

Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de aguas termales productoras de polimerasas termoestables

RODRÍGUEZ-BARRERA, Miguel Ángel*†, SERRANO-ÁNGEL, Laura Iztacihualt, CAMPOS-MALDONADO, Rosalía, ROMERO-RODRÍGUEZ, Yanet

Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Chilpancingo, Gro. Tel. 4719310 ext.4525

Recibido Mayo 20, 2013; Aceptado Noviembre 19, 2013

Resumen

Los microorganismos de ambientes extremos son considerados ubicuos, característica que les permite adaptarse a múltiples condiciones hostiles. Con respecto a la condición física (Temperatura) en que habitan se consideran termófilos, estos microorganismos tienen la capacidad de habitar y sobrevivir a temperaturas elevadas, superiores a 45°C. Sin embargo hay microorganismos que crecen a una temperatura óptima entre 70-80°C tales como *Thermus aquaticus*, los hipertermófilos que crecen por encima de los 80°C como *Thermotoga marítima*. De acuerdo a esta condición pueden hallarse en diversos ambientes como géiseres, sistemas hidrotermales marinos, chimeneas, suelos geotérmicamente calientes y aguas termales. Estos ambientes suelen tener un pH ligeramente ácido o alcalino aproximadamente de 5 a 8.5 (Cariillo et al., 2008; Haki y Rakshit, 2003).

Como consecuencia de su adaptabilidad y crecimiento a altas temperaturas y propiedades macromoleculares únicas, los termófilos pueden poseer alta estabilidad metabólica, enzimas estables física y químicamente, crecimiento lento, pero alto rendimiento de productos finales. Por lo tanto, su metabolismo suele ser quimiolitótrofo o quimiorganótrofo, los cuales pueden utilizar aceptores externos de electrones para oxidar con mayor rendimiento compuestos inorgánicos y orgánicos que utilizan como fuente de carbono (Posada et al., 2004).

Los microorganismos termófilos han adquirido gran importancia mundial dentro del campo de la ingeniería genética debido a su enorme potencial para producir enzimas termoestables, característica que les permite tolerar los efectos orgánicos, detergentes, y agentes caotrópicos. Entre estas enzimas encontramos las ADN polimerasas. Arthur Kornberg y cols. en el año de 1963 describieron por primera vez la actividad de la ADN polimerasa en *Escherichia coli*, esta enzima interviene en el proceso de replicación y reparación del ADN de todos los organismos, sin embargo, actualmente se le han identificado nuevas funciones como mecanismos de tolerancia al daño, recombinación y mutagénesis

Bacterias Termófilas, Aguas Termales, Polimerasas Termoestables.

Abstract

The microorganisms in extreme environments are considered ubiquitous feature that allows them to adapt to multiple hostile conditions. Regarding the physical condition (temperature) that are considered live thermophilic, these microorganisms are capable of living and survive elevated temperatures above 45 °C. However there are microorganisms that grow at an optimal temperature between 70-80 °C such as *Thermus aquaticus*, hyperthermophiles that grow above 80 °C as *Thermotoga maritima*. According to this condition may be found in various environments such as geysers, marine hydrothermal systems, fireplaces, geothermally heated floors and hot springs. These environments tend to have a slightly acidic or alkaline pH about 5 to 8.5 (Cariillo et al, 2008; Haki and Rakshit, 2003).

Because of their adaptability and high temperature growth and macromolecular unique properties, thermophiles may possess high metabolic stability, physically and chemically stable enzymes, slow but high performance of final products. Therefore, metabolism or quimiorganótrofo chemolithotroph often, which can use external electron acceptor to oxidize most organic and inorganic compounds that use performance as a carbon source (Posada et al., 2004).

The thermophilic microorganisms have acquired great global importance in the field of genetic engineering because of its enormous potential to produce thermostable enzymes, which help them to tolerate organic effects, detergents and chaotropic agents. Among these enzymes are DNA polymerases. Arthur Kornberg et al. in the year 1963 first described the activity of DNA polymerase in *Escherichia coli*, the enzyme involved in the process of replication and repair of DNA of all organisms, but now you have identified new features such as tolerance mechanisms damage, recombination and mutagenesis

Bacteria Termófilas, Hot Springs, Thermostable polymerases.

Citación RODRÍGUEZ-BARRERA, Miguel Ángel, SERRANO-ÁNGEL, Laura Iztacihualt, CAMPOS-MALDONADO, Rosalía, ROMERO-RODRÍGUEZ, Yanet. Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de aguas termales productoras de polimerasas termoestables. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 – Abril 2014, 1-1: 340-343

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: rmiguel@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Los microorganismos de ambientes extremos son considerados ubicuos, característica que les permite adaptarse a múltiples condiciones hostiles. Con respecto a la condición física (Temperatura) en que habitan se consideran termófilos, estos microorganismos tienen la capacidad de habitar y sobrevivir a temperaturas elevadas, superiores a 45°C. Sin embargo hay microorganismos que crecen a una temperatura óptima entre 70-80°C tales como *Thermus aquaticus*, los hipertermófilos que crecen por encima de los 80°C como *Thermotoga marítima*. De acuerdo a esta condición pueden hallarse en diversos ambientes como géiseres, sistemas hidrotermales marinos, chimeneas, suelos geotérmicamente calientes y aguas termales. Estos ambientes suelen tener un pH ligeramente ácido o alcalino aproximadamente de 5 a 8.5 (Cariillo et al., 2008; Haki y Rakshit, 2003).

Como consecuencia de su adaptabilidad y crecimiento a altas temperaturas y propiedades macromoleculares únicas, los termófilos pueden poseer alta estabilidad metabólica, enzimas estables física y químicamente, crecimiento lento, pero alto rendimiento de productos finales. Por lo tanto, su metabolismo suele ser quimiolitótrofo o quimiorganótrofo, los cuales pueden utilizar aceptores externos de electrones para oxidar con mayor rendimiento compuestos inorgánicos y orgánicos que utilizan como fuente de carbono (Posada et al., 2004).

Los microorganismos termófilos han adquirido gran importancia mundial dentro del campo de la ingeniería genética debido a su enorme potencial para producir enzimas termoestables, característica que les permite tolerar los efectos orgánicos, detergentes, y agentes caotrópicos. Entre estas enzimas encontramos las ADN polimerasas.

Arthur Kornberg y cols. en el año de 1963 describieron por primera vez la actividad de la ADN polimerasa en *Escherichia coli*, esta enzima interviene en el proceso de replicación y reparación del ADN de todos los organismos, sin embargo, actualmente se le han identificado nuevas funciones como mecanismos de tolerancia al daño, recombinación y mutagénesis

Objetivo

Determinar la termo-estabilidad de bacterias termófilas aisladas de aguas termales para la búsqueda de ADN polimerasas.

Metodología

Recolección de la muestra. Se midió la temperatura y el pH (Figura 1) de las aguas termales de la comunidad “El Coacoyul”, perteneciente al Municipio de San Marcos de la costa chica de Guerrero. Posteriormente se tomaron muestras de diferentes puntos de las aguas termales: (fondo sin arena (M1SA) y superficie (M2), las muestras se trasladaron al laboratorio de Investigación de Biotecnología y Genética Microbiana (LIBGM).



Figura 1 A) Medición del pH, B) Medición de la temperatura, C) Toma de muestra

Estrategia de aislamiento. Para el aislamiento de microorganismos termófilos se evaluaron tres estrategias correspondientes a los medios enriquecidos A (Nutritivo), B (Soya Trypticaseína) y C (Casero Papa). El pH final del medio se ajustó a 9.7, posteriormente se inoculó 1 mL de la muestra en los tres diferentes medios y se homogenizó la muestra en toda la caja. Las cajas se incubaron de 45°C.

Evaluación de la Termo-estabilidad de las cepas: Se sembraron a temperaturas superiores que van desde 65 °C a 110°C inoculándose cada cepa en caldo Nutritivo al cual se le realizó un tratamiento en autoclave durante 10 minutos, posteriormente se vació 100 µl del caldo en placa con medio Nutritivo, se incubó a 45°C de 24-72 horas.

Identificación morfológica y bioquímica: Para esto se realizó tinción de Gram y evaluación de pruebas bioquímicas convencionales.

Identificación molecular por amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr. Se realizó extracción de ADN de las cepas que soportaron temperaturas de 110°C para la amplificación del gen 16S ADNr mediante PCR, se utilizaron los iniciadores universales Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rd (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), posteriormente se purificó este producto para la secuenciación en ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Resultados

Se aislaron 7 cepas, las cuales crecieron a 45°C y 50°C a las 24 horas de incubación.

Se utilizó como control negativo a la bacteria mesófila *Azotobacter vinelandii*, cuyo crecimiento fue inhibido desde 45°C.

Con relación a la termo-estabilidad de las cepas, tres cepas sobrevivieron 100°C (M1SA-1, M1SA-4 y M2-5) y cuatro cepas a 110°C (M1SA-2, M1SA-3, M2-6 Y M2-7). Estas evidenciaron una temperatura óptima de crecimiento 50-60°C después de 24-72 horas de incubación. El análisis de la secuenciación del gen 16S ADNr mostró una similitud del ≤84% de la cepa M2-6 con *Bacillus licheniformis*, ≤89% de la cepa M2-7 con *Bacillus pumilus* y ≤95% de la cepa M1SA-3 con la Bacteria no cultivable (gbGQ009701.1.) (Figura 2)

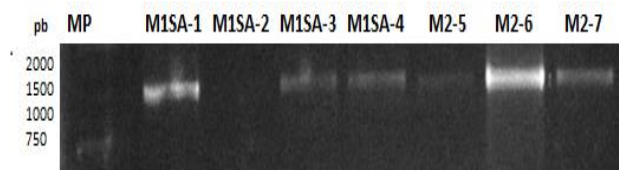


Figura 2 Productos de la amplificación por PCR de las cepas aisladas de aguas termales. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, corrido a 97 V durante 40 minutos. El fragmento de aproximadamente 1500 pb corresponde al gen 16S ADNr de las cepas M1SA-1, M1SA3-M1SA-4, M2-5, M2-6 y M2-7.

Discusion

Las cepas aisladas son categorizadas como termófilas ya que sobreviven a una temperatura de 60°C después de 48 h. cuatro cepas resistieron hasta 110°C,

Esto se debe a que poseen proteínas chaperonas las cuales replegan las proteínas a su forma nativa y restaurar sus funciones después de la desnaturalización, además tienen una enzima reversa ADN girasa, la cual provoca un superenrollamiento del ADN, otro factor que influye es el alto contenido de G-C, lo que incrementa los puentes de fusión y estabiliza las moléculas de ácidos nucleicos, además de incluir interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, enlaces a metales y puentes disulfuro (Haki y Rakshir, 2003; Demirjian, 2001).

Conclusion

Las cepas que resistieron a 110°C se lograron identificar a través del análisis de la secuenciación del gen 16S ADNr, mediante el mapeo del gen 16S en el BLAST.

Referencias

Cariillo, A., Martínez, D. L. P., Ros, R. M. O., Galindo, h. S. G. & Alfaro, G. V. (2008). Caracterización de la microflora perteneciente a la zona geotérmica "Los Baños" en Acopan, Veracruz. V reunión de la sociedad Mexicana de Astrobiología. 39-40.

Demirjian, D. C., Moris-varas, F. and Cassidy, C. S. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*. 5: 144-152.

Haki, G. D. & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89: 17–34.

Posada, Y., Pachon, L., Agudelo, A., Alvarez, E., Díaz, C., Fardeau, M. L., Jouliau, C., Collevier, B. & Baena, S. (2004).

Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un yacimiento termal de Paipa, Boyacá. *Revista colombiana de biotecnología*. 6: 90-100.

Rubiano, L. C. (2006). Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá). Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C., Pontificia Universidad Javeriana.