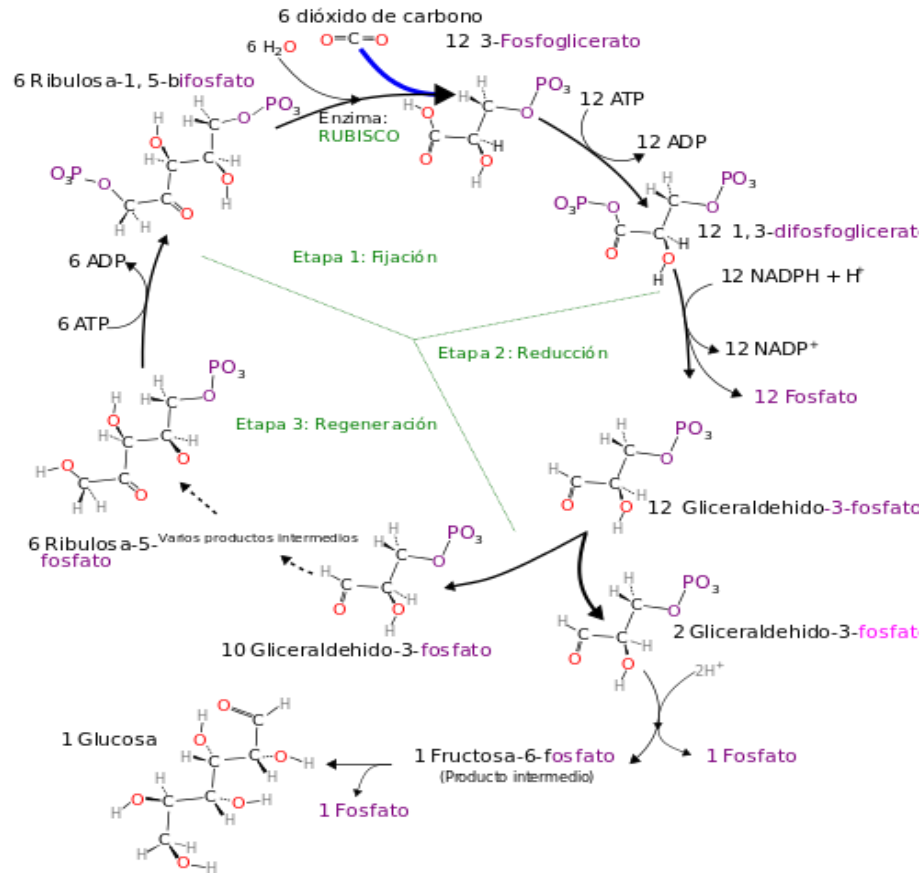


Figura 4 Fijación de carbono por el Ciclo de Calvin

En ambos tipos de metabolismo estos microorganismos aerobios y anaerobios termófilos o hipertermófilos pueden utilizar aceptores externos de electrones para oxidar con mayor rendimiento los compuestos inorgánicos y orgánicos que utilizan como fuente de carbono (Pachon & Posada, 2003) de acuerdo a lo descubierto por Bertoldo y Antranikian (2002), estos utilizan para su metabolismo sustratos poliméricos naturales como fuente de carbono y energía, así mismo Kristjansson y Hreggudsson (1995) reportaron que estos microorganismos son capaces de degradar sustratos como el almidón, celulosa, xilano, pectina y quitina.

Entre los microorganismos termófilos obligados se han reportado a *Anoxybacillus flavithermus* y *Geobacillus* spp., mientras que algunos de los microorganismos facultativos que crecen a temperaturas mesófilas y termófilas se encuentran *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis* (Burgess et al., 2010).

## **II.5 BACTERIAS DEL GÉNERO *Geobacillus***

Los microorganismos del género *Bacillus* generalmente tienen necesidades nutricionales simples, por lo tanto no requieren de aminoácidos específicos para su crecimiento y son capaces de crecer en medios simples, tales como agar tripticasa de soya (TSA) (Burges et al., 2010).

El género *Geobacillus* se estableció en el 2001, estas bacterias crecen a temperaturas entre 35 y 75°C, se han encontrado en diversas partes del mundo y se han aislado de ambientes naturales con temperaturas extremas de 80°C así como de zonas glaciares de hielo tales como manantiales termales, yacimientos de petróleo, compostas, respiraderos hidrotermales marinos, aceites, ríos, lagos y sedimentos oceánicos y en aguas del ártico.

Tras el descubrimiento de dos nuevos termófilos, aerobios, formadores de esporas en yacimientos petroleros, Nazina et al., (2001) propuso que la especie vigente de cinco grupos. Podría ser modificada a un nuevo género denominado *Geobacillus*, realizando estudios tipo fenotípico y el análisis filogenético basado en secuencias del gen 16S rRna; obtenido como resultado dos nuevas especies *Geobacillus subterraneus* y *Geobacillus uzenensis*.

## **II.6 *Geobacillus stearothermophilus***

Estos microorganismos son células motiles, con una longitud de 2 a 3.5 µm y 0.6 a 1.0 µm de diámetro (figura 4). Normalmente se presenta como células únicas o cadenas cortas. Son células elipsoidales, ocasionalmente cilíndricas, sus esporas se ubican en el área subterminal o terminal de la célula.

Las colonias son usualmente convexas, de textura cremosa, el intervalo de temperatura de crecimiento mínimo es de 30-45°C y su crecimiento máximo es a temperatura de 70-75°C. Tiene un pH óptimo entre 6-8. Este microorganismo tiene la capacidad de hidrolizar el almidón y la caseína, pero la reducción de nitratos es variable. El crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* se ha reportado que ocurre en presencia de NaCl al 2%, pero se inhibe con una concentración de 0.001%

de lisozima. La prueba bioquímica de catalasa es variable y usualmente la prueba de oxidasa es negativa. Tiene la capacidad de metabolizar hidrocarburos de cadenas C10 y C11, utilizándolo como fuente de carbono y energía. Esta descripción está basada en reportes publicados por Gordon et al., (1973), Logan y Berkeley (1984), Claus y Berkeley (1986), White et al., (1993), Kämpfer (1994), Nazina et al., (2001) y Paul de Vos (2009).

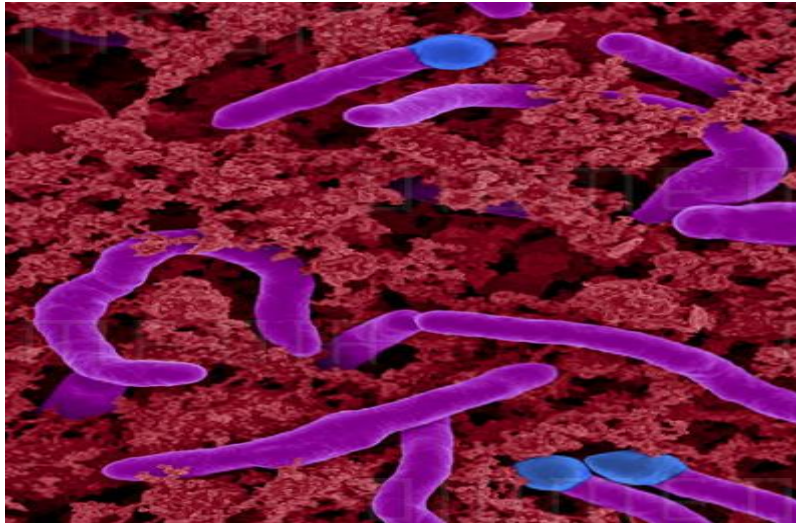


Figura 5 Vista microscópica de *G. stearothermophilus* (Kunkel,2013)

## II.7 *Geobacillus jurassicus*

Este es un microorganismo relacionado con el periodo geológico y la formación de yacimientos petrolíferos, de donde fue inicialmente aislado.

Las células son Gram positivas, alargadas con doble motilidad de flagelo peritricoso, son microorganismos productores de esporas elipsoidales en la parte terminal de la célula, esta descripción está basada en dos muestras aisladas según lo reportado por Nazina et al, 2001.

Las colonias que crecen en agar nutritivo, se ha reportado que son redondas, mucosas, incoloras y tienen un diámetro de 2 mm. Son bacterias aeróbicas y quimiórganotróficas. Como fuente de carbono y energía metaboliza hidrocarburos de cadena (C6, C10, C11, C14 y C16), hidrocarburo metano- naftenico, acetato, butirato, piruvato, lactato, benzoato, fumarato, succinato, malato, etanol, peptona,

triptona y extracto de levadura. También se ha reportado que *Geobacillus jurassicus* presenta crecimiento en caldo nutritivo y Papa Dextrosa Agar. No puede crecer en presencia de alcoholes como: metanol, propanol, butanol, isobutanol; fenol, fenilacetato; de igual forma con la presencia de aminoácidos: alanina, glutamato, serina, propionato o citrato . Se ha reportado que presenta mínimo crecimiento en presencia de asparagina y glutamina. La prueba bioquímica de catalasa es positiva y es productor de  $\text{NH}_3$  a partir de la peptona. No es degradadora de urea y tirosina. No produce  $\text{H}_2\text{S}$ , indol y dihidroxiacetona. Hidroliza la esculina y el almidón, pero no hidroliza la caseína.

No crece de manera autotrófica en presencia de  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  y no fermenta glucosa con producción de gas, las pruebas bioquímicas como Voges–Proskauer y rojo de metilo son negativas, no utiliza  $\text{Fe}^{2+}$  como aceptor de electrones. No reduce nitratos a nitritos. Crece a temperaturas entre 45 a 65°C con una temperatura óptima de crecimiento de 58-60°C. El rango de pH es de 6.4 – 7.8 con un óptimo de 7.0-7.2, puede crecer en ausencia de NaCl pero también tolera hasta una concentración de entre 5-5.5 % (p/v) de NaCl (Paul de Vos, 2009).

Estas dos especies de *Geobacillus* descritas anteriormente fueron aisladas por Meza (2015) a partir de las aguas termales del volcán el Chichón, la temperatura de la zona de recolecta del agua fue de 71.6°C con un pH de 5.4 (figura 6).



Figura 6 Toma de muestra del cráter del Volcán “El Chichón” (Meza 2015)

La importancia del estudio de los microorganismos termófilos del género *Geobacillus* es que producen numerosas enzimas extracelulares e intracelulares, por la amplia capacidad metabólica que tienen para degradar múltiples sustratos, crecer en entornos cambiantes y complejos, por esta razón son de gran importancia en procesos industriales que ha permitido abrir nuevas investigaciones en el área de la biotecnología (Al-Qodah et al., 2013).

## **MECANISMOS EN SISTEMAS GEOTERMALES**

Los sistemas geotermales ricos en compuestos azufrados generalmente están compuestos por sulfuros y azufre elemental, estos últimos son emanados de las corrientes volcánicas del interior de la tierra junto con gases como el  $H_2S$ . El  $H_2S$  es oxidado espontáneamente junto con  $O_2$ , o bien por una reacción de  $H_2S$  con el  $SO_2$ . En ambientes terrestres, los manantiales o lugares termales ricos en azufre, los depósitos de lodo y los suelos pueden alcanzar temperaturas de hasta  $100^\circ C$  y por lo general son ácidos, debido a la producción de ácido sulfúrico.  $H_2SO_4$ , procedente de la oxidación biológica de ácido sulfhídrico y azufre elemental (Madigan et al. 2000; citado por Rubiano, 2006).

En la figura 7 se observa el ciclo del azufre en aguas volcánicas con alto contenido de sulfuros que son reducidos a ion sulfuro por bacterias sulforeductoras (*Thermodesulfobacterium* spp.) luego se oxida a azufre elemental por microorganismos fotoautótrofos (*Chloroflexus* spp.) en condiciones anaerobias o aerobias facultativas y estas son oxidadas a sulfatos por microorganismos quimiolitótróficos (*Sulfurihydrogenibium* spp.) de esta manera se continua con el ciclo del azufre en aguas termales (Kubo et al. 2011).

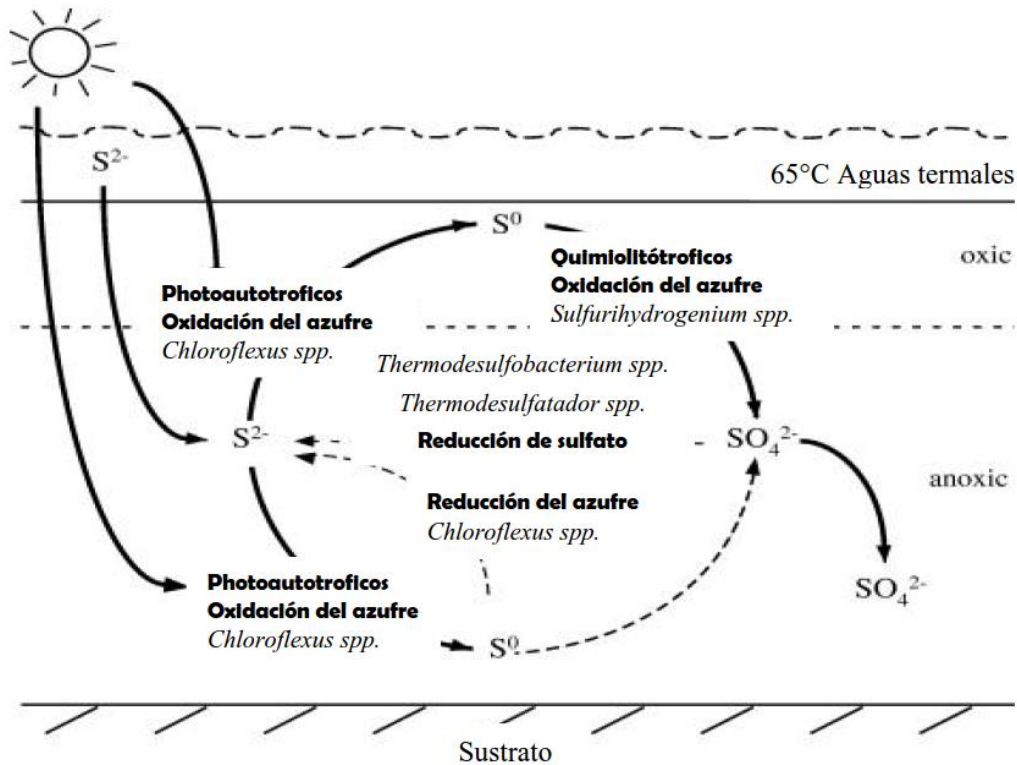


Figura 7 Ciclo del azufre simplificado en aguas termales (Kubo et al. 2011)

Por otra parte existen ambientes volcánicos marinos que usualmente albergan gran cantidad de vapor de agua,  $CO_2$ ,  $H_2S$ ,  $S^0$  y cantidades variables de  $CO$ ,  $H$ ,  $CH_4$ ,  $N$  y trazas de amonio (Kubo et al. 2011).

## II.8 MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS TERMÓFILAS

La habilidad de sobrevivir de los microorganismos termófilos en ambientes térmicos está basada en el metabolismo, la estructura y función celular de sus componentes (Stetter, 1999); se atribuye principalmente a la naturaleza de su membrana celular, la cual ésta conformada por ácidos grasos saturados que forman enlaces hidrofóbicos mucho más fuertes que los ácidos grasos insaturados, manteniendo la célula más rígida aumentando su capacidad para vivir a altas temperaturas.



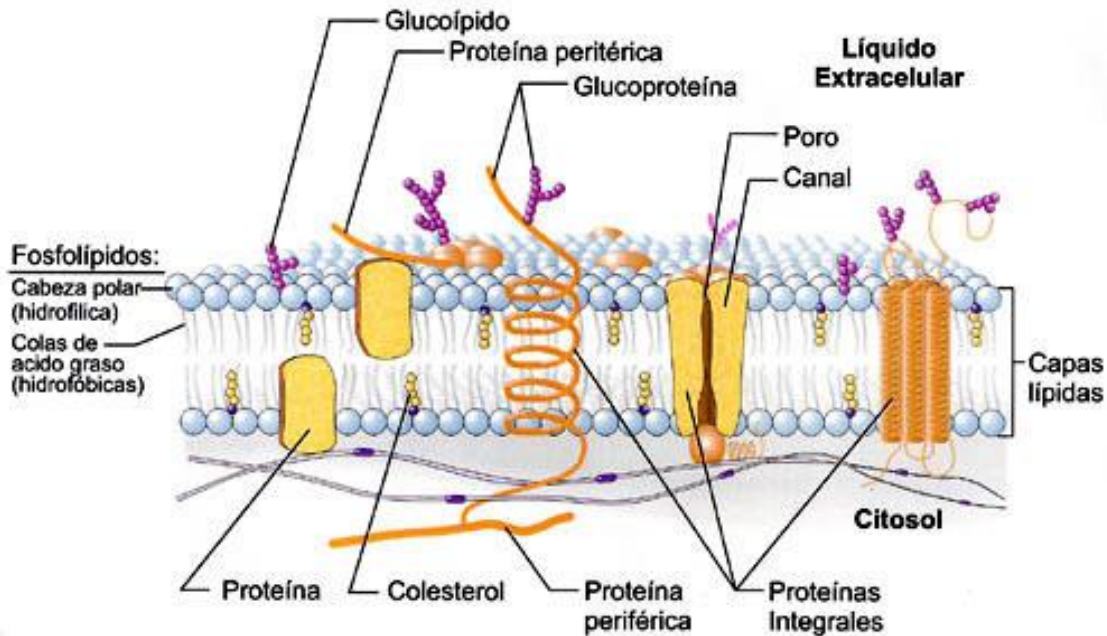


Figura 8 Membrana celular con ácidos grasos saturados presente en bacterias termófilas (Audesirk, 2003)

El grado de saturación de los ácidos grasos que componen la membrana, determina su grado de fluidez a una determinada temperatura, puesto que el funcionamiento de la membrana depende de la fluidez de los componentes lípidicos (Figura 8) (Stanier, 1992).

La mayoría de los microorganismos termófilos estudiados hasta el momento utilizan como fuente de carbono carbohidratos poliméricos tales como xilano, celulosa, ácido poligalacturónico, almidón y lignina (Cann, 2001).

## II.9 ENZIMAS TERMÓFILAS

La síntesis de enzimas termófilas son la respuesta que tienen los microorganismos termófilos a la adaptación de altas temperaturas (Figura 10), aumentando el número de enlaces iónicos y al denso empaquetamiento del interior altamente hidrofóbicos de las proteínas evitando su desnaturalización (Castillo, 2005).

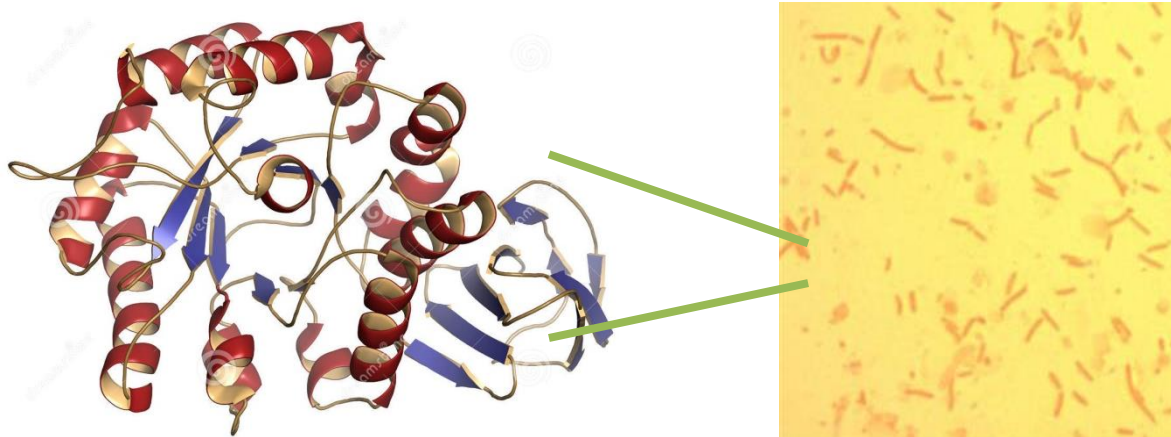


Figura 9 Enzima  $\beta$ - galactosidasa producida por *Thermus* sp. Obtenida a 70° C utilizando p-nitrofenil-alfa-D-galacto- piranosido (PNPAG) como sustrato (Herrero, 2001)

Los mecanismos estructurales que explican las mejoras en la estabilidad térmica de las enzimas son difíciles de predecir y depende de muchos factores. Entre ellos encontramos puentes disulfuro, la formación de puentes de hidrogeno y salinos o efectos cooperativos entre residuos distales que forman este tipo de enlaces, el incremento de la hidrofobicidad interna, minimización de la proporción superficie/volumen, o la estabilización de elementos de estructura secundaria o cuaternaria de la proteína (Escuder, 2013).

Análisis comparativos de proteínas mesófilas y sus homologos termofilos, asi como de proteínas obtenidas por evolución dirigida a una mayor termoestabilidad, no han encontrado grandes diferencias ni a nivel de secuencia ni a nivel estructural. Más que una única estrategia común, las evidencias sugieren que la adquisición de una mayor termoestabilidad vendría dada por combinaciones de sutiles cambios en la estructura y composición aminoacidica diferentes para cada proteínas termófila, un ejemplo es el cambio de arginina en el residuo 412 en la posición 142 por leucina en la  $\beta$ -galactosidasa (figura 9).(Escuder, 2013)

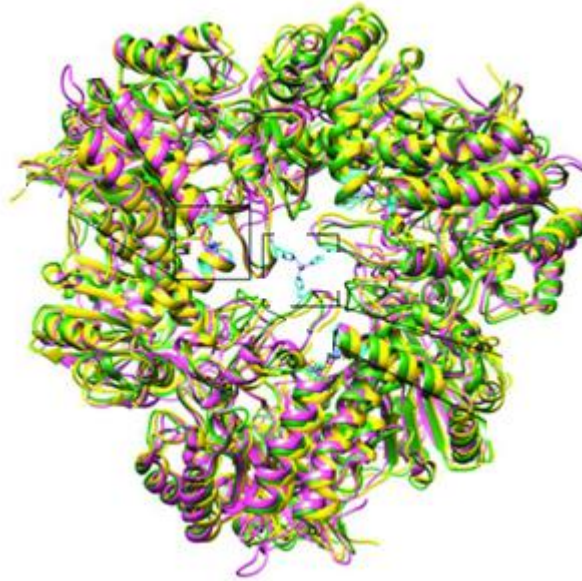


Figura 10 B-Galactosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* el enrollamiento de este polímero de aminoácidos se debe a la presencia de prolina y leucina (Escuder, 2013)( International Union of Crystallography,2015)

Algunas enzimas que hasta ahora han sido purificadas a partir de estos microorganismos termófilos, pertenecen a la clase de las hidrolasas, oxidoreductasas, proteínas redox, deshidrogenasas, hidrogenasas, esterasas, glucosa isomerasa, ADN polimerasas y nitrilasas (Bertus, 2003).

En la actualidad los microorganismos presentan un gran interés científico, debido a que la biodiversificación de estos ha iniciado un debate en cuanto al origen y límites de la vida. Así como en el campo biotecnológico, debido a un sin número de tecnologías en las que se utilizan las biomoléculas de microorganismos termófilos que son capaces de resistir en condiciones extremas de cualquier tipo, principalmente temperaturas por encima de los 50°C, como por ejemplo el empleo de enzimas termófilas que mantienen la estabilidad proteica de un producto durante el proceso de esterilización así como en el procesamiento de alimentos como el pan y el vino, favoreciendo su vida media; tratamiento de residuos, extracción de petróleo, obtención de biochips para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades (Bertus, 2003).

Por otra parte a medida que la temperatura del proceso incrementa la velocidad de reacción también; al aumentar 10°C la temperatura, la velocidad de reacción se

duplica, disminuyendo en consecuencia la cantidad de enzima necesaria. De esta forma las enzimas termófilas o termoestables están adquiriendo más importancia como biocatalizadores (Zeamos y Starnes, 1991).

## II.10 ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL AISLADAS DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS.

Diversas enzimas han sido producidas intra o extracelularmente por microorganismos termófilos, las enzimas hidrolíticas actualmente tienen una gran demanda en la industria por las múltiples aplicaciones que estas tienen en diversos procesos biotecnológicos. En el cuadro 1 se presentan algunas de estas enzimas con sus respectivas aplicaciones.

Cuadro 1. Aplicación de enzimas aisladas de microorganismos termófilos

| <b>ENZIMA</b>                    | <b>BACTERIA</b>  | <b>APLICACIÓN</b>   |
|----------------------------------|--|---|
| <b>α-AMILASA<br/>GLUCOSIDASA</b> | <i>Pyrococcus woesei</i>   | Procesamiento de almidón, glucosa, fructosa, trealosa, digestión de lactosa en leche, enzimas de sacarificación, síntesis de oligosacárido. |
| <b>LIPASA</b>                    | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ,<br><i>B. thermoleovorans</i> | Tratamiento de aguas residuales, formulación de detergentes, blanqueamiento de papel  |
| <b>XILANASA</b>                  | <i>Clostridium thermocellum</i>                                      | Procesamiento de alimentos, detergentes, producción de aminoácidos  |
| <b>PROTEASA</b>                  | <i>Thermococcus kodakarensis</i>                                     | Elaboración de detergentes, hidrólisis en alimentos, elaboración de cerveza   |
| <b>DNA-POLIMERASA</b>            | <i>Thermus aquaticus</i>   | Ingeniería genética   |

(Suarez, 2002)

Diversos autores mencionan que *Geobacillus stearothermophilus* produce diferentes enzimas tales como amilasa,  $\beta$ -galactosidasa, celulasa, xilanas (Soliman 2008; Brumm et al., 2015). *Geobacillus thermoleovorans* se ha estudiado para la producción de la enzima lipasa (Haki y Rakshit, 2003; Obdel, 2002). Lo mismo *Geobacillus thermodenitrificans* se ha reportado que produce enzima lipasa (Charbonneau et al., 2011). Dos microorganismos, *G. stearothermophilus* y *G. jurassicus* aislados del volcán Chichón han mostrado tener actividad lipolítica, sin embargo se desconoce si estos microorganismos tienen potencial para la producción de otras enzimas extracelulares, como se ha reportado en otras especies que son capaces de producir múltiples actividades enzimáticas según el sustrato empleado como única fuente de carbono.

## **II.11 ESTUDIOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE FUENTES TERMALES**

En un estudio realizado de las aguas termales de la isla de cabos de las trincheras ubicado en el estado de Carabobo, Venezuela se ha reportado la cinética del crecimiento microbiano de *Geobacillus stearothermophilus* aislado de estas fuentes termales. El crecimiento se observó en medio mínimo mineral (CuSO<sub>4</sub> 0.1 mg; FeSO<sub>4</sub> 1.0 mg; MgSO<sub>4</sub> 0.2 mg; ZnSO<sub>4</sub> 0.5 mg; NaCl 0.5 mg; NH<sub>4</sub>Cl 1.0 mg; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1 mg y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 mg, por litro de tampón fosfato 60 mM, pH 7.0) suplementado con celulosa micro-cristalina al 1% p/v. Así mismo, se realizaron ensayos sobre la actividad enzimática de celulasa y lipasa adicionando celulosa micro cristalina al 1% p/v y aceite de olivo al 1% p/v al medio mínimo mineral respectivamente; bajo distintas condiciones de pH y temperatura obteniendo los puntos de máxima actividad enzimática de celulasa a pH de 7, temperatura optima de 60°C; la mayor actividad enzimática fue reportada entre 72 y 96 h de incubación. Respecto a la enzima lipolítica la máxima actividad se reportó a 55°C y pH 10.5. En este estudio se ha reportado que *G. stearothermophilus* presentó una fase de latencia de 12 h alcanzando la máxima población bacteriana a las 60 h registrándose en este tiempo 64x10<sup>6</sup> UFC/mL (Angela, 2011; Viviano et al., 2011).

Obeidat et al., (2012) determinaron la actividad hidrolítica de ocho especies de *Geobacillus* aislados de las aguas termales localizadas en Jordania. En este estudio para evaluar el crecimiento de *Geobacillus* emplearon placas de agar nutritivo, las cuales fueron incubadas a 50°C durante 24 h obteniéndose desde 1 hasta 264 UFC/mL según las condiciones de la zona de muestreo del agua, los cuales se diferenciaban porque presentaban diferentes temperaturas (42.1-62.3°C) y pH (6-7). Por otra parte, en este estudio los autores reportan el uso del sistema Api-Zym para la determinación de diversas actividades enzimáticas, así mismo identificaron la presencia de actividad amilasa, proteasa, catalasa y oxidasa empleando sustratos específicos almidón, caseína, peróxido de hidrógeno respectivamente. Los resultados mostraron que las ocho especies estudiadas de *Geobacillus* presentaron actividad catalasa, oxidasa, amilasa, proteasa, fosfatasa alcalina y acida, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8),  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y n-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa.

Microorganismos de *Geobacillus* sp. aislados de cuatro diferentes zonas de las aguas termales de Malasia: punto A (72°C), punto B (65.8°C), punto C (55°C) y punto D (75°C), fueron reportados por Abdullah et al (2012) que son capaces de degradar el sustrato xilano demostrando con ello actividad xilanasa, pero no presentaron actividad amilasa ni celulasa, esto después de incubar las muestras durante tres días a la temperatura de muestreo del agua. El medio de cultivo empleado en este estudio contenía: 2 g/L de NaCl, 0.4 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.7 g/L de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.3 g/L de K<sub>2</sub>.HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.SO<sub>4</sub>, 20 g/L de agar bacteriológico, el pH del medio fue ajustado a 7.8. El medio fue suplementado con 0.1% del sustrato específico para cada enzima evaluada.

El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula, éste es un proceso complejo que supone la replicación de todas las estructuras y componentes celulares a partir de nutrientes exógenos, orgánicos e inorgánicos. Tomando como referencia la formulación de medios de cultivos a base de sulfatos, carbonatos y fosfatos propuestos por Brooke y Freeze en 1969 y Nazina en 2005, se propuso en este proyecto el estudio de

diferentes medios de cultivo, tales como el Medio Basal Mineral y Medio Mínimo, los cuales son adecuados para suplir los requerimientos nutricionales del hábitat natural de microorganismos termófilos, debido a altas y variadas concentraciones de iones característicos presentes en las aguas termales de las cuales son aislados.

## **II.12 SISTEMA DE INVESTIGACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS API-ZYM**

El método Api-Zym es un micrométodo semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas aplicable a diferentes tipos de muestra (microorganismos, suspensiones celulares, tejidos, líquidos biológicos, etc.). Permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra.

La galería API-ZYM se compone de 20 cúpulas especialmente adaptadas al estudio de las reacciones enzimáticas. El fondo de la galería está constituido por una trama de fibras inertes, en donde están repartidos por sustratos semi-sintéticos. Este soporte favorece las reacciones enzimáticas al mismo tiempo que los sustratos enzimáticos son insolubles. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color que se revelan mediante la adición de reactivos. La lectura de estas reacciones se realizan con la ayuda de la tabla de lecturas (cuadro 2) (BIOMERIEUX, 2014).

Cuadro 2. Interpretación de las lecturas del Kit Api-ZYM

| N° | ENZIMA                             | SUSTRATO                                    | pH  | REACCIÓN   |                                |
|----|------------------------------------|---|-----|--|--------------------------------|
|    |                                    |   |     | Positivo   | negativo                       |
| 1  | CONTROL                            |   |     | incoloro o color de la muestra según la importancia de la coloración |                                |
| 2  | Fosfatasa alcalina                 | 2-naftil fosato                             | 8,5 | Violeta  | incoloro o amarillo muy pálido |
| 3  | Esterasa (C4)                      | 2-naftil butirato                           | 6,5 | Violeta  |                                |
| 4  | Esterasa Lipasa (C8)               | 2-naftil caprilato                          | 7,5 | Violeta  |                                |
| 5  | Lipasa (C14)                       | 2-naftil miristato                          | 7,5 | Violeta  |                                |
| 6  | Leucina arilamidasa                | L-leucil-2-naftilamina                      | 7,5 | Naranja  |                                |
| 7  | valina arilamidasa                 | L-valil-2-naftilamida                       | 7,5 | Naranja  |                                |
| 8  | Cistina arilamidasa                | L-cistil-2-naftilamida                      | 7,5 | Naranja  |                                |
| 9  | Tripsina                           | N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida         | 8,5 | Naranja  |                                |
| 10 | $\alpha$ -quimotripsina            | N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida       | 7,5 | Naranja  |                                |
| 11 | Fosfatasa acida                    | 2-naftil fosfato                            | 5,4 | Violeta  |                                |
| 12 | Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa        | Naftol-AS-BI-fosfato                        | 5,4 | Azul   |                                |
| 13 | $\alpha$ -galactosidasa            | 6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-galactopiranosido | 5,4 | Violeta  |                                |
| 14 | $\beta$ -galactosidasa             | 2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosido       | 5,4 | Violeta  |                                |
| 15 | $\beta$ -glucuronidasa             | Naftol-AS-BI- $\beta$ D-glucoronido         | 5,4 | Azul   |                                |
| 16 | $\alpha$ -glucosidasa              | 2-naftil- $\alpha$ D-glucopiranosido        | 5,4 | Violeta  |                                |
| 17 | $\beta$ -glucosidasa               | 6-Br-2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosido  | 5,4 | Violeta  |                                |
| 18 | N-acétil- $\beta$ -glucosaminidasa | 1-naftil-N-acétil- $\beta$ D-glucosaminido  | 5,4 | Marron   |                                |
| 19 | $\alpha$ -mannosidasa              | 6-Br-2 naftil- $\alpha$ D-mannopiranosido   | 5,4 | Violeta  |                                |
| 20 | $\alpha$ -fucosidasa               | 2-naftil- $\alpha$ L-fucopiranosido         | 5,4 | Violeta  |                                |

(Biomierux, 2014)



### **III. OBJETIVO**

#### **III. 1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el comportamiento cinético del crecimiento y el potencial enzimático extracelular de *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus* en cinco diferentes medios de cultivo.

#### **III. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar la capacidad de crecimiento *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus* en cinco diferentes medios de cultivo.
- Evaluar el potencial enzimático de *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus* para producir enzimas termoestables empleando el kit Api-ZYM.
- Evaluar el potencial enzimático de *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus* para producir enzimas termoestables empleando sustratos específicos en los cinco diferentes medios de cultivo.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS**

Las cepas de *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus* se mantienen conservadas con glicerol estéril al 30% v/v a temperatura de -20°C, estas fueron aisladas de las aguas termales del volcán el Chichón ubicado en el estado de Chiapas por Meza (2015). Así mismo se mantienen en cultivo líquido en Medio Productor de Lipasas (MPL) en condiciones de refrigeración.

### **IV.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Geobacillus***

Las cepas de *Geobacillus stearothermophilus* y de *Geobacillus jurassicus* fueron obtenidas de stocks con MPL:glicerol (70:30 v/v) las cuales se encuentran conservadas en el Polo Tecnológico Nacional de Investigación y Desarrollo de Pruebas Analíticas en Biocombustibles, se adicionó 1 mL de la cepa glicerizada en 100 mL de medio productor de lipasas, la incubación se llevó a cabo a una temperatura de 71.2 °C durante 72 horas.

Una vez que las cepas fueron reactivadas, 10 mL del respectivo cultivo se empleó como inóculo y se adicionó a 250 mL de MPL, las condiciones de incubación fueron las mismas condiciones citadas anteriormente, posteriormente se utilizó este último caldo como inóculo para realizar las respectivas cinéticas de crecimiento.

### **IV.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Geobacillus***

Con la finalidad de conocer el crecimiento de las dos cepas de *Geobacillus* aisladas del volcán el Chichón; se evaluaron las cinéticas de crecimiento microbiano en cinco medios de cultivo: 1) Medio productor de lipasas; 2) Medio base; 3) Medio PDA; 4) Medio mínimo; 5) Medio basal mineral.

| <b>MEDIO DE CULTIVO</b>          | <b>COMPOSICIÓN</b>  |
|----------------------------------|---|
| Medio productor de lipasas (MPL) | Peptona de caseína 6 g/L; extracto de levadura 2 g/L; CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 0,2 g/L; MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.1 g/L; solución stock de FeCl <sub>3</sub> al 1% 0.4 mL/L; aceite de oliva 15 mL/L   |
| Medio Base (MB)                  | Extracto de levadura 1 g/L; aceite de oliva 5 mL/L; cloruro de sodio 2 g/L; MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.4 g/L; MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 0.7 g/L; CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 0.5 g/L; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.3 g/L; KHPO <sub>4</sub> 0.3 g/L; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g/L; solución de vitaminas 10 mL/L |
| Medio Papa-Dextrosa (PDA)        | Infusión de papa 250 g en 500 mL; 20 g/L de dextrosa; 20 g/L de agar  |
| Medio Mínimo (MM)                | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.5 g/L; KHPO <sub>4</sub> 2.5 g/L; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.0 g/L; MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.2 g/L; FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.01 g/L   |
| Medio Basal Mineral (MBM)        | KHPO <sub>4</sub> 0.1 g/L; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g/L; MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 0.01 g/L; NaCl 0.01 g/L   |

Las unidades experimentales fueron matraces Erlenmeyer de 1 L, los cuales contenían un volumen de medio de cultivo estéril de 250 mL de cada uno de los medios descritos anteriormente. La cantidad de inóculo empleado fue del 5% v/v, siguiendo la metodología empleada por Pedroza en 1997 para microorganismos termófilos. Una vez inoculado los matraces estos se incubaron en una incubadora con agitación orbital y temperatura controlada marca LUMISTELL modelo IRO-65. La incubación se realizó a temperatura de 71.2°C con agitación de 120 rpm con base a los resultados de Meza (2015). El tiempo de incubación de acuerdo a las pruebas preliminares fue de 8 días (192 h). Durante el crecimiento se tomaron alícuotas de 3 mL cada 24 horas, con la finalidad de determinar en un espectrofotómetro marca BECKMAN COULTER modelo DU730 la absorbancia a 620 nm y obtener la

Densidad Óptica (D.O.) como una medida del crecimiento microbiano obteniendo de esta forma la cinética de crecimiento en cada medio de cultivo.

#### **IV.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS *Geobacillus***

Con la finalidad de evaluar si la morfología de *Geobacillus stearothermophilus* y *Geobacillus jurassicus* presenta algún cambio de acuerdo a la composición del medio de cultivo en que se siembra, se prepararon las respectivas cajas Petri con los diferentes medios de cultivo descritos anteriormente en el apartado IV.3, adicionando 17 g/L de agar a cada uno. Una vez solidificado el medio de cultivo en las cajas Petri, éstas se inocularon mediante el método de varilla acodada, para ello se empleó una alícuota de 100 µL y se incubaron durante 72 h a una temperatura de 71.2°C en la incubadora marca FELISA modelo FE-133AD. Transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento de los *Geobacillus* en un microscopio con objetivo 100X para evidenciar las morfologías microscópicas de ambas cepas en los cinco distintos medios de cultivo estudiados.

#### **IV.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Con la finalidad de determinar el potencial enzimático de las cepas de *Geobacillus* se emplearon medios específicos (Medio de cultivo + sustrato) y el kit Api-ZYM.

La prueba de actividad enzimática se realizó en cajas Petri con los medios de cultivo sólidos MPL, Medio Base, PDA, Medio Mínimo y Medio Basal Mineral adicionando los sustratos Almidón, Sacarosa, Galactosa, Celulosa, Pectina, Caseína, Arabinosa, Xilosa y Celobiosa a una concentración del 1% v/v (Oliart-Ros et al., 2010). El inóculo empleado para la siembra de las cajas Petri fue de una asada y se tomó en la fase exponencial de cada uno de los medios de cultivo de la cepa correspondiente y fueron sembrados por el método de siembra puntual, se incubó durante 48 h a temperatura de 71.2°C para determinar cualitativamente la presencia de la enzima respectiva. La cual se hace evidente mediante la formación de un halo alrededor de la colonia.

Por otra parte, también se empleó el sistema de identificación de actividades enzimáticas Api-ZYM que permite determinar cualitativamente 20 enzimas hidrolíticas las cuales son: fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa,  $\alpha$ -mannosidasa,  $\alpha$ -fucosidasa.

En donde se centrifugó a 10000 rpm medio MPL inoculados, hasta obtener una pastilla de células, para posteriormente preparar con suspensión médium una solución 1.25 D.O, se tomarán 60  $\mu$ L de esta solución a cada cúpula, se incubó a 71.2 °C durante 1 hora, en un ambiente saturado.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Geobacillus jurassicus* EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de *G. jurassicus* en cinco medios: productor de lipasas, base, papa-dextrosa, basal mineral y mínimo, con la finalidad de conocer el comportamiento del mismo. En los cinco medios se puede observar (figura 11) que presentó crecimiento *G. jurassicus*; sin embargo, dependiendo de la composición de los medios se favoreció en menor o mayor medida el crecimiento. Las curvas de crecimiento permiten observar (figura 11) que el mayor crecimiento se presentó en los medios productor de lipasa (MPL) y Medio basal Mineral (MBM), alcanzándose una máxima D.O. a 600 nm de  $14.53 \pm 0.2$  a las 192 h de incubación y  $7.41 \pm 0.2$  a las 148 h de incubación respectivamente. En MPL tienen como fuente de carbono el aceite de oliva y como fuente de energía la peptona de caseína y el extracto de levadura, estos compuestos orgánicos se ha reportado que favorecen el crecimiento de microorganismos del género termófilo, así mismo las sales minerales que contiene MBM en su composición podrían estar simulando el ambiente sulfuroso del agua del cráter del volcán (Brock, 1978).

El medio papa-dextrosa es un medio específico para hongos; sin embargo, Nazina et al (2001) reportaron buen crecimiento de *Geobacillus* en este medio de cultivo, esto es atribuido a la complejidad de los nutrientes que componen el medio, como es el almidón que aporta la infusión de papa, así como la concentración del 2% de glucosa que contiene; es importante mencionar que la alta concentración de carbohidratos podría provocar la inhibición del crecimiento o bien la prolongación de la fase de adaptación. Un comportamiento semejante se presentó empleando medio base, siendo este un medio rico en nutrimentos complejos que son fuentes de carbono y de energía y un complejo vitamínico que debería favorecer y el crecimiento celular, Sin embargo, el poco crecimiento presentado en el medio base, pudo deberse a la baja concentración de su fuente de carbono que es el aceite de oliva, actuando este como reactivo limitante, alcanzando una DO a 600 nm de  $4.36 \pm 0.03$ .

En medio mínimo (MM) *Geobacillus jurassicus* presentó un considerable crecimiento, alcanzándose una D.O de  $3.77 \pm 0.02$  respectivamente esto es debido a que *G. jurassicus* es un microorganismo quimilitótrofo, por ello, es capaz de generar la energía necesaria para llevar a cabo su metabolismo a partir de compuestos inorgánicos, aprovechando entonces los fosfatos, sulfatos y sales contenidas en estos medios de cultivo. Esto comprueba lo dicho por Brock, (1978) utilizando medios de este tipo para suplir los requerimientos nutricionales del hábitat natural.

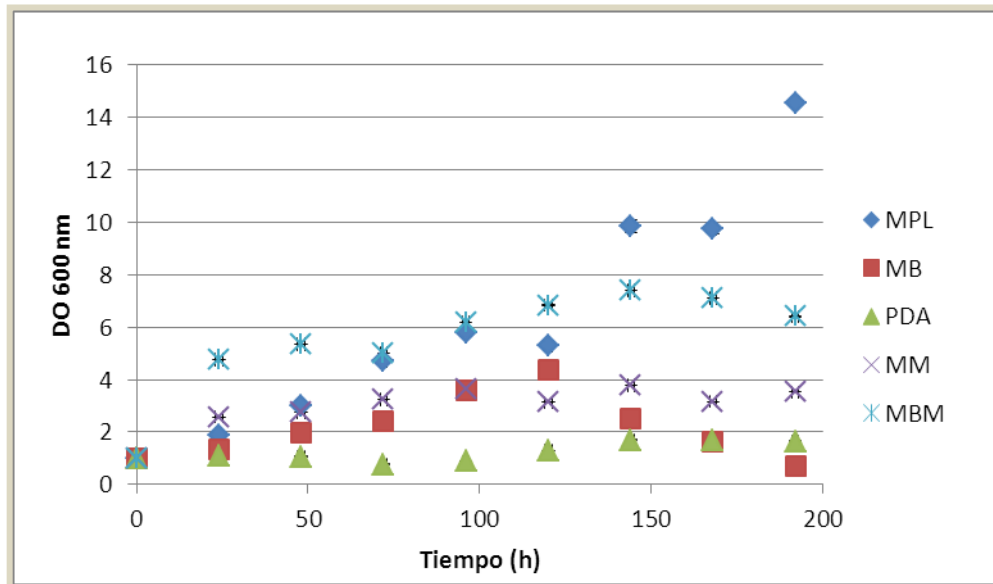


Figura 9 Cinética de crecimiento de *G. jurassicus* en diferentes medios de cultivo

## V.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Geobacillus stearothermophilus*

El comportamiento de las cinéticas de crecimiento de *G. stearothermophilus* en los diferentes medios de cultivo estudiados se presentan en la figura 12, observándose mayor crecimiento en el MPL alcanzando una D.O. máxima de  $24.48 \pm 0.3$  a las 192 h de fermentación, niveles de crecimiento microbiano ( $14.53 \pm 0.04$ ) fueron alcanzados en el MB a las 168 horas de la cinética. En los medios de cultivo papa dextrosa, basal mineral y mínimo, el crecimiento de *G. stearothermophilus* fue muy poco alcanzándose una máxima D.O. de  $2.91 \pm 0.01$  a las 96 h,  $3.42 \pm 0.01$  a las 144 h,  $5.40 \pm 0.003$  a las 192 h de la cinética de crecimiento; respectivamente.

La similitud del comportamiento del crecimiento entre *G. jurassicus* y *G. stearothermophilus* en los medios de cultivo empleados puede deberse a que ambas cepas fueron aisladas del mismo punto geográfico, en las mismas condiciones ambientales y fisicoquímicas, y concentraciones del lago del volcán (Meza, 2015).

El crecimiento que se observa en el MB, puede atribuirse a que estos microorganismos aprovechan algunas de las vitaminas utilizadas en la formulación de este medio tal como el hierro, ácido fólico y vitamina B12, las cuales favorecen el crecimiento microbiano, según lo reportado por Rubiano (2006).

Siendo *Geobacillus* un microorganismo termófilo proveniente de aguas termales, se le atribuye que tiene un metabolismo quimiolitotrófico (Pachón, 2003), por lo que metaboliza algunos elementos inorgánicos para llevar a cabo las actividades bioquímicas metabólicas de oxidación del nitrógeno, hierro o azufre, los cuales son elementos que forman parte de la composición de los medios de cultivo estudiados en este proyecto, el medio basal mineral y el medio mínimo, utilizando como fuente de energía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$ , lo cual se afirma con lo dicho por Winogradsky (1980), donde conceptualiza el metabolismo quimiolitotrófico como la capacidad de desarrollo y crecimiento de un microorganismo en un medio totalmente mineral, en el que se encuentra la sustancia inorgánica oxidable.

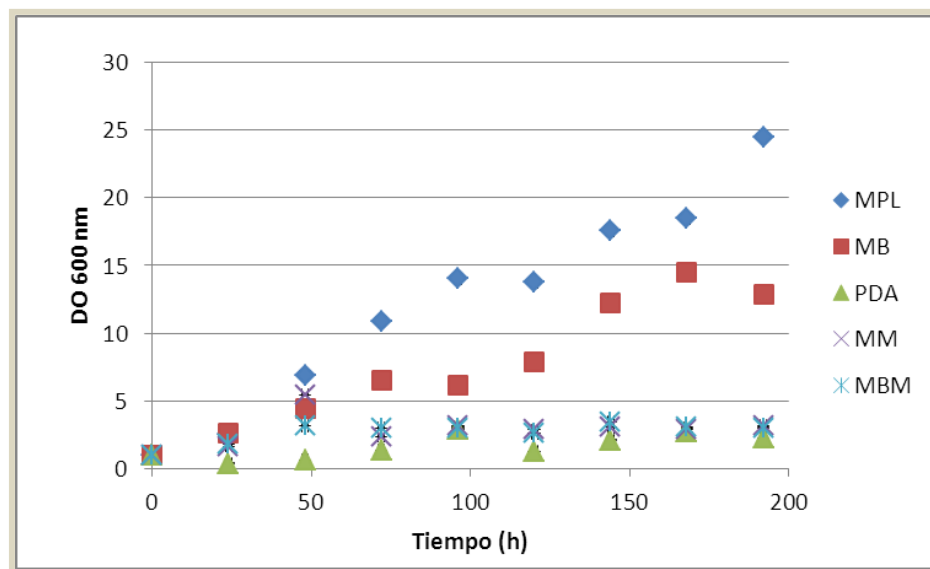


Figura 10 Cinética de crecimiento de *G. stearothermophilus* en diferentes medios de cultivo



Ambos microorganismos, *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus* presentan altas y bajas Densidades Ópticas durante la evolución del crecimiento en los cinco distintos medio de cultivos, este comportamiento es más evidente en los medios MPL y MB con D.O. a 600 nm de  $2.9 \pm 0.4$  y  $2.34 \pm 0.15$  respectivamente, esto es atribuido a la actividad metabólica producida por los *Geobacillus* estudiados en presencia del aceite de olivo (ácido oleico, ácido palmítico y ácido linoleico), un triacilglicerol de cadena larga, el cual es empleado como fuente de carbono para inducir una mayor actividad enzimática, llevando acabo las reacciones de catálisis en las interfaces agua-aceite (Gupta et al 2004; Jaeger y Ritz, 1998). Es importante mencionar que tanto el crecimiento como la actividad metabólica de los *Geobacillus* están asociados directamente a los ácidos grasos presentes en la membrana, ya que el grado de saturación de los ácidos grasos o lípidos de la membrana determinan el grado de fluidez a una determinada temperatura, puesto que el funcionamiento de la membrana depende de la fluidez de los lípidos componentes Stanier, (1992). Provocando así la disponibilidad de los nutrientes de los medios empleados y favoreciendo o no su crecimiento, así como la síntesis de metabolitos aplicables a distintos sectores comerciales.

### **V.3 Morfología de *Geobacillus jurassicus* en diferentes medios de cultivo**

En la figura 13 se observa claramente la influencia del medio del cultivo sobre la morfología microscópica a 100 X con tinción de gram de *G. jurassicus*. En los cinco diferentes medios de cultivo empleados se puede observar que independientemente del medio de cultivo donde se hizo crecer a *G. jurassicus*, éste presentó similitud en la morfología, presentándose como células en forma de bastón (bacilos), las cuales pueden estar o no unidas entre ellas, lo que concuerda con lo reportado por Labrador (2006).

Sin embargo, la influencia del medio se ve reflejado en el tamaño de la colonia, la movilidad, la producción de esporas con tincion con verde malaquita, así como en la producción de metabolitos difíciles de identificar durante la etapa de crecimiento

logaritmico, observándose así los distintos comportamientos que presenta *Geobacillus jurassicus*, esto es influenciado por la composición de los medios de cultivo y por el estrés al que es sometido el microorganismo debido a la ausencia o el exceso de nutrientes en los medios de cultivo (Brock, 1978).

El tamaño de *G. jurassicus* presentado en el medio papa-dextrosa puede deberse a que este microorganismo sufre una mala adaptación al medio de cultivo inhibiéndose la fragmentación de las células mas no el crecimiento celular, según lo reportado por Pumarola (1987).

En el medio mínimo se aprecia que las células se encuentran dentro de una sustancia viscosa, probablemente puede ser debido a que este microorganismo forma una micela en las concentraciones de aceite que pertenecen al inóculo inicial, o bien bajo estas condiciones, sintetiza un producto capaz de permitir la sobrevivencia y su posible duplicación de *G. jurassicus* gracias a que lleva acabo reacciones de mantenimiento, para metabolizar la energía química y producir metabolitos precursores que participan en las reacciones biosintéticas, que conducen a la síntesis de compuestos denominados unidades estructurales que se polimerizan para formar macromoléculas que luego se ensamblan en las diversas estructuras celulares (Stanier, 1992), lo que se ve reflejado en los niveles de D.O. alcanzados en la cinética de crecimiento.

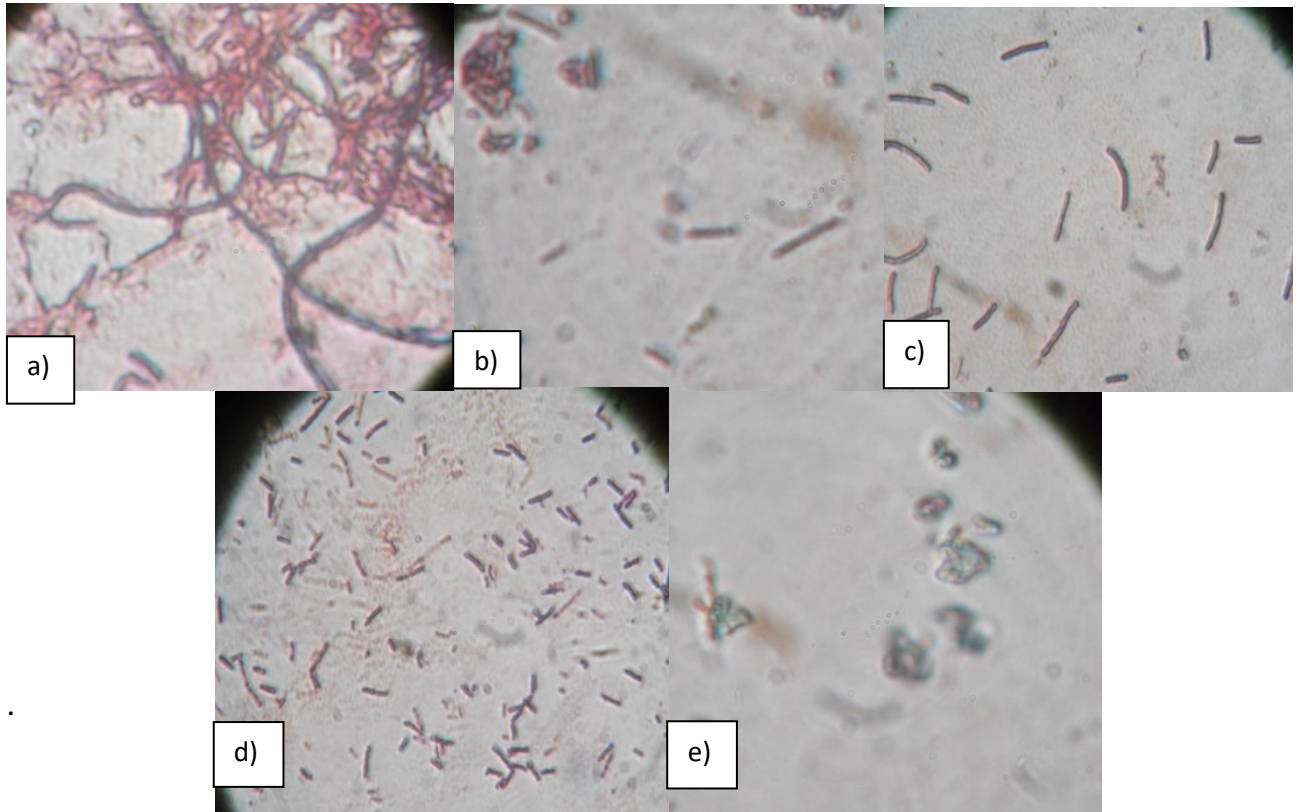


Figura 11 Vista al microscopio a 100X de *Geobacillus jurassicus* cultivado en a) medio productor de lipasas, b) medio base, c) medio papa-dextrosa, d) medio basal mineral y e) medio mínimo.

#### V.4 Morfología de *Geobacillus stearotherophilus* en diferentes medios de cultivo

La estructura morfológica de *G. stearotherophilus* (figura 14) es muy similar al de *G. jurassicus*, sin embargo, varían en la forma en la que interactúan en el medio de cultivo. En la figura 10a que corresponde a la morfología en el MPL, se observa un desorden estructural en el crecimiento de *G. stearotherophilus*, formando redes, esto puede atribuirse a una mayor movilidad de *G. stearotherophilus* en comparación a *G. jurassicus*. También se puede considerar que este comportamiento estructural, puede ser debido al empaquetamiento de los lípidos presentes en la membrana celular, ya que en general los ácidos grasos saturados presentes en la membrana celular de microorganismos termófilos forman enlaces hidrofóbicos mucho más fuertes que los ácidos grasos insaturados (Roldan, 2008). Por lo que el

comportamiento de *G. stearothermophilus* nos puede sugerir que en su membrana se encuentran presentes más ácidos grasos saturados que insaturados con respecto a *G. jurassicus*.

La descripción morfológica de *G. stearothermophilus* en el MM es distinta a la observada en los otros medios de cultivo, ya que en este se puede observar células libres que se encuentran afuera de la sustancia viscosa de color verde. La presencia de dicha sustancia se puede atribuir a que ambos microorganismos fueron sometidos a un estrés nutricional viéndose en la necesidad de producir un agente protector, metabolito o bien una sustancia que provocará la biodisponibilidad de los nutrientes. A diferencia de los otros medios en donde se observa el crecimiento aglomerado de *G. stearothermophilus*, en el medio mineral la presencia de células libres también puede ser atribuido al aumento de la tensión superficial provocada por la presencia del aceite de olivo presente en el medio de cultivo o bien a una sustancia insoluble o pocos soluble, sintetizando moléculas con propiedades tensoactivas que favorecen la biodegradación de los sustratos insolubles; como biosurfactantes los cuales tienen las propiedades emulsificante y dispersante, una propiedad común principalmente de hongos y bacterias termófilas según lo reportado por Suppaphot et al., (2011).

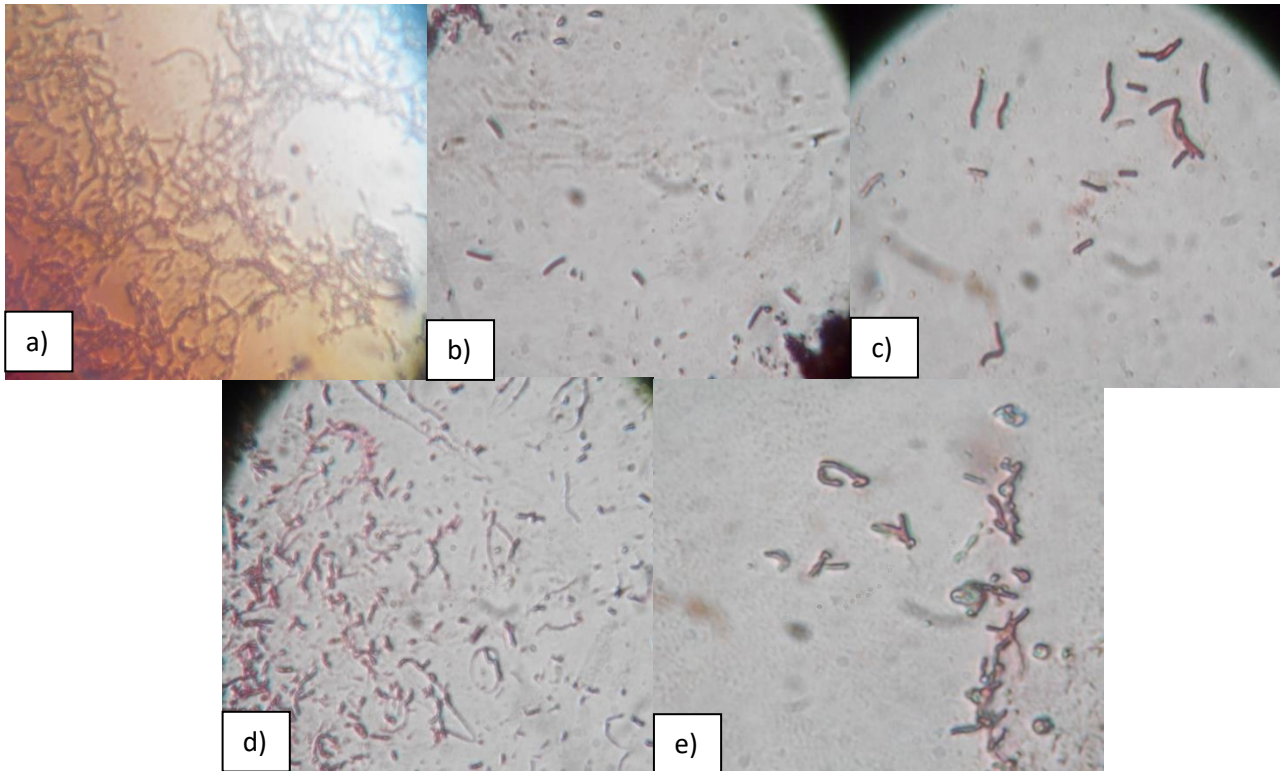


Figura 12 Vista al microscopio a 100X de *Geobacillus stearothermophilus* cultivado en a) medio productor de lipasas, b) medio base, c) medio papa-dextrosa, d) medio basal mineral y e) medio mínimo

#### **V.4 Identificación de la actividad enzimática de *G. jurassicus* y *G. stearothermophilus* empleando medios específicos**

Con la finalidad de identificar el posible potencial biotecnológico de ambas cepas de *Geobacillus* aisladas del volcán “El Chichón” se determinó su capacidad para producir enzimas extracelulares en diferentes medios de cultivo específicos (cuadros 3, 4, 5, 6 y 7), empleando una técnica de siembra puntual con micropipeta marca eppendorf (20-200  $\mu$ L), esto debido a que fue la mejor técnica en pruebas preliminares. En general, las enzimas excretadas en los distintos medios de cultivo por los *Geobacillus* estudiados, dependen de la composición base del medio y se evidencia su presencia al formarse un halo alrededor de la colonia crecida en el medio suplementado con sustratos específicos, no se realizaron análisis cuantitativo

en este procedimiento, ya que los halos evidenciados se presentan de manera amorfa que impide una medición exacta y precisa, esto debido a la característica de crecimiento disperso de ambos *Geobacillus*.

En el MPL (cuadro 3) los dos microorganismos de *Geobacillus* estudiados fueron capaces de hidrolizar el almidón y la galactosa, lo que indica que son productoras de amilasa y galactoquinasas y/o galactosa 1-P uridil transferasa (Holton, 2001), respectivamente, mientras que sólo *G. jurassicus* presentó actividad celulosa y glucosidasa que hidroliza la celulosa y la celobiosa respectivamente. Los sustratos de caseína, arabinosa y xilosa fueron hidrolizados sólo por *G. stearothermophilus*, lo que evidencia la capacidad de este microorganismo en producir enzimas con actividad proteasa respectivamente, resultados similares fueron reportados por Atlas y Bartha (1993) quienes mencionan que microorganismos del género *Geobacillus* son capaces de producir enzimas proteasas y lipasas cuando se hace crecer en medios suplementados con el sustrato específico, siendo esta una característica de los microorganismos termófilos. De igual manera Nazina et al., (2005) evidenciarán la capacidad de los *Geobacillus* en producir enzimas amilasas.

Cuadro 3. Identificación de la actividad enzimática extracelular en el MPL

| Sustrato  | Enzima                | <i>G. jurassicus</i> | <i>G. stearothermophilus</i> |
|-----------|-----------------------|----------------------|------------------------------|
| Almidón   | Amilasa               | +                    | +                            |
| Sacarosa  | Sacarasa              | -                    | -                            |
| Galactosa | Galactoquinasa        | +                    | +                            |
| Celulosa  | Celulasa              | +                    | -                            |
| Pectina   | Pectinasa             | -                    | -                            |
| Caseína   | Caseínasa             | -                    | +                            |
| Arabinosa | L-Arabinosa isomerasa | -                    | +                            |
| Xilosa    | Xilosa Isomerasa      | -                    | +                            |
| Celobiosa | $\beta$ -glucosidasa  | +                    | -                            |

Cuadro 4. Identificación de la actividad enzimática extracelular en MB

| Sustrato  | Enzima                   | <i>G. jurassicus</i> | <i>G. stearothermophilus</i> |
|-----------|--------------------------|----------------------|------------------------------|
| Almidón   | Amilasa                  | +                    | +                            |
| Sacarosa  | Sacarasa                 | +                    | -                            |
| Galactosa | Galactoquinasa           | -                    | -                            |
| Celulosa  | Celulasa                 | +                    | -                            |
| Pectina   | Pectinasa                | +                    | -                            |
| Caseína   | Caseínasa                | +                    | +                            |
| Arabinosa | L-Arabinosa<br>isomerasa | +                    | +                            |
| Xilosa    | Xilosa Isomerasa         | -                    | +                            |
| Celobiosa | $\beta$ -glucosidasa     | +                    | -                            |

En los MPL y MB (cuadro 3 y 4) suplementados con los nueve distintos sustratos específicos adicionados individualmente, ambos *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus*, fueron capaces de producir diferentes actividades enzimáticas, esto puede ser atribuido a que las células se aprovechan de la catálisis específica para canalizar las sustancias hacia rutas metabólicas que le son de utilidad como la oxidación de ácidos grasos y ciclo de ácidos carboxílicos. (Mathews, 2002).

Al analizar los resultados de capacidad enzimática extracelular obtenido empleando el medio de cultivo papa dextrosa (cuadro 5), se observó que no hubo crecimiento de ambos *Geobacillus* en las cajas Petri con sustrato específico; sin embargo, hubo la formación de halo (Anexo 6 y 7), lo cual es indicativo de la presencia de la respectiva actividad enzimática; afirmando con estos resultados la síntesis de amilasas por ambas cepas de *Geobacillus* estudiadas, resultados similares fueron reportados por Nazina (2005). Sin embargo, Pal y KUndu (1978), mencionaron que los azúcares pueden influir de manera favorable como en contra en la producción de enzimas, ya que se puede llevar a cabo una regulación catabólica por alta concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis de almidón, reprimiendo la catálisis de otras fuentes de carbono como galactosa, arabinosa, etc.

Cuadro 5. Identificación de la actividad enzimática extracelular en PDA con sustratos específicos

| <b>Sustrato</b> | <b>Enzima</b>            | <b><i>G. jurassicus</i></b> | <b><i>G. stearothermophilus</i></b> |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Almidón         | Amilasas                 | +                           | +                                   |
| Sacarosa        | Sacarasa                 | -                           | -                                   |
| Galactosa       | Galactoquinasa           | -                           | -                                   |
| Celulosa        | Celulasa                 | -                           | -                                   |
| Pectina         | Pectinasa                | -                           | -                                   |
| Caseína         | Caseínasa                | -                           | -                                   |
| Arabinosa       | L-Arabinosa<br>isomerasa | -                           | -                                   |
| Xilosa          | Xilosa Isomerasa         | -                           | -                                   |
| Celobiosa       | $\beta$ -glucosidasa     | -                           | -                                   |

Los resultados de las actividades enzimáticas excretadas por los *Geobacillus* en los dos medios minerales estudiados, MM y MBM, se presentan en los cuadros 6 y 7 respectivamente. La presencia de actividad amilasa y proteasa fue posible identificar en el MM (cuadro 6), al observarse la formación de un halo alrededor de la colonia de *G. jurassicus* cuando el medio de cultivo fue suplementado con almidón o caseína respectivamente. Mientras que *G. stearothermophilus* adicionalmente también presentó actividad pectinasa y  $\beta$ -1,4 glucosidasa al hidrolizar los sustratos específicos de pectina y celobiosa respectivamente.



Cuadro 6. Identificación de la actividad enzimática extracelular en MM

| <b>Sustrato</b> | <b>Enzima</b>            | <b><i>G. jurassicus</i></b> | <b><i>G. stearothermophilus</i></b> |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Almidón         | Amilasa                  | +                           | +                                   |
| Sacarosa        | Sacarasa                 | -                           | -                                   |
| Galactosa       | Galactoquinasa           | -                           | -                                   |
| Celulosa        | Celulasa                 | -                           | -                                   |
| Pectina         | Pectinasa                | -                           | +                                   |
| Caseína         | Caseínasa                | +                           | +                                   |
| Arabinosa       | L-Arabinosa<br>isomerasa | -                           | -                                   |
| Xilosa          | Xilosa Isomerasa         | -                           | -                                   |
| Celobiosa       | $\beta$ -glucosidasa     | -                           | +                                   |

En el medio basal mineral (cuadro 7) sólo fue posible identificar la presencia de la actividad amilasa al formarse un halo alrededor de la colonia de ambos *Geobacillus* en las cajas Petri suplementadas con almidón, los demás sustratos específicos no fueron hidrolizados por lo que en este medio de cultivo no se evidencian otras enzimas extracelulares.

Los resultados obtenidos en ambos medios minerales estudiados son atribuidos a la composición de ambos medios de cultivo, los cuales sus componentes se basan en compuestos inorgánicos, ya que como se ha hecho mención estos son microorganismos quimiolitótrofos; sin embargo, el medio mínimo contiene  $\text{FeSO}_4$ , en donde el  $\text{Fe}^{+2}$  puede actuar como cofactor para favorecer el crecimiento microbiano, al mismo tiempo que puede actuar como una metaloenzima como reactivo redox (Mathews, 2002). La energía obtenida de los procesos oxidativos es utilizada para la fijación de carbono o incorporación de compuestos orgánicos, el mantenimiento celular y el crecimiento microbiano según lo establecido por Winogradsky a principios del siglo XX. Empleando así los electrones generados en la producción de ATP, durante el ciclo de Calvin. Estos fenómenos metabólicos son característicos de

microorganismos termófilos aislados de fuentes termales y volcánicas, por lo que las enzimas excretadas en estos medios de cultivos pueden tener aplicación en la industria minera.

Cuadro 7. Identificación de la actividad enzimática extracelular en MBM

| Sustrato  | Enzima                   | <i>G. jurassicus</i> | <i>G. stearothermophilus</i> |
|-----------|--------------------------|----------------------|------------------------------|
| Almidón   | Amilasa                  | +                    | +                            |
| Sacarosa  | Sacarasa                 | -                    | -                            |
| Galactosa | Galactoquinasa           | -                    | -                            |
| Celulosa  | Celulasa                 | -                    | -                            |
| Pectina   | Pectinasa                | -                    | -                            |
| Caseína   | Caseínasa                | -                    | -                            |
| Arabinosa | L-Arabinosa<br>isomerasa | -                    | -                            |
| Xilosa    | Xilosa Isomerasa         | -                    | -                            |
| Celobiosa | $\beta$ -glucosidasa     | -                    | -                            |

La síntesis de enzimas termoestables producidas por ambas cepas de *Geobacillus* bajo las mismas condiciones de incubación de temperatura y agitación, se ve afectada principalmente por la composición de los medios base empleados, hay referencias publicadas tales como las de Cann et al., (2001), Edwards et al., (1990) en donde se menciona que la mayoría de los microorganismos termófilos estudiados tienen la capacidad de utilizar como fuente de carbono polímeros de carbohidratos tales como el xilano, la celulosa, el ácido poligalacturónico, el almidón y la lignina.

Por otro lado, un factor importante, reflejado en los resultados obtenidos en esta investigación, es la temperatura en la que se llevaron a cabo las incubaciones de ambos *Geobacillus* aislados del volcán “El Chichón” la cual fue de 71.2°C, ya que Nazina (2001) reporta como temperatura óptima para ambas cepas un rango de 55-60°C, en donde evidenció también la presencia de actividad enzimática galactoquinasa y  $\beta$ -1,4 glucosidasa que transfiere el grupo fosfato e hidroliza la

celulosa a monosacáridos, respectivamente para llevar a cabo el metabolismo, esto empleando como medio base un medio nutritivo, suplementado con estos sustratos.

La termoestabilidad de las enzimas de estos microorganismos depende de las fuerzas que estabilizan las proteínas (Singleton et al., 1973; Stellwagen, 1978); estas fuerzas incluyen puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos, enlaces a metales y puentes disulfuro.

Los microorganismos termófilos como los *Geobacillus*; producen enzimas que no son desnaturalizadas a altas temperaturas; esto ha sido atribuido a la sustitución de uno o más aminoácidos de la molécula de enzima, lo que 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, 1993).

#### **V.5 Identificación de la actividad enzimática de *G. jurassicus* y *G. stearothermophilus* empleando el kit Api Zym**

Los resultados del kit Api Zym (cuadro 8) permitieron reafirmar la capacidad que tienen ambas cepas de *Geobacillus* aisladas del volcán “El Chichón” para la producción de enzimas de tipo lipasas y estererasas clasificadas dentro de la clase de las hidrolasas. Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los acilglicéridos in vivo, además pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos.

Ambos *Geobacillus* resultaron negativos para la prueba de actividad enzimática proteasa identificado mediante las enzimas tripsina y  $\alpha$ -quimiotripsina (Barret et al, 2004).

Además de que los resultados del kit Api-Zym permitieron evidenciar la presencia o ausencia de la actividad de las enzimas antes mencionadas, otras actividades enzimáticas identificadas y que resultaron positivas (cuadro 8) fueron la fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida,  $\alpha$ -galactosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\alpha$ -fucosidasa para ambos *Geobacillus*.

La fosfatasa alcalina y ácida, permite la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre el grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino o ácido respectivamente, liberando el grupo fosfato al medio, dejando así la cadena de glicerol y las cadenas de ácidos grasos intactos, posteriormente mediante la acción de las enzimas esterasa C4, esterasa lipasa C8, lipasa C14, se lleva a cabo la ruptura del enlace éster que une al glicerol con las cadenas de ácidos grasos de C4 a C14, siendo la lipasa C14 la que cuenta con mayor estabilidad a altas temperaturas, pH y solventes orgánicos, además de que son específicas para acilgliceroles con ácidos grasos de cadena larga (Arping y Jaeger, 1999).

La síntesis de  $\alpha$ -glucosidasa permite la degradación del almidón, esta es una enzima desramificante que actúa sobre los enlaces  $\alpha$ -(1-6)-glucosídicos, exponiendo un nuevo grupo de ramificaciones con enlace  $\alpha$ -(1-4) (Mathews, 2002), por lo que ambas cepas son degradadoras de almidón, resultado reflejado en los cuadros 3, 4, 5, 6 y 7 de la actividad enzimática en los diferentes medios de cultivo sólido.

Las enzimas  $\alpha$ -manosidasa y  $\alpha$ - fucosidasa son enzimas degradadoras de glúcidos o carbohidratos; tales como la sacarosa, almidón, celulosa, arabinosa y xilosa (Van Wormhoudt, 1980), resultado positivo en este estudio (cuadro 8) para ambos *Geobacillus* aislados del volcán “El Chichón” mediante el análisis del kit Api-ZYM en donde el sustrato activo fue el 6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-manopiranosido y 2-naftil- $\alpha$ L-fucopiranosido, respectivamente.

Cuadro 8. Identificación de las actividades enzimáticas empleando el KIT API-ZYM

| N° | Enzima estudiada                   | <i>G. jurassicus</i> | <i>G. stearrowthermophilus</i> |
|----|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 1  | CONTROL                            |                      |                                |
| 2  | Fosfatasa alcalina                 | Positivo             | Positivo                       |
| 3  | Esterasa (C4)                      | Positivo             | Positivo                       |
| 4  | Esterasa lipasa (C8)               | Positivo             | Positivo                       |
| 5  | Lipasa (C14)                       | Positivo             | Positivo                       |
| 6  | Leucina arilamidasa                | Negativo             | Negativo                       |
| 7  | Valina arilamidasa                 | Negativo             | Negativo                       |
| 8  | Cistina arilamidasa                | Negativo             | Negativo                       |
| 9  | Tripsina                           | Negativo             | Negativo                       |
| 10 | $\alpha$ -quimotripsina            | Negativo             | Negativo                       |
| 11 | Fosfatasa ácida                    | Positivo             | Positivo                       |
| 12 | Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa        | Negativo             | Negativo                       |
| 13 | $\alpha$ -galactosidasa            | Positivo             | Positivo                       |
| 14 | $\beta$ -galactosidasa             | Positivo             | Positivo                       |
| 15 | $\beta$ -glucuronidasa             | Negativo             | Negativo                       |
| 16 | $\alpha$ -glucosidasa              | Positivo             | Positivo                       |
| 17 | $\beta$ -glucosidasa               | Positivo             | Positivo                       |
| 18 | N-acétil- $\beta$ -glucosaminidasa | Negativo             | Negativo                       |
| 19 | $\alpha$ -mannosidasa              | Positivo             | Positivo                       |
| 20 | $\alpha$ -fucosidasa               | Positivo             | Positivo                       |

Con base a los resultados obtenidos con el Kit Api Zym todas las enzimas que resultaron positivas pertenecen a la clase de las hidrolasas. Las enzimas hidrolasas son las de mayor importancia y aplicación en diferentes industrias tales como la de detergente, alimentos, farmacéuticas, etc. Cabe resaltar la importancia en alimentos de las lipasas, ya que el uso de estas enzimas mejora el proceso de elaboración del pan, el sabor, la textura de la masa y la calidad de la corteza (García, 2015). Así también, las lipasas tienen aplicación en la producción de aceites con baja proporción de grasas trans (Rivera, 2007), aditivos alimentarios en la modificación del sabor (Burket, 2004).

Las enzimas fosfatasas se han utilizado en estudios de calidad como un indicador de la eficiencia en la pasteurización de la leche, pues la presencia y metabolismo microbiano de bacterias de alta resistencia térmica como *Mycobacterium tuberculosis*, se interrumpe a temperaturas por encima de los 70°C (Bárcena-Ruiz et al., 2007), así como en la respuesta y rendimiento del maíz, tras la exposición de este cultivo a fertilizantes y abonos (Álvarez-Solís, 2010), en varios estudios se ha reportado que el perfil nutrimental de algunos alimentos modifica la expresión y actividad de las fosfatasas, como es el caso de la respuesta diferencial al consumo de aceites de soya, coco, palma y pescado en ratas sanas (Wahnon et al., 1992).

Las enzimas glucosidasas en la industria alimentaria se emplean para la clarificación de zumos de frutas o vegetales, en productos horneados (panadería y pastelería) o bien en la elaboración de la cerveza (García, 2015).

## VI. CONCLUSIONES

- La composición del medio de cultivo influyó significativamente en el crecimiento microbiano, así como en la morfología microscópica de los *Geobacillus* aislados del volcán “El Chichón”.
- El medio productor de lipasas (MB) y el medio base (MB) fueron los mejores para el crecimiento de *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus*.
- Las dos bacterias termófilas aisladas del volcán “El Chichón”, *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus*, tienen la capacidad de sintetizar enzimas termófilas hidrolíticas de importancia industrial bajo condiciones nutricionales y de incubación adecuadas.

## RECOMENDACIONES

- Optimizar la técnica de siembra en medios sólidos para ambas cepas de *Geobacillus*.
- Identificar la temperatura y pH óptimo para la producción máxima de enzimas.
- Realizar análisis cuantitativo de la producción de enzimas en los medios de cultivo empleados en este estudio.
- Evaluar el crecimiento de ambas cepas de *Geobacillus* a nivel fermentador de tanque agitado, bajo distintas condiciones de operación.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Atlas R.M., Bartha R. 1993. Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3 Edition The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Bridge Parkway. Redwood City.
- Abdullah M.F.F., Rahman Z.A., Mohd Z.N., Abd A.A., Ismail M.I., Azmi N.S.A., Farah N.S.H. 2012. Screening and identification of bacteria producing polysaccharide-degrading enzymes from a Malaysian hot spring. Colloquium on Humanities, Science and Engineering Research. 787-791.
- Al-Qodah S., Daghistani H., Alananbeh K., 2013. Isolation and characterization of thermostable protease producing *Bacillus pumilus* from thermal spring in Jordan. African Journal of Microbiological Methods. 321-328.
- Andrade C., Pereira N., Antranikian G. 1999. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. Microbiological Reviews. 30: 287-298.
- Angela-Daniele L.A. 2011. Actividad lipolítica de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa LN, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, estado Carabobo, Venezuela. Ciencia. 19(3), 173 - 180.
- Armienta M.A., De la Cruz-Reyna S., Ramos S., Ceniceros N., Cruz O., Aguayo A., Arcega-Cabrera F. 2014. Hydrogeochemical surveillance at El Chichón volcano crater lake, Chiapas, México. Journal of Volcanology and Geothermal Research. 118-128.
- Arpigny J.L., Jaeger and Karl-Erich, 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochemical Journal. 177-182.
- Bárcena-Ruiz J.A, García A.C., Padilla-Peña C.A., Martínez-Galisteo E., Díez-Dapena J. 2007. Caracterización Cinética de la fosfatasa. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Tesis de la Universidad de Córdoba.
- Barrett A., Rawlings N., Woessner J. 2004. Introduction. In: Handbook of Proteolytic Enzymes(A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press.

- Belkova L.N., Tazaki K., Zakharova J.R., Parfenova V.V. 2007. Activity of bacteria in wáter of hot springs from southern and central Kamchatskaya geothermal provinces, Kanchatka Peninsula, Russia. *Microbiological Research*. 99-107.
- Bertoldo C., Antranikian G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Chemical Biology*. 151-160.
- Biomierux 2014. Ficha técnica de Apy Zym.
- Blanchard K., Robic S., Matsumura L. 2014. Transformable facultative thermophile *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621 as a host strain for metabolic (Maher Obeida, 2012) (Khalil, 2011) engineering. *Applied Microbiology Biotechnology*. 98(15):6715-6723.
- Brock T. 1978. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer series in Microbiology 72-91
- Brumm P.J., Maayer P., Mead D., Cowan D.A. 2015. Genomic analysis of six new *Geobacillus* strains reveals highly conserved carbohydrate degradation architectures and strategies. *Frontiers in Microbiology*.
- Burgess A.S., Lindsay D., Flint S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2015.2025.
- Cann, I. K., Stroot, P. G., Mackie, K. R., White, B.A and Mackie, R. 2001. Characterization of two novel saccharolytic anaerobic thermophiles, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* sp. nov., *Thermoanaerobacterium zeeae* sp. nov., emendation of the genus *Thermoanaerobacterium* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 293-302
- Charbonneau D.M., Meddeb-Mouelhi F., Boissinot M., Sirois M., Beauregard M. 2011. Identification of thermophilic bacterial strains producing thermotolerant hydrolytic enzymes from manure compost. *Indian Journal Microbiology*. 41-47.
- Demirjian D., Morris-Varas F., Cassidy C. 2001. Enzymes from extremophiles. *MediChem Life Science*. 144-151.

- Garcia-Gomez Maria de Jesus (2015) *Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos*. Revista Iberoamericana de Ciencias Vol 2. Num 3. 90-95.
- Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosemia. En, *The Metabolic and molecular Bases of Inherited Disease*, chapter 72, tomo I, 8th, editores Scriver Ch, Beaudet A, Valle D, Sly W, editorial McGraw Hill, Inc., New York, London, 2001, 1553-1588
- Khalil, A. (2011). Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulose and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology Vol. 10*, 8834-8839.
- Klubanov I.V., Perevalova A.A., Slobodkina G.B., Lebedinsky A.V., Bidzhieva S.K., Kolganova T.V., Kaliberda E.N., Rumish L.D., Haertlè T., Bonch-Osmolovskaya E.A. 2008. Biodiversity of thermophilic prokariotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Applied and Environmental Microbiology*. 286-291.
- Kubo K., Knittel K., Amann R., Fukui M. & Matsuura K. 2011. Sulfur-metabolizing bacterial populations in microbial mats of the Nakabusa hot spring, Japan. *Systematic and Applied Microbiology*. 34(4):293-302.
- Kuisiene N., Raugalas J., Stuknyte M., Chitavichius D. 2007. Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S<sup>23</sup>SrRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS Microbiol lett*, 165-172.
- Maher Obeidat, H. K.-H.-Z. 2012. Isolation, characterization, and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs. *African Journal of Biotechnology*. 11, 6763-676.
- Mathews Christopher, Van Hole Kensal E., Ahern G. Kevin. *Bioquímica*, PEARSON Addison Wesley 402-457.
- Medina, M., Kwiatkowska T. 2000. *Ciencia, tecnología/naturaleza, cultura en el siglo XXI*. Mexico: Universidad Autonoma de Mexico
- Nazina T.N., Sokolova D.S., Grigoryan A.A., Shestakova N.M., Mikhailova E.M., Poltarau A.B., Tourova T.P., Lysenko A.M., Osipov G.A., Belyaev S.S. 2005. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated

from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* (Kuisiene, Raugas, Stuknyte, & Chitavichius, 2007) species, *Systematic and Applied Microbiology*. 28(1):43-53.

- Obeidat M., Khyami-Horani H., Al-Zoubi A., Otri I. 2012. Isolation characterization and hydrolytic activities of *Geobacillus* species from Jordanian hot springs. *African Journal of Biotechnology*. 11(25):6763-6768.
- Oliart-Ros R., Pinzón-Martínez D.L., Rodríguez-Gómez C., Miñana-Galbis D., Carrillo-Chávez J.A., Valerio-Alfaro G. 2010. Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications. *Environmental Technology*. 31(8-9): 957-966.
- Pachon L. & Posada Y. 2003. Cuantificación de poblaciones anaerobias aminoacidolíticas y amilolíticas de un yacimiento termal de Paipa, Boyacá. Tesis de Pregrado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá.
- Pal N, D., & S, K. (1978). *influence of culture nutritional conditions on the production of lipases by Aspergillus niger*. *Journal of fermtechnol*.560-593
- Paul de Vos, G. G.-H. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes, Second Edition (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)* (segunda ed., Vol. III). USA: Universidad de Georgia
- Pedroza Aura, Alvarez Norma, Pouto Raulo; 1997. *Diseño de un medio de cultivo discontinuo de cepas autoctonas de Thermus spp.* Revista de la Facultad de ciencias Pontificia Universidad Javeriana
- Roldan Pérez, G. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical*. Bogotá, Colombia: Universidad Antioquia 370-376
- Rubiano Labrador, C. (2006). *Aislamiento y caracterización de microorganismos termofilicos anaerobios lipoliticos, proteoliticos y amiloliticos de manantiales termominerales de paipa e iza (boyaca)*. bogota . d.c: pontificia universidad javeriana facultad de ciencias microbiologia industrial.
- Stanier, R. Ingraham John . (1992). *Microbiología.Segunda edicion* España: Reverté. 224-227.

- Sanchez Ferrer, A. (1998). *recuperacion, purificacion y caracterizacion de lipasas producidas por Candida rugosa aplicacion a la resolucion de compuestos quirales y diseño del reactor enzimatico*. Barcelona , España: universidad de barcelona.
- Viviano, F., Medina, L., Ramos, N., Amaíz, L., & Valbuena, O. (2011). Degradación de celulosa por bacterias de aguas termales de Las Trincheras, Venezuela. *Rev latinoam Biotecnol Amb*, 18-29.
- Wahnon, R., Cogan, U., Mokady, D. 1992. Dietary fish oil modulates the alkaline phosphatase activity and not the fluidity of rat microvillus membrane *J Nutr* 122:1077-1084

## INDICE DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| Anexos 1 .- Cinética de crecimiento de <i>Geobacillus jurassicus</i> y <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....   | 55 |
| Anexos 2 Evaluación de actividad enzimática en MPL de <i>Geobacillus jurassicus</i>                                  | 56 |
| Anexos 3 . Evaluación de actividad enzimática de <i>G.stearothermophilus</i> en MPL                                  | 56 |
| Anexos 4 Evaluación de actividad enzimática de <i>G.jurassicus</i> en Medio Base ...                                 | 59 |
| Anexos 5 . Evaluación de actividad enzimática de <i>G.stearothermophilus</i> en medio base.....                      | 60 |
| Anexos 6 Evaluación de actividad enzimática de <i>G.jurassicus</i> en Medio Papa-dextrosa.....                       | 62 |
| Anexos 7 Evaluación de actividad enzimática de <i>G.stearothermophilus</i> en medio Papa-dextrosa con almidón.....   | 62 |
| Anexos 8 Evaluación de actividad enzimática de <i>G. jurassicus</i> en medio mínimo                                  | 63 |
| Anexos 9 Evaluación de actividad enzimática de <i>G.stearothermophilus</i> en medio mínimo.....                      | 64 |
| Anexos 10 Evaluación de actividad enzimática de <i>G.jurassicus</i> en Medio Basal mineral con almidón. ....         | 65 |
| Anexos 11 Evaluación de actividad enzimática de <i>G.stearothermophilus</i> en Medio Basal Mineral con almidón ..... | 65 |
| Anexos 12 Evaluación de actividad enzimática empleando Kit api-Zym .....   | 66 |
| Anexos 13 Pruebas bioquímicas empleando Kit api- 20E .....   | 67 |

## VII. ANEXOS

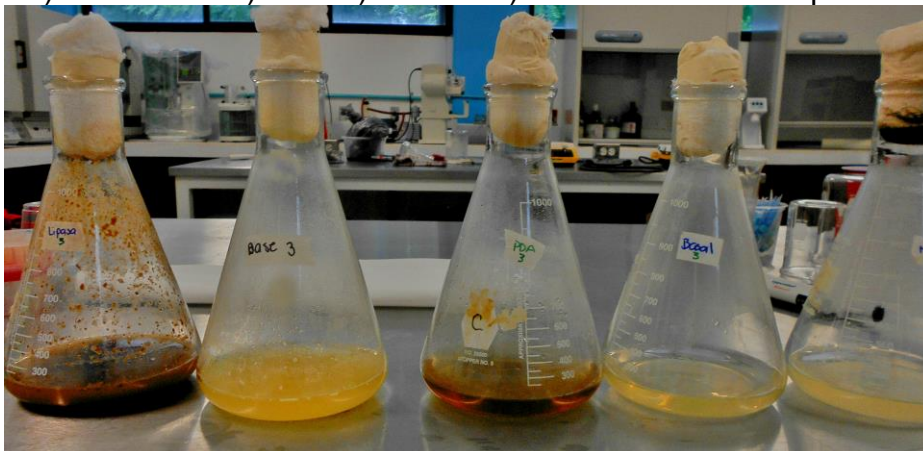
Anexos 1 .- Cinética de crecimiento de *Geobacillus jurassicus* y *Geobacillus stearothermophilus*



a) Matracas con medio control a 1)PDA 2)Basal 3) Medio base 4) MPL 5) Mínimo de izquierda a derecha.



b) Medios de cultivos con *Geobacillus stearothermophilus* a 192 hrs. de cinética 1)MPL 2)Medio base 3) PDA 4) Mínimo 5) Basal mineral de izquierda a derecha

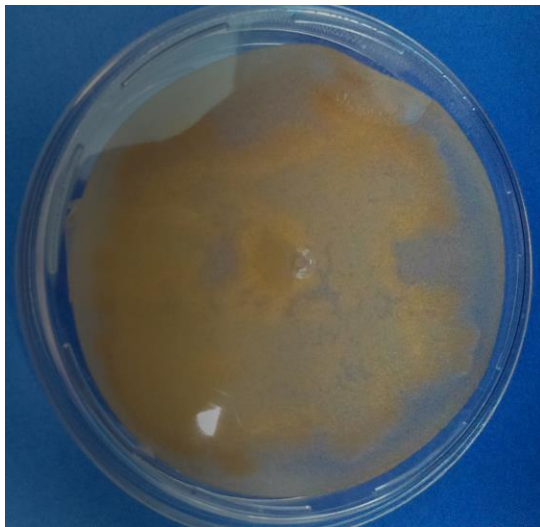


c) Medios de cultivo con *Geobacillus jurassicus* a 192 hrs. de cinética 1)MPL 2) Medio base 3) PDA 4) Medio basal 5) Medio minimo

Anexos 2 Evaluación de actividad enzimática en MPL de *Geobacillus jurassicus*



*Geobacillus jurassicus* en MPL sin sustrato



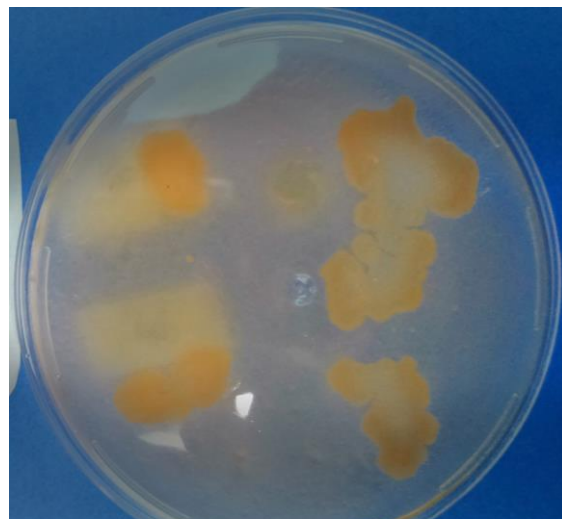
a) *G.jurassicus* en MPL con almidón



b) *G.jurassicus* en MPL con Celobiosa



c) *G.jurassicus* en MPI con celulosa



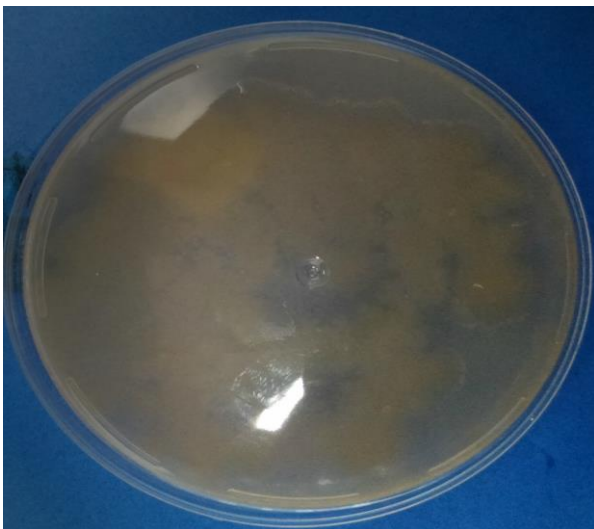
d) *G.jurassicus* en MPL con galactosa



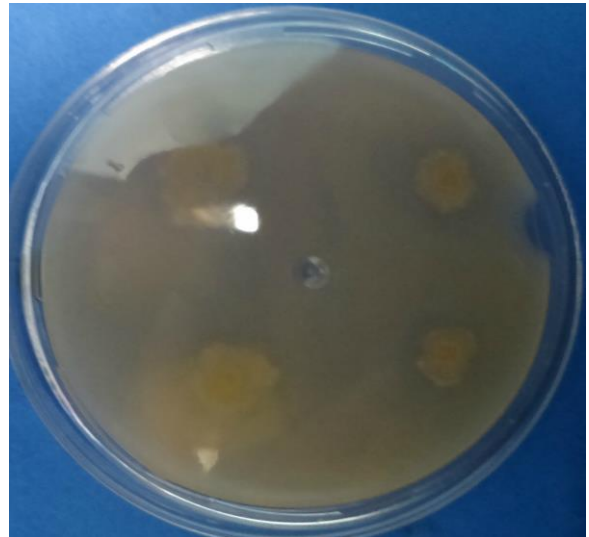
Anexos 3 . Evaluación de actividad enzimática de *G.stearotherophilus* en MPL



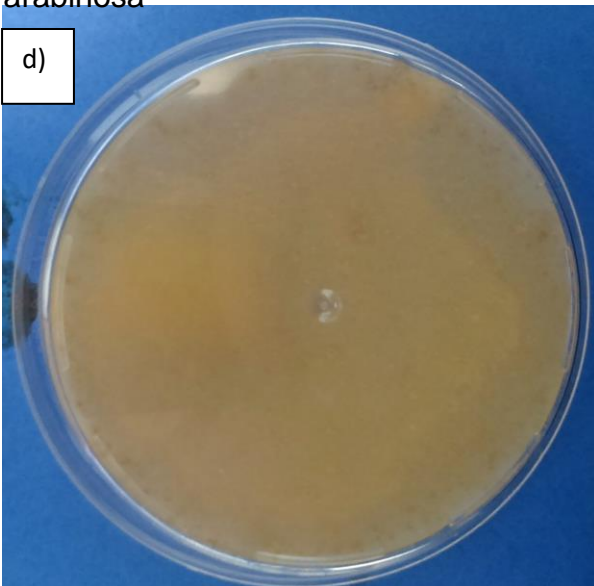
a) *G.stearotherophilus* en MPL sin sustratos



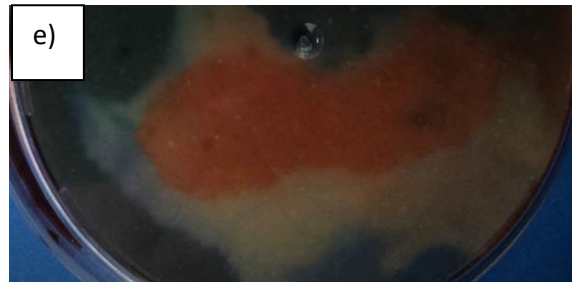
b) *G.stearotherophilus* en MPL con almidón



c) *G.stearotherophilus* en MPL con arabinosa

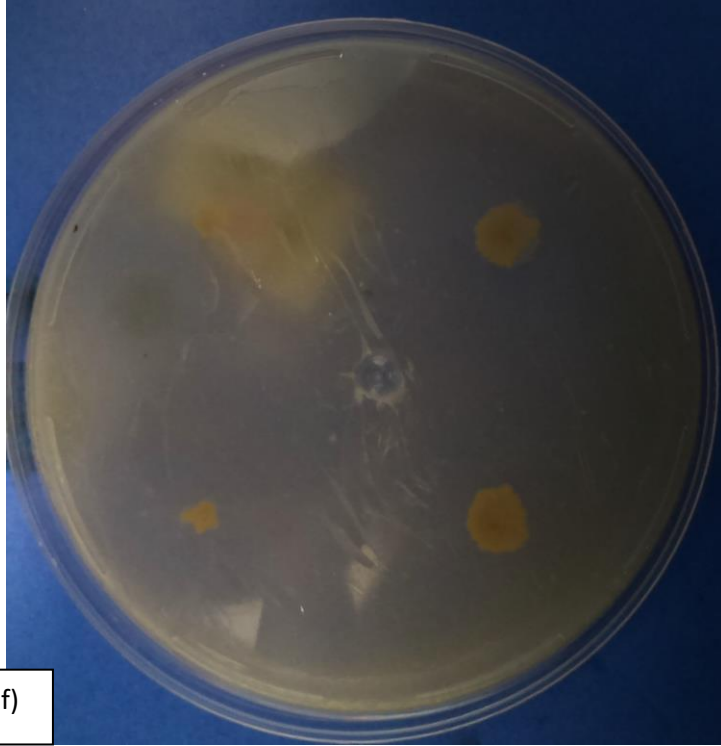


d)



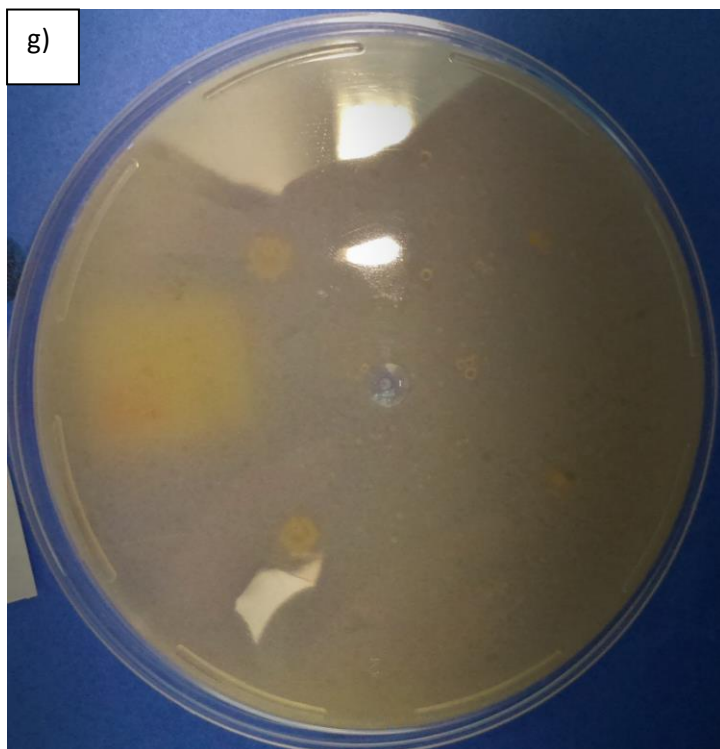
e)

d) *G.stearotherophilus* en MPL con caseína e) *G. stearotherophilus* en MPL con caseína y teñido con Rojo congo al 1% para identificación de halo



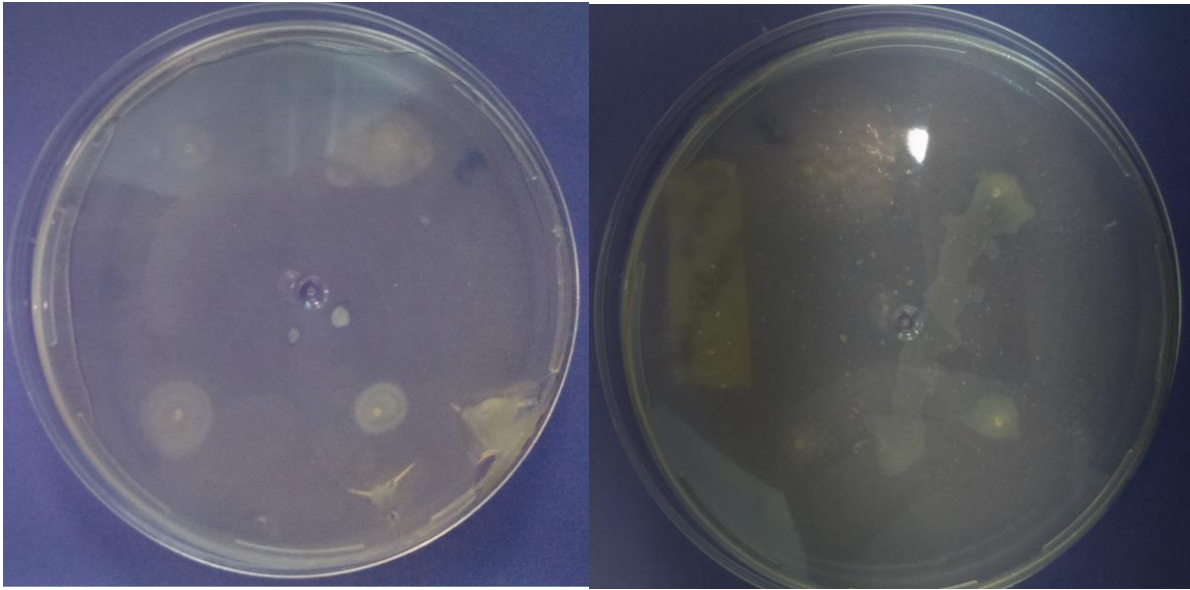
f)

f) *G.stearotherophilus* en MPL con galactosa y g) xilosa



g)

Anexos 4 Evaluación de actividad enzimática de *G.jurassicus* en Medio Base



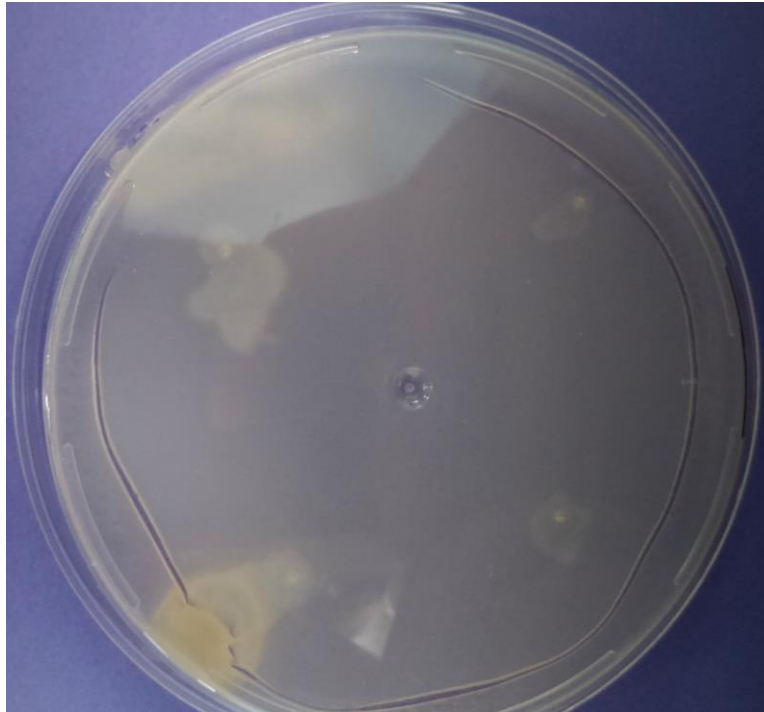
a) Medio Base con almidon

b) Medio base con arabinosa

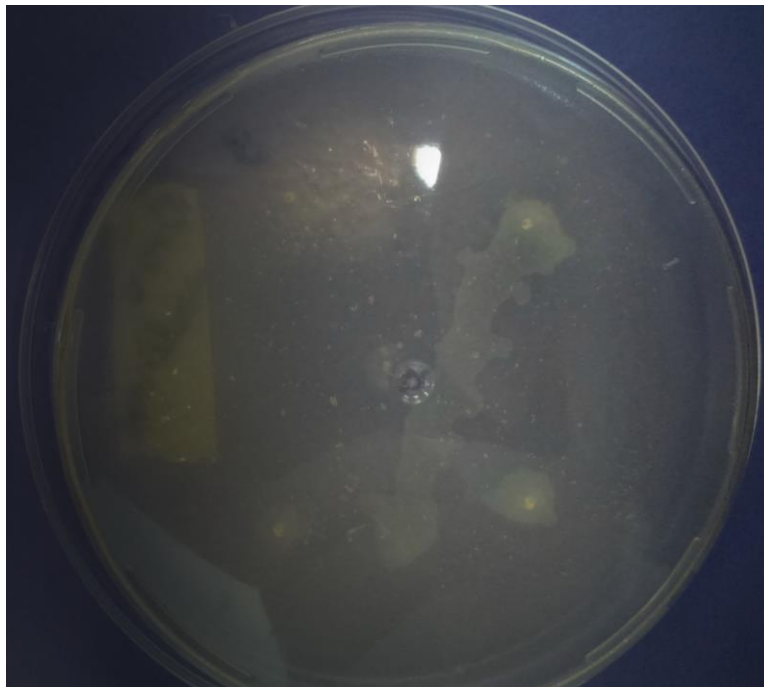


C ) Medio base con caseína/tinción con Rojo congo se observa un halo

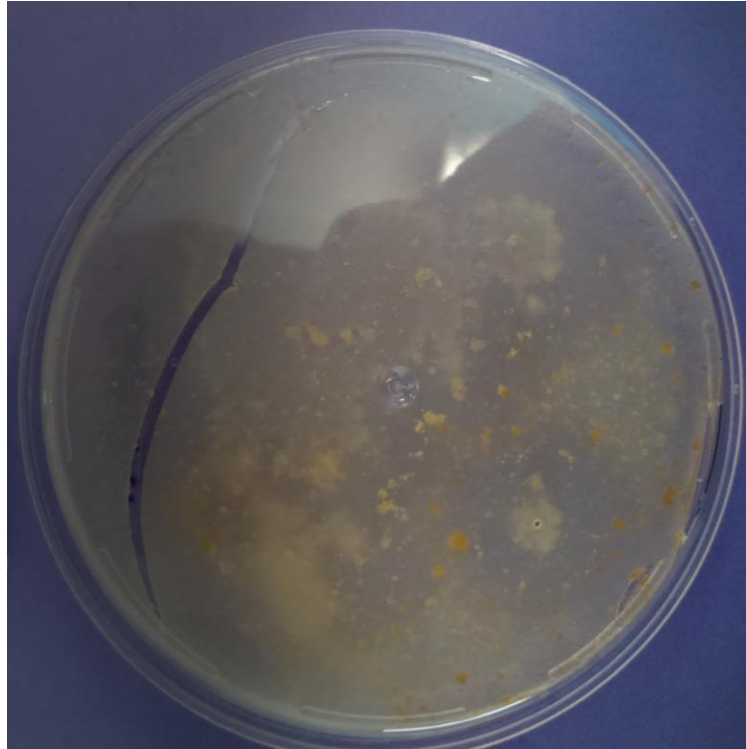
Anexos 5 . Evaluación de actividad enzimática de *G.stearotherophilus* en medio base



a) Medio Base con almidón

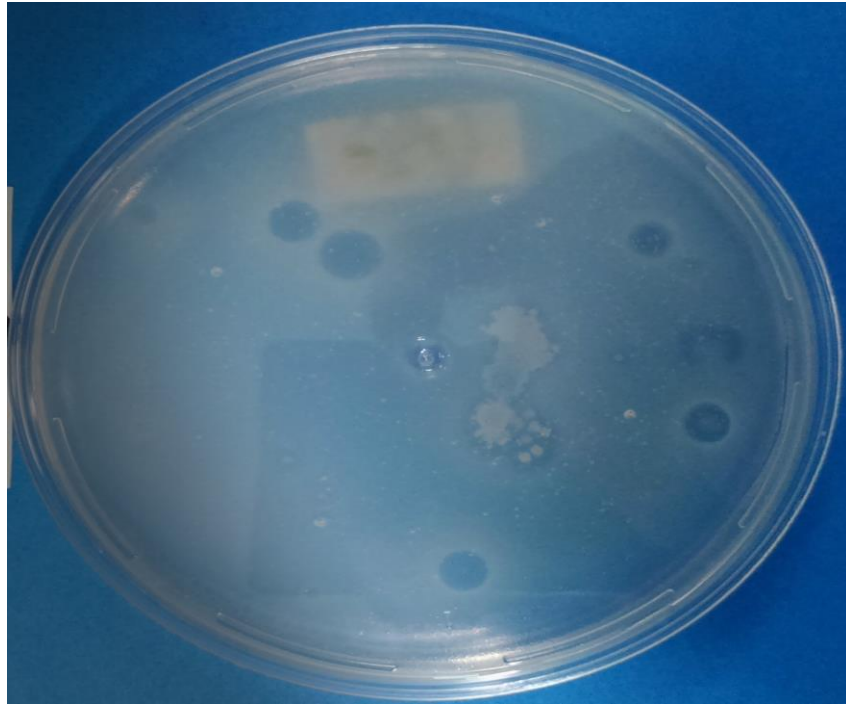


b) Medio Base con arabinosa

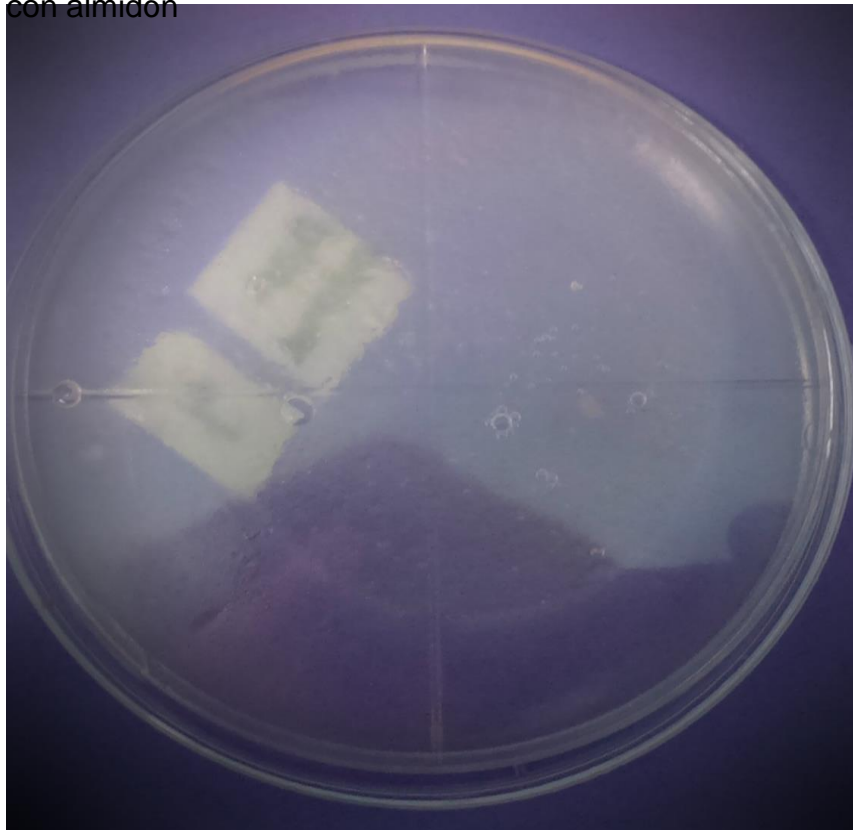


c) Medio Base con caseína

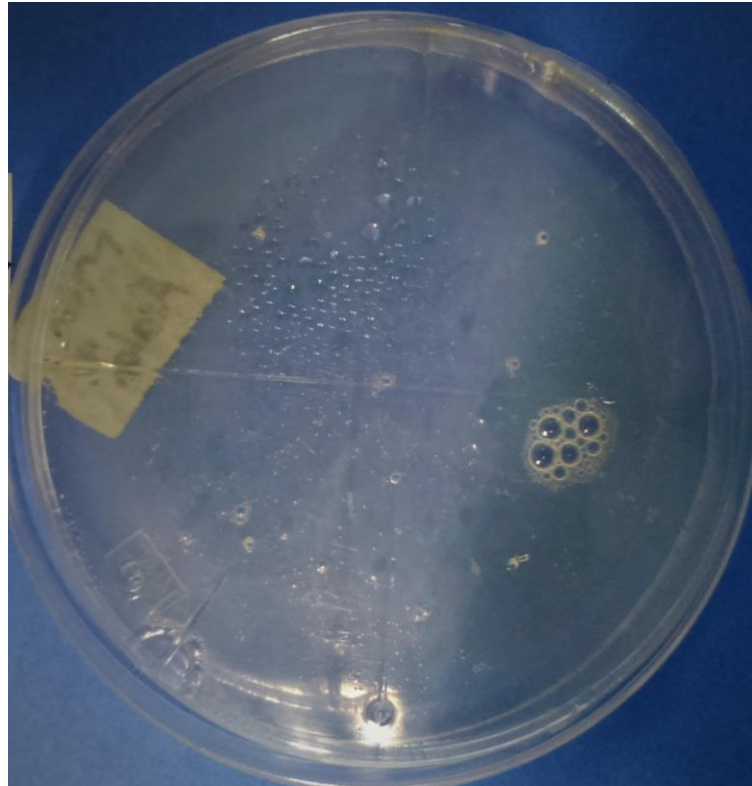
Anexos 6 Evaluación de actividad enzimática de *G.jurassicus* en Medio Papa-dextrosa



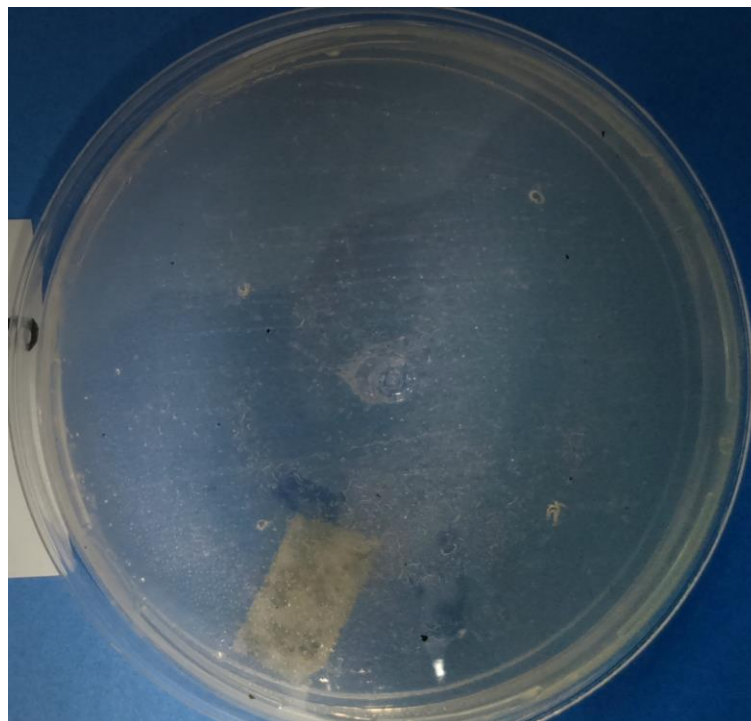
Anexos 7 Evaluación de actividad enzimática de *G.stearotherophilus* en medio Papa-dextrosa con almidón



Anexos 8 Evaluación de actividad enzimática de *G. jurassicus* en medio mínimo

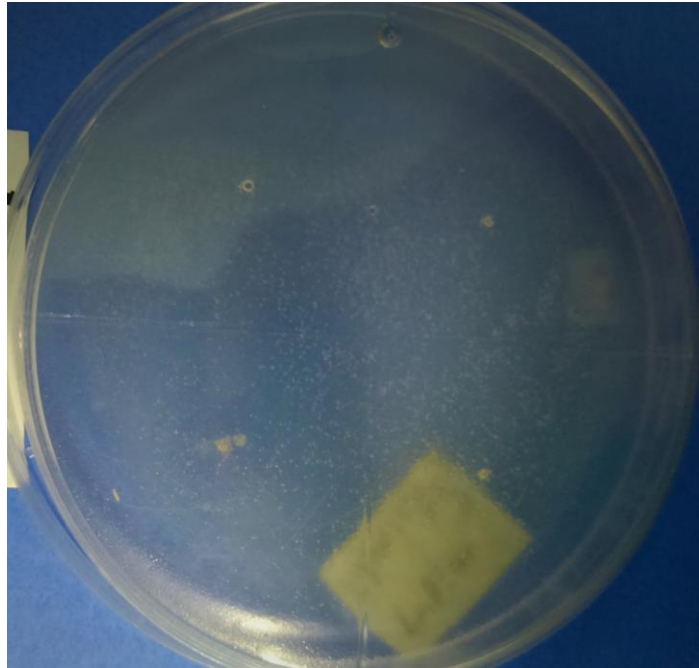


a) *G. jurassicus* en Medio mínimo con almidón

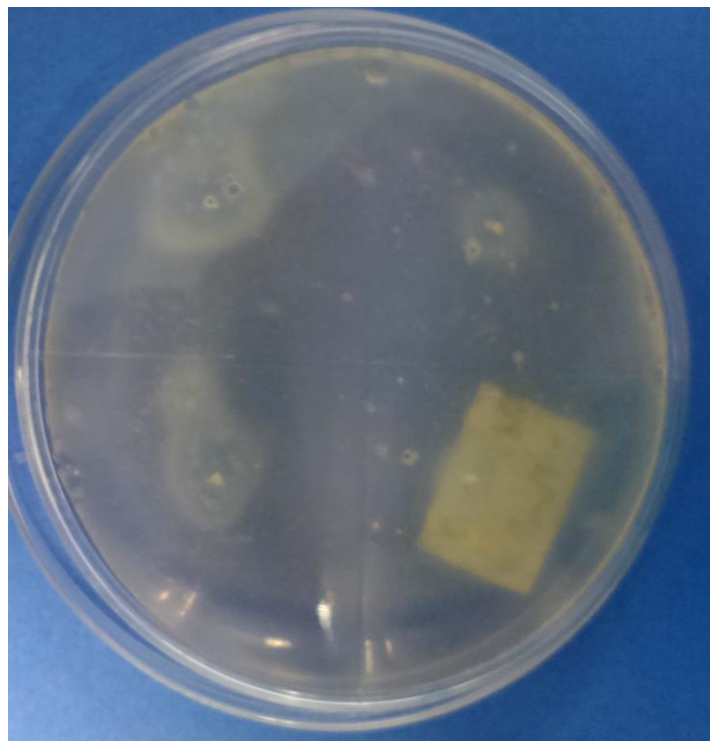


b) *G. jurassicus* en Medio mínimo con caseína

Anexos 9 Evaluación de actividad enzimática de *G.stearothermophilus* en medio mínimo



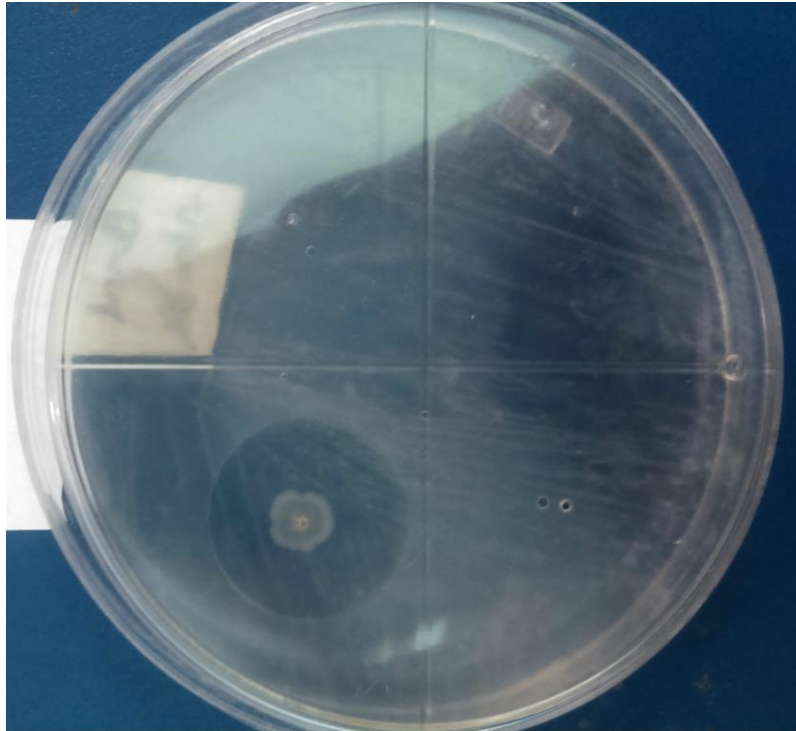
a) *G. stearothermophilus* en Medio mínimo con almidón



b) *G.stearothermophilus* en Medio mínimo con caseína



Anexos 10 Evaluación de actividad enzimática de *G.jurassicus* en Medio Basal mineral con almidón.



Anexos 11 Evaluación de actividad enzimática de *G.stearothermophilus* en Medio Basal Mineral con almidón



**Evaluación enzimática de *G.jurassicus* con Kit Api ZYM**



**Evaluación de actividad enzimática de *G.stearothermophilus* con Kit Api-ZYM**



Pruebas bioquímicas empleando Kit Api- ZYM para *G.jurassicus*



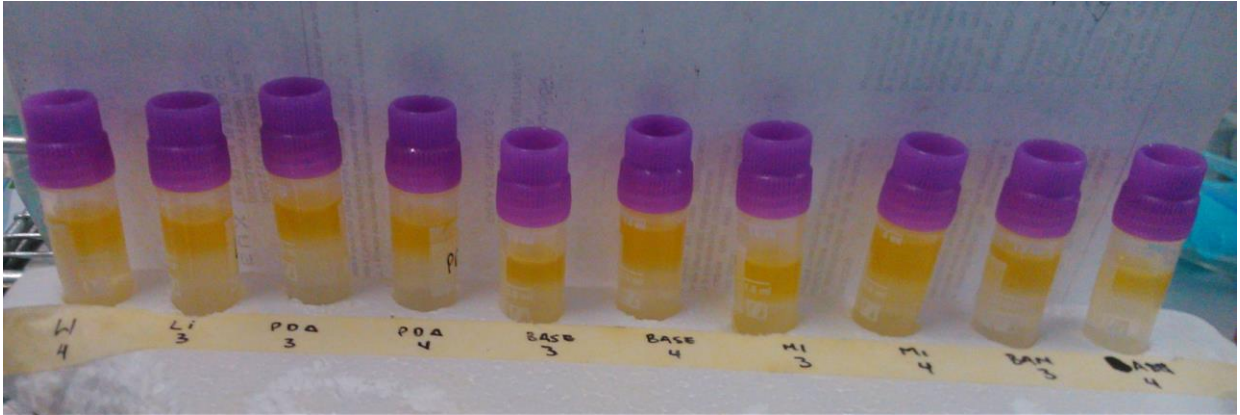
Pruebas bioquímicas empleando Kit Api- ZYM para *G.stearothermophilus*



Anexo 12. Interpretación de resultados para pruebas bioquímicas con Kit Api-20 E

| Prueba | Reacción / Enzimas                          | <i>G.jurassicus</i> | <i>G.stearothermophilus</i> |
|--------|---|---------------------|-----------------------------|
| ONPG   | Beta-galactosidasa                          | Negativo            | Negativo                    |
| ADH    | Arginina deshidrolasa                       | Negativo            | Negativo                    |
| LDC    | Lisina descarboxilasa                       | Negativo            | Negativo                    |
| ODC    | Ornitina descarboxilasa                     | Negativo            | Negativo                    |
| CIT    | Utilización del citrato                     | Negativo            | Negativo                    |
| H2S    | Producción de H <sub>2</sub> S              | Negativo            | Negativo                    |
| URE    | Ureasa                                      | Negativo            | Negativo                    |
| TDA    | Triptófano desaminasa                       | Negativo            | Negativo                    |
| IND    | Producción de indol                         | Positivo            | positivo                    |
| VP     | Producción de acetoína<br>(Voges-Proskauer) | Positivo            | Positivo                    |
| GEL    | Gelatinasa                                  | Negativo            | Negativo                    |
| GLU    | Fermentación/oxidación<br>de glucosa        | Negativo            | Negativo                    |
| MAN    | Fermentación/oxidación<br>de manitol        | Negativo            | Negativo                    |
| INO    | Fermentación/oxidación<br>de inositol       | Negativo            | Negativo                    |
| SOR    | Fermentación/oxidación<br>de sorbitol       | Negativo            | Negativo                    |
| RHA    | Fermentación/oxidación<br>de ramnosa        | Negativo            | Negativo                    |
| SAC    | Fermentación/oxidación<br>de sacarosa       | Negativo            | Negativo                    |
| MEL    | Fermentación/oxidación<br>de melobiosa      | Negativo            | Negativo                    |
| AMY    | Fermentación/oxidación<br>de amigdalina     | Negativo            | Negativo                    |
| ARA    | Fermentación/oxidación<br>de arabinosa      | Negativo            | Negativo                    |

Anexos 14 Identificación de metabolito con actividad biosurfactante extraído de cada medio de cultivo empleado con inóculo de *G.jurassicus* y *G.stearothermophilus*



Actividad biosurfactante de 1) *G.stearothermophilus* en MPL 2) *G. jurassicus* en MPL 3) *G.jurassicus* en medio PD 4) *G.stearothermophilus* en medio PD 5) *G.jurassicus* en medio base 6) *G.stearothermophilus* en medio base 7) *G.jurassicus* en medio Mínimo 8) *G.stearothermophilus* en medio mínimo 9) *G.jurassicus* en medio basal mineral 10) *G.stearothermophilus* en medio basal mineral de izquierda a derecha.