

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS  
TERMOFÍLICOS ANAEROBIOS LIPOLÍTICOS, PROTEOLÍTICOS Y  
AMILOLÍTICOS DE MANANTIALES TERMOMINERALES DE PAIPA E  
IZA (BOYACÁ)**

**CAROLINA RUBIANO LABRADOR**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial  
Para optar por el título de**

**MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C.**

**Julio 28 de 2006**

**NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N°. 13 de Julio de 1946.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS  
TERMOFÍLICOS ANAEROBIOS LIPOLÍTICOS, PROTEOLÍTICOS Y  
AMILOLÍTICOS DE MANANTIALES TERMOMINERALES DE PAIPA E  
IZA (BOYACÁ)**

**CAROLINA RUBIANO LABRADOR**

**APROBADO**

---

**SANDRA BAENA Ph. D**  
**Bióloga**  
**Directora**

---

**JOSE SALVADOR MONTAÑA**  
**Biólogo**  
**Jurado 1**

---

**ANDREA AGUIRRE. M. Sc**  
**Bacterióloga**  
**Jurado 2**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS  
 TERMOFÍLICOS ANAEROBIOS LIPOLÍTICOS, PROTEOLÍTICOS Y  
 AMIOLÍTICOS DE MANANTIALES TERMOMINERALES DE PAIPA E  
 IZA (BOYACÁ)**

**CAROLINA RUBIANO LABRADOR**

**APROBADO**

---

**ANGELA UMAÑA MUNOZ, M. Phil**  
Decana Académica

---

**DAVID GOMEZ, M. Sc.**  
Director de Carrera

Dedico este trabajo a mi padre y hermanos  
por su apoyo incondicional, a mi madre  
que me guía desde el cielo, quien me enseñó  
a luchar por mis sueños y a Démian Felipe  
por ser la motivación de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana que permitió el desarrollo de este proyecto.

A la Doctora Sandra Baena por su colaboración, apoyo, paciencia y conocimientos aportados para el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros de USBA Gina López, Carolina Díaz y Adriana Guevara por su apoyo y colaboración incondicional.

A mis amigos quienes estuvieron a mi lado apoyándome.

## RESUMEN

Se aislaron y caracterizaron microorganismos termófilos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de 2 MTM, El Batán (IZA-03) y Ojo del Diablo (PP-11) localizados en las coordenadas geográficas 5° 35' 22.82'' N, 72° 59' 16.09'' W y 5° 45' 33.29'' N, 73° 6' 49.89'' W en los municipios de Paipa e Iza, Boyacá. Para el aislamiento de estos microorganismos se evaluaron tres estrategias de cultivo las cuales se diferenciaban por el contenido de extracto de levadura y la solución de oligoelementos, pero la concentración de las fuentes de carbono fue la misma para todas las series. Se aislaron dos cepas del MTM IZA-03 anaerobias estrictas, termofílicas (temperatura óptima entre 50 a 55°C), sacarolíticas y esporuladas denominadas IZA-03-2 e IZA-03-3 y se aisló una cepa del MTM PP-11 anaerobia facultativa, termofílica (temperatura óptima de crecimiento de 60°C), sacarolítica y esporulada denominada P3-18, las tres cepas fueron aisladas a partir del medio de la Serie MTM E. La cepa IZA-03-2 presentó una alta actividad lipolítica de 2.06 U/min/L mientras que la cepa P3-18 presentó una actividad amilolítica bastante significativa de 973.38 UA/min/L. Con base a las características fenotípicas y al análisis de la secuencia del 16S rRNA se considera que la cepa P3-18 (99% de similitud (94% de similitud) corresponde a la especie *Anoxybacillus flavithermus*, mientras que la cepa IZA-03-3 puede ser considerada como una nueva especie del género *Caloramator*.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO TEORICO</b>	4
2.1. MICROORGANISMOS DE AMBIENTES EXTREMOS	4
2.2. MICROORGANISMOS TERMÓFILOS	5
2.2.1. Generalidades	5
2.2.2. Hábitats de microorganismos termófilos	5
2.2.3. Taxonomía de microorganismos termófilos	8
2.2.4. Metabolismo de microorganismos termófilos	10
2.2.5. Mecanismos de supervivencia a altas temperaturas	13
2.3. VENTAJAS DE LAS ENZIMAS PRODUCIDAS DE TERMÓFILOS	18
2.4. ENZIMAS LIPOLÍTICAS	19
2.5. ENZIMAS AMIOLÍTICAS	22
2.6. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	25
2.7. AMBIENTES EXTREMOS	26
2.8. TIPOS DE AGUAS TERMALES	30
2.9. LOCALIZACION DE LAS FUENTES TERMALES EN COLOMBIA	31
<b>3. OBJETIVOS</b>	36
3.1. Objetivo general	36
3.2. Objetivos específicos	36
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b>	37
4.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	37
4.1.1. Población de estudio y muestra	37
4.2. MÉTODOS	38
4.2.1. Recolección de muestras	38

	<b>Pág.</b>
4.2.2. Estrategias de cultivo	39
4.2.3. Inoculación	42
4.2.4. Aislamiento	42
4.2.5. Caracterización fenotípica	43
4.2.6. Actividades enzimáticas	45
4.2.7. Caracterización molecular del gen 16S rRNA de las cepas aisladas	48
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>70</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b>	

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de microorganismos termófilos	5
<b>Tabla 2.</b> Características de microorganismos termófilos	6
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos de sitios que sirven como fuente de microorganismos que pueden proporcionar enzimas termoestables	8
<b>Tabla 4.</b> Reacciones productoras de energía de microorganismos termófilos	13
<b>Tabla 5.</b> Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables	19
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de aguas termales según su temperatura	30
<b>Tabla 7.</b> Fuentes termales en Colombia	33
<b>Tabla 8.</b> Principales características del MTM El Batán	37
<b>Tabla 9.</b> Principales características del MTM Ojo del Diablo	38
<b>Tabla 10.</b> Composición del medio para la Serie MTM E	40
<b>Tabla 11.</b> Composición del medio para la Serie MTM P	40
<b>Tabla 12.</b> Composición del medio para la Serie MTM MS	40
<b>Tabla 13.</b> Fuentes de carbono y aceptores de electrones empleados	41
<b>Tabla 14.</b> Caracterización fenotípica de las cepas aisladas de los MTM IZA-03 y PP-11	54
<b>Tabla 15.</b> Presencia de esporas en las cepas aisladas	57
<b>Tabla 16.</b> Anaerobiosis estricta de las cepas aisladas	57
<b>Tabla 17.</b> Evaluación de la reducción de aceptores de electrones	58
<b>Tabla 18.</b> Resultados de la actividad lipolítica	61
<b>Tabla 19.</b> Resultados de la actividad proteolítica	62
<b>Tabla 20.</b> Resultados de la cuantificación de proteínas extracelulares	62
<b>Tabla 21.</b> Resultados de la actividad amilolítica	63

## INDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Tipos de estructura de la membrana de termófilos	15
<b>Figura 2.</b> Acción catalítica de las lipasas	20
<b>Figura 3.</b> Hidrólisis del almidón	23
<b>Figura 4.</b> Hidrólisis del enlace peptídico	25
<b>Figura 5.</b> Géiser Castle en Yellowstone Nacional Park	27
<b>Figura 6.</b> Fumarola Kráteru vul, Mutnovokaja	28
<b>Figura 7.</b> Solfatara Heverar	28
<b>Figura 8.</b> Fuente termal de Yellowstone Nacional Park	29
<b>Figura 9.</b> Recolección de muestras	38
<b>Figura 10.</b> Inoculo de MTM	39
<b>Figura 11.</b> Médios de cultivo	41
<b>Figura 12.</b> Aumento de turbidez en los medios	42
<b>Figura 13.</b> Aislamiento de colonias	43
<b>Figura 14.</b> Vista microscópica de la cepa IZA-03-2	55
<b>Figura 15.</b> Vista microscópica de la cepa IZA-03-3	55
<b>Figura 16.</b> Vista microscópica de la cepa P3-18	56

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO 1.** Análisis de agua de Hotelería El Balneario El Batán

**ANEXO 2.** Análisis de agua del MTM Ojo del Diablo

**ANEXO 3.** Composición de Solución traza I

**ANEXO 4.** Composición de Solución traza II

**ANEXO 5.** Cuantificación de la actividad lipolítica

**ANEXO 6.** Cuantificación de la actividad proteolítica

**ANEXO 7.** Cuantificación de proteínas extracelulares

**ANEXO 8.** Cuantificación de la actividad amilolítica

## 1. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones acerca de diversidad microbiana en ambientes extremos se realizan con el fin de determinar cuáles son las características particulares que permiten a estos microorganismos sobrevivir a dichas condiciones y para comprender el papel que desempeñan estos microorganismos en su hábitat natural. Los extremófilos son microorganismos que pueden vivir y reproducirse en ambientes extremos. Dentro de este grupo se encuentran los termófilos, que son organismos que están adaptados para crecer óptimamente a altas temperaturas (60 a 110°C), estos microorganismos han sido aislados a partir de fuentes termales, áreas volcánicas, fumarolas y sistemas hidrotermales marinos. Las investigaciones acerca de microorganismos termófilos han tomado gran importancia debido a las aplicaciones que pueden tener a nivel biotecnológico puesto que sus enzimas son estables a altas temperaturas. Sin embargo, hasta el momento solo una pequeña fracción de la diversidad microbiana en ambientes extremos ha sido investigada.

Los microorganismos termófilos se encuentran en diferentes hábitats, uno de estos son los manantiales termominerales (MTM) que son manifestaciones de actividad geológica y representan ambientes extremos en donde existe una gran diversidad de microorganismos autóctonos característicos de cada tipo de manantial y que dependen de sus propiedades fisicoquímicas (temperatura, pH y composición mineral). Los microorganismos termófilos anaerobios han sido aislados a partir de fuentes termales distribuidas en todo el mundo, tal es el caso de *Thermanaerovibrio velox* en Rusia, *Caldimonas taiwanensis* en Taiwán, *Thermoanaerobacter tengcongensis* en Tengcong, China, *Caldisphaera lagunensis* en Filipinas, *Caloramator viterbensis* en Italia y *Thermoanaerobacter brockii* y *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* en Estados Unidos, entre otras.

En Colombia, los MTM se encuentran distribuidos en la región Andina y Atlántica asociadas al llamado Cordón o Falla del Pacífico. En los municipios de Paipa e Iza (Boyacá) se localizan diferentes MTM caracterizados principalmente por elevadas temperaturas (44 a 74°C) y altas concentraciones de sal (0.055 a 43.0 g/L). Sin embargo, los estudios en nuestro país acerca de microorganismos termófilos anaerobios son limitados y es muy poca la información disponible de la diversidad microbiana de este tipo ambientes extremos.

Resultados previos obtenidos en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), demostraron la presencia de poblaciones termofílicas de organismos sulfato reductores, tiosulfato-reductores no sulfato-reductores, organismos reductores de hierro férrico, organismos reductores de nitrato y principalmente microorganismos fermentativos capaces de degradar sustratos complejos como xilano y almidón. Se han identificado nuevas especies de bacterias sulfato-reductoras termofílicas pertenecientes al género *Desulfomicrobium* y se ha propuesto una nueva especie llamada *Desulfomicrobium thermophilum*. Igualmente se han aislado microorganismos del género *Thermoanaerobacter* cercanamente relacionados con las especies *Thermoanaerobacter italicus* y *Thermoanaerobacter mathranii*.

Para estudiar la diversidad de microorganismos en un hábitat natural se emplean diferentes técnicas entre las cuales se encuentran técnicas dependientes de cultivo en placa y técnicas moleculares. Sin embargo, independientemente de que método es usado, la elección del medio de cultivo apropiado es crucial para el aislamiento de microorganismos. Los hábitats termales, por lo general, son ambientes que contienen bajas concentraciones de nutrientes y se ha demostrado que medios enriquecidos (con mas de 8 g de compuestos orgánicos por litro) generan bajos recuentos, y por tal razón no permiten el aislamiento de la población microbiana autóctona de estos

ambientes extremos. Por lo tanto, el objetivo general de este estudio fue aislar y caracterizar microorganismos termófilos anaerobios empleando diferentes estrategias de cultivo, para lo cual se seleccionaron dos MTM denominados El Batán (IZ-03) localizado en las coordenadas geográficas 5° 35' 22.82'' N, 72° 59' 16.09'' W y el MTM Ojo del Diablo (PP-11) localizado en las coordenadas geográficas 5° 45' 33.29'' N, 73° 6' 49.89'' W. Adicionalmente, se utilizaron diferentes fuentes de carbono y se realizaron evaluaciones de las actividades lipolíticas, amilolíticas y proteolíticas a cada una de las cepas aisladas. La importancia de estas actividades enzimáticas radica en que las enzimas producidas por estos microorganismos catalizan reacciones bioquímicas a altas temperaturas incrementando de esta manera el rendimiento de los procesos industriales y disminuyendo el costo de producción; por lo tanto el aislamiento de éste tipo de microorganismos pueden tener numerosas aplicaciones a nivel industrial, farmacéutico o ecológico, entre otros.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1. MICROORGANISMOS DE AMBIENTES EXTREMOS**

La diversidad del mundo microbiano refleja la facultad de los microorganismos para adaptarse a múltiples condiciones y de esta forma colonizar diversos ambientes, entre ellos los considerados extremos (Stetter, 1999).

Los microorganismos que son capaces de sobrevivir y crecer óptimamente a temperaturas por debajo de los 10°C y por encima de los 50°C, a valores de pH por debajo de 5.0 y por encima de 8.0, a una presión mayor a 1 atm y a concentraciones de sal mayores a 30 g/L son definidos como extremófilos (Constantinos & Antranikian, 2004). Muchos de los extremófilos que han sido identificados pertenecen al dominio Archaea. Sin embargo, muchos extremófilos del dominio Bacteria han sido recientemente identificados y caracterizadas (Van Den Burg, 2003).

Los extremófilos son encontrados en áreas geotermales con altas temperaturas, regiones polares con temperaturas alrededor del punto de congelación de agua, en la profundidad de los océanos con una muy alta presión y manantiales ácidos o alcalinos con bajo o alto pH, respectivamente (Constantinos & Antranikian, 2004).

#### **2.1.2. Clasificación de microorganismos extremófilos**

Los organismos extremófilos dependiendo de la condición extrema bajo la cual estén sometidos constituyen varios grupos fisiológicos conocidos como barófilos, alcalófilos, acidófilos, halófilos, psicrófilos, termófilos e hipertermófilos (Mosé *et al.*, 2002) (Tabla1).

**Tabla 1.** Clasificación de microorganismos extremófilos

<b>EXTREMOFILOS</b>	<b>MINIMO</b>	<b>OPTIMO</b>	<b>MAXIMO</b>
Termófilos		> 50°C	> 60°C
Termófilos extremos	> 35°C	≥ 65°C	> 70°C
Hipertermófilos	> 60°C	≥ 80°C	> 85°C
Acidófilos	pH > 0	2.5 ≤ pH ≤ 3.0	
Alcalinotolerantes		pH < 8.5	pH ≥ 9.0
Alcalófilos		pH ≥ 8.5	pH ≥ 10
Halófilos tolerantes		2% ≤ NaCl ≤ 5%	
Halófilos moderados		5% ≤ NaCl ≤ 20%	
Halófilos extremos		20% ≤ NaCl ≤ 30%	
Psicrófilos	= 0°C	< 25-30°C	
Barófilos	> 0.1 MPa	= 10-50 MPa	ø 100 MPa

Fuente: Weigel 1998, citado por Olliver *et al.*, 2000

## 2.2. MICROORGANISMOS TERMÓFILOS

### 2.2.1. Generalidades de los microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos son microorganismos capaces de crecer a temperaturas superiores a los 45°C. Actualmente existe una clasificación dentro de este grupo donde los **termófilos** crecen a una temperatura óptima de 45-70°C como *Bacillus acidocaldarius* y *Bacillus stearothermophilus*, los **termófilos extremos** crecen a una temperatura óptima entre 70-80°C tales como *Thermus aquaticus* y *Thermoanaerobacter ethanolicus* y los **hipertermófilos** que tienen una temperatura óptima de crecimiento por encima de los 80°C como por ejemplo *Thermotoga maritima* y *Pyrococcus furiosus* (Tabla 2) (Pedroza, 2001).

### 2.2.2. Hábitats de microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos son un grupo especial de microorganismos que se encuentran distribuidos en gran variedad de ambientes como manantiales termales, desiertos, géiseres, chimeneas subterráneas, sistemas hidrotermales marinos,

**Tabla 2.** Características básicas de microorganismos termófilos

ESPECIES	CONDICIONES DE CRECIMIENTO			pH	Aeróbico (ae) o anaeróbico (an)	Biotipo (marino (m) o terrestre (t))	DNA G+C (MOL %)
	Temperatura (°C)						
	Mínimo	Óptimo	Máximo				
<i>Thermotoga maritima</i>	55	80	90	5.5 - 9	an	m	46
<i>Aquifex pyrophilus</i>	67	85	95	5.4 - 7.5	ae	m	40
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	75	85	1 - 5	ae	t	37
<i>Metallosphaera sedula</i>	50	75	80	1 - 4.5	ae	t	45
<i>Acidianus infernus</i>	60	88	95	1.5 - 5	ae/an	t	31
<i>Stygiolobus azoricus</i>	57	80	89	1 - 5.5	an	t	38
<i>Thermoproteus tenax</i>	70	88	97	2.5 - 6	an	t	56
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	74	100	103	5 - 7	an	t	46
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	75	100	104	5.8 - 9	ae/an	m	52
<i>Thermofilum pendens</i>	70	88	95	4 - 6.5	an	t	57
<i>Desulfurococcus mobilis</i>	70	85	95	4.5 - 7	an	m	51
<i>Thermosphaera aggregans</i>	67	85	90	5 - 7	an	t	46
<i>Sulfophobococcus zilligii</i>	70	85	95	6.5 - 8.5	an	t	54
<i>Sthaphylothermus marinus</i>	65	92	98	4.5 - 8.5	an	m	35
<i>Thermodiscus maritimus</i>	75	88	98	5 - 7	an	m	49
<i>Aeropyrum pernix</i>	70	90	100	5 - 9	ae	m	67
<i>Stetteria hydrogenophila</i>	70	95	102	4.5 - 7	an	m	65
<i>Igneococcus islandicus</i>	65	90	100	3.9 - 6.3	an	m	41
<i>Pyrodictium occultum</i>	82	105	110	5 - 7	an	m	62
<i>Hyperthermus butylicus</i>	80	101	108	7	an	m	56
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90	106	113	4.0 - 6.5	ae/an	m	53
<i>Thermococcus celer</i>	75	87	93	4 - 7	an	m	57
<i>Thermococcus alcaliphilus</i>	56	85	90	6.5 - 10.5	An	M	43
<i>Pyrococcus furiosus</i>	70	100	105	5 - 9	an	m	38
<i>Archaeoglobus. fulgidus</i>	60	83	95	5.5 - 7.5	an	m	46
<i>Ferroglobus placidus</i>	65	85	95	6 - 8.5	an	m	43
<i>Methanothermus sociabilis</i>	65	88	97	5.5 - 7.5	an	t	33
<i>Methanopyrus kandleri</i>	84	98	110	5.5 - 7	an	m	60
<i>Methanococcus jannashii</i>	50	85	86	5.5 - 6.5	an	m	31
<i>Methanococcus igneus</i>	45	88	91	5 - 7.5	an	m	31

Fuente: Stetter, 1999

solfataras, y suelos geotérmicamente calientes (Andrade *et al.*, 1999; Marteinsson *et al.*, 2001).

Estos sistemas geotérmicos por lo general contienen sulfuro y azufre elemental. El azufre elemental se forma a partir del H<sub>2</sub>S de origen geotérmico, bien sea por oxidación espontánea de H<sub>2</sub>S con O<sub>2</sub>, o bien por una reacción del H<sub>2</sub>S con el SO<sub>2</sub> (este último es un componente de los gases volcánicos). En ambientes terrestres, los manantiales ricos en azufre, los depósitos de lodo y los suelos pueden alcanzar temperaturas de hasta 100°C y por lo general van de moderada a extremadamente ácidos, debido a la producción de ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, procedente de la oxidación biológica de H<sub>2</sub>S y S<sup>0</sup> (Madigan *et al.*, 2000).

Los biotipos marinos pueden ser superficiales o sedimentos calientes profundos y sistemas hidrotermales. Los sistemas hidrotermales marinos generalmente contienen una alta concentración de sal (alrededor del 3%) y exhiben un pH ligeramente ácido o alcalino (pH 5 a 8.5). Los ambientes volcánicos marinos usualmente albergan gran cantidad de vapor de agua, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, azufre y cantidades variables de monóxido de carbono, hidrógeno, metano, nitrógeno y trazas de amonio (Stetter, 1999).

La mayoría de los microorganismos encontrados en estos hábitats son anaerobios ya que la solubilidad del oxígeno decrece con el aumento de temperatura, por lo tanto estos ambientes se convierten en anaerobios o microaerofílicos donde solo pueden desarrollarse organismos capaces de sobrevivir a concentraciones bajas de oxígeno o en ausencia de este (Edwards *et al.*, 1990).

Los termófilos e hipertermófilos anaerobios han sido aislados a partir de sedimentos marinos geotérmicamente calientes, sistemas hidrotermales marinos, manantiales

termales y fumarolas (Andrade *et al.*, 1999). Algunos ejemplos de biotipos de microorganismos termófilos e hipertermófilos se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Ejemplos de sitios que sirvan como fuente de microorganismos que pueden proporcionar enzimas termotolerantes

FUENTE	MICROORGANISMO	ENZIMA
Fuente termal	<i>Thermus</i> sp.	$\alpha$ -Amilasa
Fuente termal	<i>Bacillus</i> sp. WN.11	$\alpha$ -Amilasa
Sistemas hidrotermales marinos	<i>Staphylothermus marinus</i>	$\alpha$ -Amilasa
Solfataras marinas	<i>Thermococcus litoralis</i>	Pululanasa
Fuente termal	<i>Bacillus thermoleovocans</i> ID-1	Lipasa
Compost de cáscara de cítricos fermentada, residuos de extractos de café y té	<i>Bacillus</i> strain MH-1	Endoquitinasa
Compost	<i>Bacillus stearrowthermophilus</i> CH-4	$\beta$ -N-acetilhexosaminidasa
Sistemas hidrotermales marinos	<i>Pyrococcus abyssi</i>	Fosfatasa alcalina
Sedimentos de fuentes termales	<i>Bacillus</i> sp. 3183	$\alpha$ -Amilasa

Fuente: Haki & Rakshit, 2003

### 2.2.3. Taxonomía de microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos e hipertermófilos pertenecen a los dominios Archaea y Bacteria. El dominio Archaea incluye actualmente los límites más extremos de tolerancia fisiológica a factores físicoquímicos. Los reinos *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota* pertenecen a este dominio. Todos los miembros del reino *Crenarchaeota* son organismos termofílicos o hipertermofílicos, que han sido aislados a partir de sistemas hidrotermales submarinos o continentales (Burggraf *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2003). A este reino pertenecen los géneros *Thermoproteus*, *Caldivirga*, *Pyrobaculum*, *Thermocladium*, *Vulcanisaeta*, *Thermofilum*, *Caldisphaera*, *Desulfurococcus*, *Acidilobus*, *Aeropyrum*, *Ignicoccus*, *Staphylothermus*, *Stetteria*, *Sulfophobococcus*, *Thermodiscus*, *Thermosphaera*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus*, *Pyrolobus*, *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Sulfurisphaera* y *Sulfurococcus* (Garrity *et al.*, 2004). Al reino *Euryarchaeota* pertenecen los metanógenos de los géneros *Methanobacterium*,

*Methanothermobacter*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanothermococcus*, *Methanocaldococcus*, *Methanoculleus*, *Methanosarcina* y *Methanopyrus* (Garrity *et al.*, 2004; Sokolová *et al.*, 2001); igualmente a este reino pertenecen los géneros *Thermococcus* y *Pyrococcus* que son organótrofos anaerobios (Sokolova *et al.*, 2001) y *Archaeoglobus* que es sulfato reductora (Huber *et al.*, 1997).

Por otro lado, en el dominio Bacteria los géneros termófilos heterotróficos lo componen el orden *Thermotogales* que incluye seis géneros: *Thermotoga*, *Thermosipho*, *Fervidobacterium*, *Geotoga*, *Petrotoga* y *Marinitoga* (Alain *et al.*, 2002); el orden *Clostridiales* el cual incluye los géneros *Clostridium*, *Caloramator*, *Caloranaerobacter*, *Thermobrachium*, *Thermohalobacter*, *Anaerobaculum*, *Anaerobranca*, *Caldicellulosiruptor*, *Carboydocella*, *Syntrophothermus*, *Thermaerobacter*, *Thermanaerovibrio*, *Thermohydrogenium* y *Thermosyntropha* (Cayol *et al.*, 2000; Brisbarre *et al.*, 2003; Denger *et al.*, 2002; Menes & Muxi, 2002; Sekiguchi *et al.*, 2002; Sokolova *et al.*, 2001; Sokolova *et al.*, 2002; Zavarzina *et al.*, 2002); el orden *Thermomicrobiales* que está representado por el género *Thermomicrobium* (Phillips & Perry, 1976); el orden *Deferribacteriales* que incluye los géneros *Deferribacter* y *Thermothrix* (Greene *et al.*, 1997; Odintsova *et al.*, 1996); el orden *Thermoanaerobacteriales* que incluye los géneros *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Ammonifex*, *Caldanaerobacter*, *Coprothermobacter*, *Carboxydibrachium*, *Gelria*, *Moorella*, *Sporotomaculum*, *Thermacetogenium*, *Thermoanaerobium* y *Thermavenabulum* y el orden *Bacteroidales* que incluye los géneros *Thermodesulfobium*, *Acetothermus* y *Anaerophaga* (Garrity *et al.* 2004) . El grupo de bacterias sulfato reductoras está representado por los géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfacinum*, *Thermodesulforhabdus*, *Thermodesulfovibrio* y *Thermodesulfobacterium* (Sievert & Kuever, 2000)

Además de los organismos anaerobios del dominio Bacteria aislados de hábitats termofílicos, también se han aislado o identificado microorganismos termófilos e

hipertermófilos aerobios heterótrofos y autótrofos. Dentro del grupo de heterótrofos está el género *Thermus*, donde seis especies de este género han sido descritas, estas son *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Thermus filiformis*, *Thermus brockianus*, *Thermus antranikianii*, *Thermus igniterrae* y *Thermus oshimai* (Chung *et al.*, 2000; Garrity *et al.* 2004; Williams *et al.*, 1996); el género *Rhodothermus* representado por la especie *Rhodothermus marinus* (Sako *et al.*, 1996) y el género *Thermoaerobacter* representado por *Thermoaerobacter mariensis*. El grupo de microorganismos aerobios autótrofos termofílicos incluye el género microaerofílico *Aquifex*, representado por la especie *Aquifex pyrophilus* (Sthor *et al.*, 2001).

#### **2.2.4. Metabolismo de microorganismos termófilos anaerobios**

Los organismos anaerobios termófilos e hipertermófilos se caracterizan por tener un metabolismo quimiolitotrófico (organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos) o quimiorganótrofo (organismos que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos). En ambos tipos de metabolismo estos microorganismos anaerobios termófilos pueden utilizar aceptores externos de electrones para oxidar con un mayor rendimiento compuestos inorgánicos y orgánicos que utilizan como fuente de carbono (Pachón & Posada, 2003).

Existen numerosos microorganismos termófilos autotróficos, quimiolitotrofos o quimiorganótrofos. 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; también los termófilos pertenecientes al dominio Archaea utilizan compuestos proteicos, siendo esto una característica de interés potencial para las industrias que requieren obtener monómeros a partir de este tipo de polímeros (Cann *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 1990; Lowe *et al.*, 1993; Kozianowski *et al.*, 1997; Sunna & Antranikian, 1996).

Todos los microorganismos termofílicos e hipertermofílicos heterótrofos pueden usar complejas mezclas de péptidos, como peptona, triptona o extracto de levadura, como fuente de carbono y energía (Andrade *et al.*, 1999).

El requerimiento de azufre, que es casi universal en los microorganismos termófilos anaerobios, se basa en la necesidad de un aceptor de electrones para la respiración anaeróbica o de un donador de electrones para el metabolismo quimiolitotrófico. El azufre elemental ( $S^0$ ) se reduce a  $H_2S$  usando electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos, o de  $H_2$ . Las reacciones productoras de energía de microorganismos termófilos se muestran en la Tabla 4. Algunos quimiorganótrofos como, por ejemplo, los miembros de los géneros *Thermococcus* y *Thermoproteus*, oxidan anaeróbiamente, en presencia de  $S^0$  como aceptor de electrones, diversos compuestos orgánicos en particular péptidos pequeños, glucosa y almidón (Madigan *et al.*, 2000).

Igualmente, muchos organismos termófilos e hipertermófilos crecen de forma quimiolitotrófica con  $H_2$  como fuente de energía. Los miembros del género *Pyrodictium*, por ejemplo, crecen estrictamente de forma anaerobia en un medio de sales minerales suplementado con  $H_2$  y  $S^0$ , a temperaturas hasta de  $100^\circ C$ . Los miembros de los géneros *Acidianus* y *Sulfolobus* crecen aeróbiamente con  $H_2$  como donador de electrones. Otros modos de crecimientos en estos microorganismos incluyen la oxidación de azufre elemental o hierro ferroso (aeróbicamente) por varias especies de *Sulfolobus*, y la oxidación de  $H_2$  o  $Fe^{2+}$  acoplada a la reducción de  $NO_3^-$  (produciendo  $NO_2^-$  y posteriormente  $N_2$  o  $NH_4^+$ ) (Madigan *et al.*, 2000). Los miembros del género *Thermotoga* son capaces de fermentar diferentes carbohidratos como glucosa, almidón y xilanos, formando acetato, lactato,  $H_2$  y  $CO_2$  como productos finales, mientras que los miembros del género *Aquifex* que son quimiolitotrofos estrictos, usan hidrógeno molecular, tiosulfato y azufre elemental como donadores de electrones y oxígeno y nitrato como aceptores de electrones (Andrade *et al.*, 1999).

Además del azufre elemental ( $S^0$ ), otros aceptores de electrones en la respiración anaerobia son compuestos inorgánicos dentro de los que se incluyen el nitrato ( $NO_3^-$ ), ion férrico ( $Fe^{3+}$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) y carbonato ( $CO_3^{2-}$ ) (Madigan *et al.*, 2000). Sin embargo, también compuestos orgánicos pueden participar en este tipo de respiración. Algunos de estos compuestos orgánicos son el selenato, el arseniato, el óxido de trimetilamina, la glicina y la cisteína (Schink *et al.*, 2002). En general los microorganismos que realizan respiración anaerobia poseen sistemas de transportes de electrones con citocromos, quinonas, proteínas con hierro y azufre (Madigan *et al.*, 2000).

Los compuestos nitrogenados inorgánicos son muy comunes como aceptores de electrones en este tipo de respiración. Las formas de nitrógeno más comunes en la naturaleza son el amoníaco y el nitrato que se pueden originar ambos en la atmósfera por procesos químicos inorgánicos, y nitrógeno gaseoso, que es la forma más estable del nitrógeno. Uno de los aceptores de electrones alternativos más comunes es el nitrato que se convierte a formas más reducidas del nitrógeno como son los óxidos nitroso y nítrico, el amoníaco y el nitrógeno gaseoso (Wagner *et al.*, 1998).

El dióxido de carbono es muy común en la naturaleza y es un producto importante del metabolismo energético de los quimiorganótrofos. Varios grupos de procariotas son capaces de usar el  $CO_2$  como aceptor de electrones en la respiración anaerobia. Los procariotas reductores de  $CO_2$  más importantes son los metanógenos, pertenecientes al dominio Archaea, capaces de producir metano a partir de hidrógeno molecular (Stams, 1994).

Otros compuestos utilizados como aceptores de electrones por los microorganismos anaerobios son metales como el hierro (III), cobalto (III), Manganeso (IV) o selenio (VI). En ecosistemas naturales termales los compuestos que sirven como aceptores de electrones están por lo general ligados a los ciclos biogeoquímicos, tal es el caso de

los compuestos azufrados en formas oxidadas que son muy utilizados como aceptores de electrones (Roh *et al.*, 2002; Slobdkin *et al.*, 1997).

**Tabla 4.** Reacciones productoras de energía de microorganismos termófilos

REACCIÓN PRODUCTORA DE ENERGÍA	GÉNERO
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanopyrus</i> <i>Methanothermus</i> <i>Methanococcus</i>
$\text{H}_2 + \text{S}^0 \longrightarrow \text{H}_2\text{S}$	<i>Pyrodictium</i> <i>Thermoproteus</i> <i>Pyrobaculum</i> <i>Acidianus</i> <i>Stygioglobus</i>
$4\text{H}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$	<i>Archaeoglobus</i>
$3\text{H}_2 + \text{H}_2\text{SO}_3 \longrightarrow \text{H}_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O}$	<i>Archaeoglobus</i>
$5\text{H}_2 + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrolobus</i> <i>Archaeoglobus</i> <i>Ferroglobus</i>
$\text{H}_2 + \text{HNO}_3 \longrightarrow \text{HNO}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrobaculum</i> <i>Aquifex</i> <i>Pyrolobus</i>
$4\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrolobus</i>
$\text{H}_2 + 1/2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$	<i>Pyrolobus</i> <i>Pyrobaculum</i> <i>Aquifex</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Acidianus</i> <i>Metallosphaera</i>
$\text{S}^0 + 3\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$	<i>Aquifex</i> <i>Sulfolobus</i>
$2\text{FeS}_2 + 7\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{FeSO}_4 + 2\text{H}_2\text{SO}_4$	<i>Acidianus</i> <i>Metallosphaera</i>
$\text{NO}_3^- + \text{FeCO}_3 + 5\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{Fe(OH)}_3 + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}^+$	<i>Ferroglobus</i>

Fuente: Huber & Stetter, 1998

### 2.2.5. Mecanismos de supervivencia a altas temperaturas

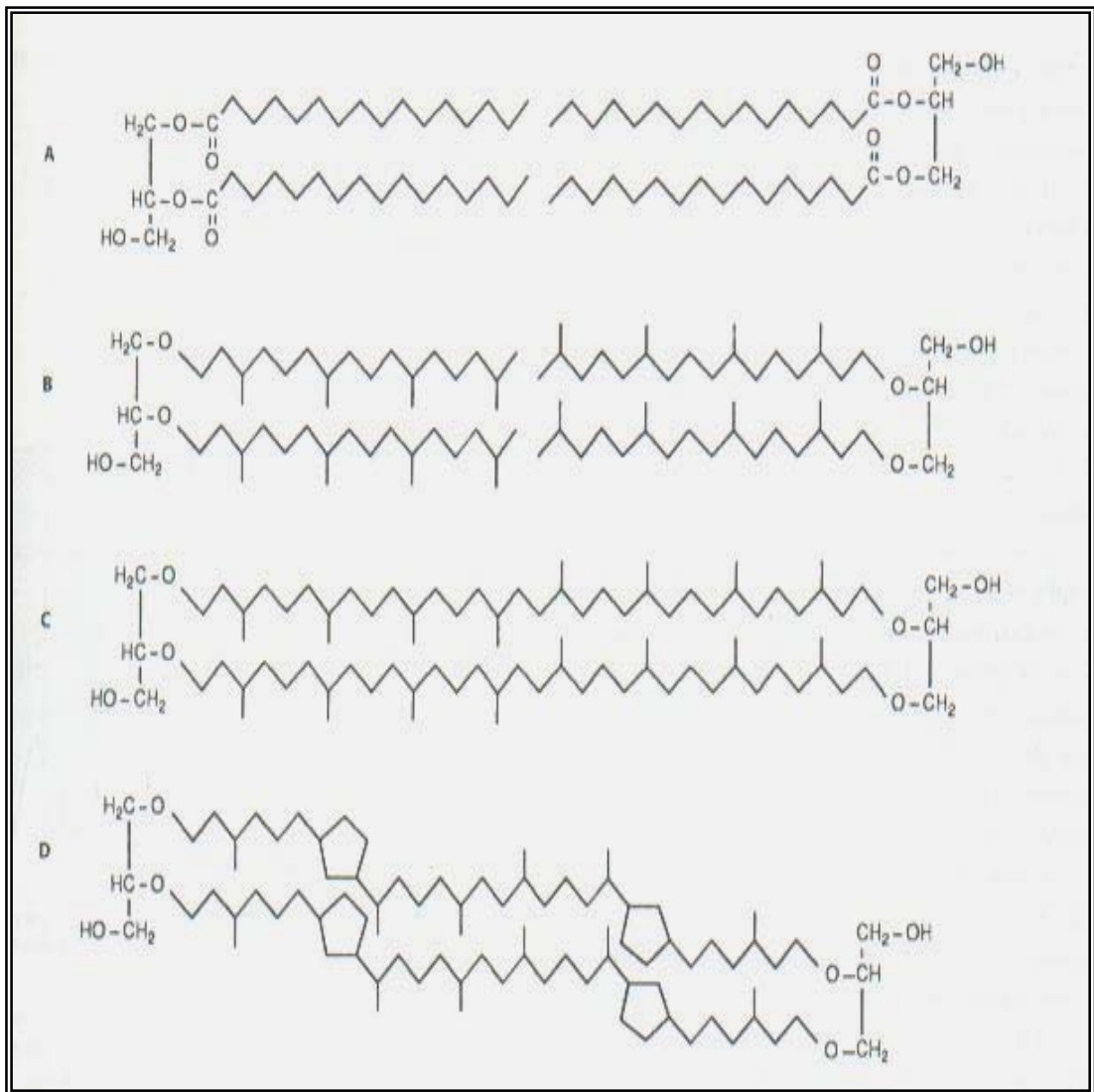
La habilidad de los microorganismos termófilos para vivir en altas temperaturas está basada en el metabolismo, la estructura y la función celular de sus componentes (Stetter, 1999).

### **2.2.5.1. Lípidos**

En los microorganismos termófilos, la membrana celular tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados con elevados puntos de fusión en comparación a los lípidos de los microorganismos mesófilos. Los microorganismos ajustan la composición de ácidos grasos y lípidos dependiendo de la temperatura de crecimiento. Al aumentar la temperatura incrementa la proporción de ácidos grasos insaturados. Esta característica le confiere a la membrana celular gran flexibilidad y estabilidad térmica (Pedroza, 2001).

Los ácidos grasos de la membrana celular proporcionan un ambiente hidrofóbico para la célula y mantienen la célula bastante rígida para vivir a elevadas temperaturas (Haki & Rakshit, 2003).

Las archaeas, las cuales son en su mayoría hipertermófilos, poseen cadenas de hidrocarburos isoprénicos ramificados unidas por enlaces éter al glicerol. En algunas arqueas, las moléculas diéter glicerol fitanil se ordenan en membranas bicapas que con excepción de los puentes éter y de las cadenas ramificadas se parecen mucho a las membranas celulares de los dominios Eucaria y Bacteria. Los componentes de la bicapa permanecen unidos sólo por fuerzas hidrofóbicas; pero al mismo tiempo el enlace éter y la ramificación del hidrocarburo aumentan la resistencia al calor de la membrana. En arqueas hipertermófilas, las moléculas tetraéter diglicerol bifitanilo forman membranas monocapa unidas por enlaces covalentes. Algunos tetraéteres contienen anillos pentacíclicos entremezclados con segmentos de hidrocarburo isoprénico, estas estructuras son muy resistentes a elevadas temperaturas y, combinadas, constituyen los componentes principales de la membrana de hipertermófilos (Stetter, 1999). La estructura de la membrana celular de microorganismos termófilos e hipertermófilos se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Tipos de estructura de la membrana celular de microorganismos termófilos. A) Membrana bicapa de diéster glicerol ácido esteárico. Las dos capas permanecen unidas sólo por fuerzas hidrofóbicas. La longitud de cadena de los ácidos grasos puede variar, pero es característico de la membrana de Eucaria y Bacteria. B) Membrana bicapa de diéster glicerol fitanilo de algunas arqueas. La longitud de la cadena de algunos hidrocarburos aumenta la estabilidad térmica. C) el tetraéster diglicerol bifitanilo forma una membrana monocapa unida covalentemente que ofrece gran resistencia al calor. D) Un tetraéster diglicerol con cadenas gemelas de hidrocarburos C<sub>40</sub> que, además de segmentos isoprenoides, incorpora dos anillos pentacíclicos por cadena. (Fuente: Atlas & Bartha, 1998)

### **2.2.5.2. Mecanismos rápidos de síntesis celular**

Otros autores (Campell & Pace, 1968) propusieron que el crecimiento a elevadas temperaturas es simplemente el resultado de rápidos mecanismos de síntesis celular que van siendo denaturados por el calor. Los termófilos contienen proteínas que son termoestables y resistentes a desnaturalización y proteólisis. Proteínas especiales conocidas como *chaperoninas* son producidas por estos microorganismos, las cuales ayudan, después de su desnaturalización a replegar las proteínas a su forma nativa y restaurar sus funciones (Haki & Rakshit, 2003).

### **2.2.5.3. Macromoléculas termoestables**

A partir de diferentes microorganismos termófilos se han aislado y caracterizado algunas de sus proteínas incluyendo varias enzimas. En general las proteínas presentan mayor estabilidad en comparación a sus homólogas en microorganismos mesófilos (Stetter, 1999).

El ADN de mesófilos tiene un porcentaje de G-C de 44.9 mol% mientras que los termófilos tienen un porcentaje mayor de G-C, característica muy común en todos los microorganismos termófilos. El ARN de transferencia es más estable en los termófilos, pero en algunos géneros la estabilidad está determinada por modificaciones estructurales. Por ejemplo, el tRNA de *Thermus thermophilus* tiene mayor porcentaje de G-C que el tRNA de *E. coli*, adicionalmente a esto, el ribotimidato está normalmente presente en el tRNA; esta molécula es reemplazada por un derivado de tiolato. Esta situación confiere estabilidad al tRNA para fortalecer la conformación del RNA. Los niveles de sustitución así como la temperatura de fusión de tRNA se incrementan con la temperatura de crecimiento de los termófilos. Las altas proporciones de G-C incrementan los puentes de fusión y estabilizan las moléculas de ácidos nucleicos de microorganismos termófilos (Stetter, 1999).

El DNA de termófilos contiene una enzima reversa DNA girasa la cual produce un superenrollamiento positivo del DNA. Este aumento del punto de ebullición del DNA (la temperatura a la cual las hebras de la doble hélice se separan) es por lo menos tan alto como máxima temperatura de crecimiento para el organismo (Haki & Rakshit, 2003; Stetter, 1999).

#### **2.2.5.4. Enzimas termoestables o extremoenzimas**

Una enzima termoestable se define como aquella que tiene una temperatura máxima de reacción por encima de la temperatura de crecimiento óptima del microorganismo (Hough & Danson, 1999). Los factores que influyen en la termoestabilidad de las extremoenzimas incluyen un incremento en los enlaces iónicos, cambios en residuos de aminoácidos específicos, incremento de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, enlaces a metales y puentes disulfuro (Demirjian *et al.*, 2001).

Los microorganismos termófilos producen enzimas que no son desnaturalizadas a altas temperaturas. Los alineamientos de estructuras secundarias y terciarias muestran que las enzimas termoestables son similares a las de sus homólogas en microorganismos mesófilos. Diferentes análisis comparativos entre enzimas termoestables y mesofílicas revelaron que la composición de aminoácidos son ligeramente parecidas pero con una clara diferencia: las enzimas termoestables contienen muchos residuos cargados e hidrofóbicos; al parecer la sustitución de un aminoácido de uno o más lugares de la enzima permite que ésta se pliegue en una forma diferente y resista los efectos desnaturalizantes del calor (Fujiwara, 2002). La frecuencia de ocurrencia de aminoácidos tales como cisteína, asparragina y ácido aspártico es significativamente menor en proteínas hiperestables con respecto a sus homólogas en microorganismos mesófilos; además la maquinaria de síntesis de proteínas y las membranas son igualmente estables a altas temperaturas (Demirjian *et al.*, 2001).

#### **2.2.5.4.1. Clasificación de enzimas termofílicas**

Las enzimas de fuentes termofílicas se clasifican en 3 clases:

**2.2.5.4.1.1. Clase I:** Enzimas las cuales son estables a temperaturas de síntesis de 55 a 65°C, pero son inactivas a temperaturas superiores (Díaz & Poutou, 1998).

**2.2.5.4.1.2. Clase II:** enzimas que son inactivas a la temperatura de síntesis excepto cuando están en presencia del substrato (Díaz & Poutou, 1998).

**2.2.5.4.1.3. Clase III:** enzimas que son altamente resistentes a calor y estables a temperaturas por encima de la temperatura de síntesis (Díaz & Poutou, 1998).

### **2.3. VENTAJAS GENERALES DE ENZIMAS DE MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS**

Las enzimas termoestables son de gran interés industrial y biotecnológico debido al hecho que sus enzimas se adaptan a los duros procesos industriales. Algunas conversiones biocatalíticas y aplicaciones industriales de las enzimas termoestables son presentadas en la Tabla 5 (Haki & Rakshit, 2003).

Una ventaja extremadamente valiosa de llevar los procesos biotecnológicos a elevadas temperaturas es reducir los riesgos de contaminación por mesófilos comunes. Además, las enzimas de microorganismos termófilos son más estables a temperaturas convencionales que las enzimas de microorganismos mesófilos, prolongando la vida media de productos comerciales. Permitir una operación a una alta temperatura también tiene una influencia significativa sobre la biodisponibilidad y solubilidad de compuestos orgánicos. Otra ventaja de procesos a elevadas temperaturas incluye un alto porcentaje de reacción debido a un descenso de la

viscosidad y un aumento en el coeficiente de difusión de los sustratos, y altos procesos de producción debido al incremento en la solubilidad de los sustratos y los productos, lo cual tiene efectos positivos para fermentaciones microbiales (Haki & Rakshit, 2003).

Tales enzimas pueden ser usadas también como modelos para la comprensión de la termoestabilidad y termoactividad, las cuales son útiles para la ingeniería de proteínas (Haki & Rakshit, 2003).

**Tabla 5.** Reacciones de bioconversión y aplicaciones de enzimas termoestables

ENZIMA	RANGO T° (°C)	BIOCONVERSION	APLICACIONES
α-Amilasa (bacterial)	90–100	Almidón → Dextrosa	Hidrólisis de almidón, panadería, cervecería, detergentes.
α-Amilasa (fúngica)	50–60	Almidón → Dextrosa	Producción de maltosa.
Pululanasa	50–60	Almidón → Dextrosa	Producción de glucosa
Xilanasa	45–65, 105 <sup>a</sup>	Pulpa Craft → xilano + lignina	Industria del papel
Quitinasa	65–75	Quitina → Quitobiosa Quitina → N-acetilglucosamina (quitibiasa) N-acetilglucosamina → Glucosamina (deacetilación) Quitina → Quitosan (deacetilación)	Alimentos, cosméticos, farmacéuticos, agroquímicos.
Celulasa	45–55, 95 <sup>b</sup>	Celulosa → Glucosa	Hidrólisis de celulosa, degradación de polímeros en detergentes.
Proteasa	65–85	Proteínas → aminoácidos y peptidos	Industrias de cerveza, detergentes, cuero y panadería.
Lipasa	30–70	Remoción de grasa, hidrólisis Interesterificación, alcoholisis, aminolisis.	Industria de lácteos, oleoquímicos, detergentes, pulpas, farmacéuticos, cosméticos y cuero.
DNA polimerasa	90–95	Amplificación del DNA	Ingeniería genética/PCR

Fuente: Haki & Rakshit, 2003

<sup>a</sup> Xilanasa a partir de *Thermotoga* sp.

<sup>b</sup> Celulasa a partir de *Thermotoga* sp.

## 2.4. ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Las lipasas son ubicuas en la naturaleza y son producidas por varias plantas, animales y microorganismos. Las lipasas de origen microbial, principalmente de bacterias y



lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos de cadena larga y prefieren substratos insolubles en agua (Ateslier, & Metin, 2006).

Las lipasas de origen microbial son las enzimas más versátiles y son conocidas por efectuar un rango de reacciones de bioconversión, las cuales incluyen hidrólisis, interesterificación, esterificación, alcoholisis, acidolisis y aminolisis. Sus únicas características incluyen especificidad de sustrato, estereoespecificidad, regioselectividad y habilidad para catalizar una reacción heterogénea en la interfase de agua soluble y sistemas insolubles de agua (Haki & Rakshit, 2003).

Los ésteres producidos juegan un papel importante en la industria de alimentos como saborizante. Mientras que metil y etil ésteres de cadena larga de ácidos carboxílicos proporcionan las especies oleoquímicas valiosas que pueden funcionar como combustibles para los motores; los ésteres de cadena larga de ácidos carboxílicos y alcoholes (ceras) tienen aplicación como lubricantes y aditivos en formulaciones cosméticas. Otras aplicaciones incluyen la hidrólisis de la grasa de la leche en la industria láctea, la remoción de impurezas no celulósicas a partir del algodón en rama antes de futuros procesamientos de productos tinturados o terminados; formulaciones de medicamentos en la industria farmacéutica y en la remoción de grasa subcutánea en la industria del cuero (Haki & Rakshit, 2003). Un biocombustible fue obtenido a partir de aceites vegetales usando una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* (Shimada *et al.*, 1999). Igualmente en la industria papelera las lipasas son empleadas para remover el “pitch” de la pulpa producida en la fabricación de papel; el “pitch” es un término usado para describir colectivamente los componentes hidrofóbicos de la madera, principalmente triglicéridos y ceras, los cuales causan graves problemas en la fabricación de papel y pulpa. Por otro lado, las lipasas han sido empleadas en química orgánica para catalizar una amplia variedad de transformaciones quimio-, regio- y estereoselectivas (Jaeger & Reetz, 1998).

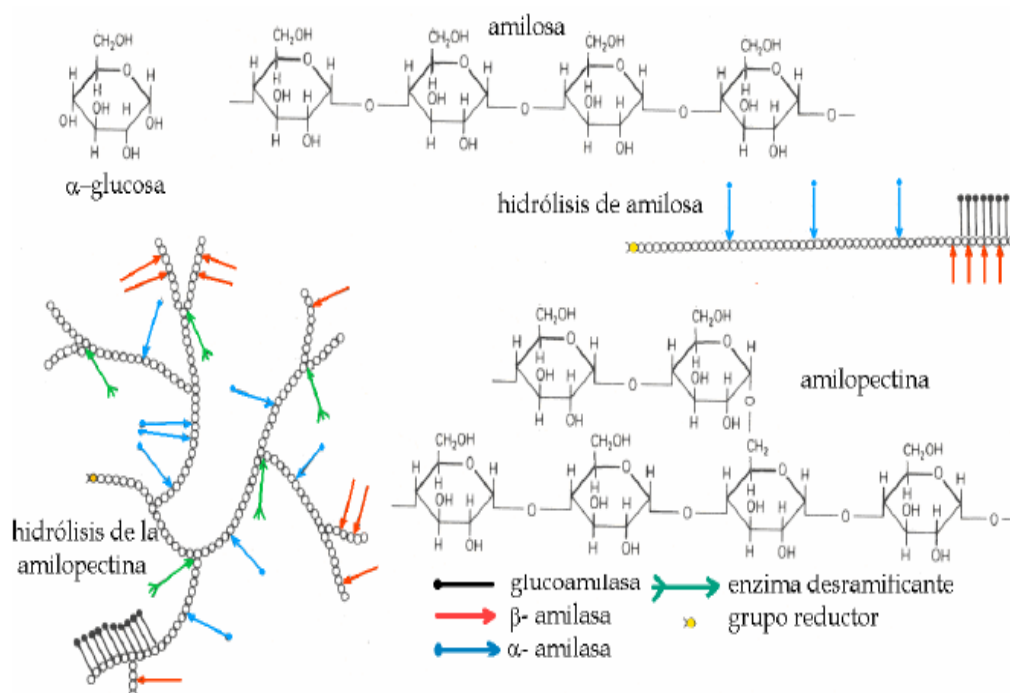
Algunas lipasas de origen microbial comercialmente disponibles son Novo Nordisk, la cual es originada a partir del hongo *Thermomyces lanuginosus* y fue expresada en *Aspergillus oryzae* y dos lipasas bacteriales, Lumafast de *Pseudomonas mendocina* y Lipomax de *Pseudomonas alcaligenes*, las cuales son producidas por Genencor International (Jaeger & Reetz, 1998).

Entre los microorganismos termófilos reportados por producir lipasas se encuentran *Bacillus thermocatenulatus* (Dharmsthiti & Luchai, 1999), *Bacillus stearothermophilus* (Gupta *et al.*, 1999), *Pyrococcus horikoshii* (Ando *et al.*, 2002), *Pyrococcus calidifontis* (Hotta *et al.*, 2002), entre otros.

## 2.5. ENZIMA AMILOLÍTICAS

Las amilasas son enzimas, las cuales hidrolizan moléculas de almidón, para obtener diversos productos incluyendo la dextrina, y progresivamente polímeros más pequeños compuestos por unidades de glucosa (Figura3) (Léveque *et al.*, 2000).

Las amilasas constituyen una clase de enzimas industriales correspondiente al 25% de las enzimas del mercado. Las  $\alpha$ -amilasas pueden ser activas a altas temperaturas de gelatinización (100 a 110°C) y licuefacción (80 a 90°C) lo que conlleva a economizar los procesos, por ser estas termofílicas y termorresistentes. Con la disponibilidad de enzimas termoestables, ha emergido un número de nuevas posibilidades en los procesos industriales. Mientras que las enzimas termoestables más ampliamente utilizadas son las amilasas en la industria del almidón, otro número de aplicaciones son desarrolladas en varios escenarios. Las enzimas termoestables aisladas de organismos termofílicos han encontrado un sin número de aplicaciones comerciales por su estabilidad inherente (Léveque *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Hidrólisis del almidón (Fuente: Schlegelti, 1993)

Después del aclarado del almidón, la acción continuada de la  $\alpha$ -amilasa forma maltodextrinas que pasan a la siguiente etapa, la sacarificación, aunque a veces se purifican pequeñas cantidades para usarlas en cremas para el café y en productos con alto contenido de grasa como mayonesas y helados, ayudando a reducir en estos casos su contenido en calorías. Las  $\alpha$ -amilasas también se utilizan en el procesado de la caña de azúcar, puesto que en esta planta, y por lo tanto en su jugo, existen pequeñas cantidades de almidón que pueden hidrolizarse antes de la evaporación como es el caso de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* a 85 a 95°C (Wiseman, 1991).

Uno de los usos principales de las amilasas es la producción de edulcorantes para la industria alimentaria, se utilizan hidrolizados de almidón como aditivos en la fabricación de caramelos, alimentos en conserva o alimentos congelados. Los jarabes que se utilizan pueden contener maltosa o glucosa (después de la sacarificación) o fructosa (después de la isomerización) (Wiseman, 1991). La solución de almidón

licuada con  $\alpha$ -amilasas puede ser sacarificada con glucoamilasas, también puede añadirse pulunasas para llevar a cabo el corte de los enlaces  $\alpha$ -1,4. La especificidad de las enzimas utilizadas y las condiciones de conversión determinan la composición de los productos finales (Crueger & Crueger, 1993).

Las  $\alpha$ -amilasas termoestables han sido aisladas a partir de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*. Las  $\beta$ -amilasas comercialmente disponibles con una actividad catalítica por enzima de los 60°C fueron aisladas a partir de varias especies de *Bacillus*, estas pueden ser usadas en conjunto con enzimas deramificadoras para producir jarábes de maltosa puro (Haki & Rakshit, 2003). Termamyl y fungamyl son dos enzimas amilolíticas bien conocidas las cuales están actualmente disponibles comercialmente. Estas enzimas son usadas ampliamente en el mundo para la producción de jarabes de glucosa y jarabes con diferentes niveles de dextrosa (Haki & Rakshit, 2003).

La utilización de las amilasas bacterianas en las industrias de fabricación de papel y de textil, se basa en la utilidad de las dextrinas producidas a partir del almidón como agentes cohesivos. En la industria textil se utilizan recubrimiento de almidón para evitar que la fibra se retuerza y aumente su peso durante el tejido; sin embargo, para el subsecuente procesamiento de la tela, el almidón tiene que ser completamente removido. Después de ser prelavado en agua caliente a 90°C durante 10 s, la tela es pasada una o más veces por un baño que contiene una solución 0.5 – 1% p/v de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis* y una solución 0.05% p/v de cloruro de calcio (para estabilizar la enzima) a temperaturas entre 65 y 80°C durante 20 segundos cada tiempo; así las amilasas se emplean para remover el almidón de la tela el cual evita la ruptura de las fibras longitudinales de ésta en el proceso de tejido (Glazer, 1998).

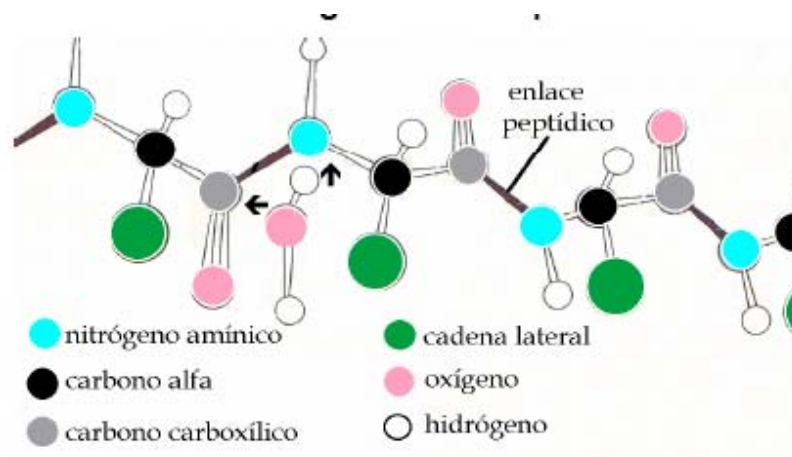
En la industria del papel se utilizan estas enzimas para producir almidón ligeramente hidrolizado que se emplea como recubrimiento adhesivo del papel imprenta. Las

amilasas modifican el almidón en la producción de papel recubierto para lograr mejor brillo, mejor propiedad de impresión y suavidad en el papel (Wiseman, 1991).

En los detergentes se encuentra otra aplicación de las amilasas, porque estas contribuyen a mejorar la eficacia de la limpieza gracias a la gran degradación de la mugre y producen un mínimo impacto ambiental por ser biodegradables (Wiseman, 1991).

## 2.6. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, estas enzimas rompen un mismo tipo de enlace, el amida o peptídico (Figura 4). Las proteasas se han convertido en la principal enzima industrial, y constituye más del 65% del mercado mundial de enzimas. Estas enzimas son ampliamente empleadas en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y del cuero (Haki & Rakshit, 2003; Kumar & Takagi, 1999).



**Figura 4.** Hidrólisis del enlace peptídico (*Fuente:* Schlegelti, 1993)

Las limitaciones de las proteasas de las plantas y animales para satisfacer las demandas del mundo, han dirigido las investigaciones hacia las proteasas

microbianas, utilizadas como aditivos en detergentes, además de sus aplicaciones en la industria del cuero para el tratamiento de las pieles, reemplazando el uso de químicos tóxicos, esto hace que estas enzimas ocupen las principales posiciones con respecto a las aplicaciones en los campo físicos y comerciales (Granados *et al.*, 2003).

Debido a su tasa media de reacción las proteasas neutras producen menos amargura en proteínas de alimentos hidrolizados, por lo tanto son usadas en la industria alimenticia, para la fabricación de galletas, pan, etc., además de la degradación de proteínas para sustratos en cervecería. Esta clase de proteasas está caracterizada por mostrar su actividad óptima a pH neutro y por su alta afinidad a aminoácidos hidrófobos. Por otro lado, las proteasas alcalinas tienen una alta actividad a pH alcalino y tienen tolerancia por un sustrato específico, su temperatura óptima oscila alrededor de los 60°C por lo cual son muy utilizadas en la industria de detergentes, mejorando la eficacia del lavado hidrolizando las proteínas coaguladas que no son dispersas por el agua (Granados *et al.*, 2003).

Por otro lado, fibras proteicas tales como cuero, plumas, cabello y uñas están abundantemente disponibles en la naturaleza como residuo. Estas pueden ser convertidas dentro de biomasa útil, proteínas concentradas o aminoácidos usando proteasas a partir de ciertos microorganismos (Anwar & Saleemuddin, 1998).

Los productores dominantes de proteasas son microorganismos de los géneros *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Staphylothermus*. Igualmente, *Bacillus stearothermophilus* produce una proteasa alcalina y termoestable la cual es óptimamente activa a 85°C y la archaea hipertermofílica *Desulfurococcus* produce una serin proteasa extremadamente termoestable (Haki & Rakshit, 2003).

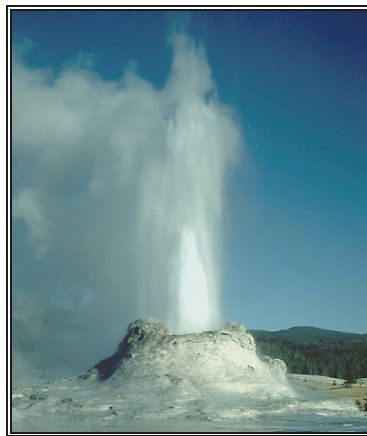
## 2.7. AMBIENTES GEOTERMALES

Dentro de los ambientes geotermales se encuentran:

### 2.7.1. Géiseres

Son descargas de agua termal intermitentes en forma de surtidor, algunas veces de frecuencia regular de agua caliente y vapor saturado. Ocurre por una generación violenta de vapor en una cavidad subterránea relativamente confinada alimentada en superficie por agua fría y en la base por agua muy caliente.

La expulsión se origina al aumentar la presión de vapor, que crea una descomposición y luego una ligera descarga inicial; posteriormente se reduce el elevado punto de ebullición de forma que el agua hierve y es expulsada a la superficie acompañada de vapor de agua, vaciándose periódicamente la cavidad (Figura 5) (Alfaro, 2002).



**Figura 5.** Géiser Castle, en Yellowstone National Park  
(Fuente: <http://geology.about.com/library/bl/images/blgeyser.htm>)

### 2.7.2. Fumarolas

Son descargas con vapor casi seco o una mezcla de vapor, agua caliente y de gases, principalmente  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$ . Cuando la descarga produce sonido es considerado fumarola. De acuerdo con la fuente de los fluidos emitidos, las fumarolas se pueden clasificar como hidrotermales y magmáticas. Las primeras se originan por ebullición y separación rápida de vapor geotérmico y se caracteriza por tener temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua, contenido casi nulo de cloruros y fluoruros, muy alto contenido de  $\text{CO}_2$  (90-100% de gas seco), predominio de  $\text{H}_2\text{S}$  entre las especies azufradas y un condensado moderadamente ácido (pH de 2 a 5). Las fumarolas volcánico-magmáticas descargan fluido a temperaturas mayores a las de ebullición del agua y en algunos casos alcanza  $700^\circ\text{C}$ , exhiben concentraciones relativas altas de cloruro y fluoruro de hidrógeno, su contenido de  $\text{CO}_2$  es menor que el de las hidrotermales (40-90% de gas seco), la especie azufrada es dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y su pH es muy ácido ( $< 0-2$ ) (Figura 6) (Alfaro, 2002).



**Figura 6.** Fumarola Krátero vul. Mutnovskaja  
(Fuente: [www.kamcatka.cz/files/km17.jpg](http://www.kamcatka.cz/files/km17.jpg))

### 2.7.3. Solfataras

Son fumarolas que consisten en emisiones de vapor de agua y ácido sulfhídrico. Las temperaturas no superan los  $100^\circ\text{C}$  (Figura 7).  
([http://natueduca.espana.es/geol\\_geolnext.volcanes4.htm](http://natueduca.espana.es/geol_geolnext.volcanes4.htm))



**Figura 7.** Solfatará Heverar en Irlanda del norte, la corriente rica en sulfuro de hidrógeno sube hasta la tierra. (*Fuente:* [www.math.science.unitn.it](http://www.math.science.unitn.it))

#### **2.7.4. Mofetas**

Son fumarolas frías que desprenden dióxido de carbono. Surgen por grietas del suelo en regiones volcánicas y también por los cráteres, cuando la erupción ya ha terminado. La gruta del Perro en Nápoles y el Valle de la Muerte en Java son algunos ejemplos ([http://natueduca.espana.es/geol\\_geolnext.volcanes4.htm](http://natueduca.espana.es/geol_geolnext.volcanes4.htm)).

#### **2.7.5. Soffioni**

Consisten en desprendimientos de vapor de agua, de temperatura superior a 100°C, que tienen lugar por las grietas y hendiduras del suelo en ciertas regiones volcánicas italianas (Toscana), que al enfriarse depositan ácido bórico y boratos ([http://natueduca.espana.es/geol\\_geolnext.volcanes4.htm](http://natueduca.espana.es/geol_geolnext.volcanes4.htm)).

#### **2.7.6. Fuentes termales**

Los manantiales o fuentes termales, son las manifestaciones más comunes en los sistemas geotérmicos. Una de las principales características de las aguas termales comparada con las fuentes no termales y aguas superficiales, es la estabilidad en

temperatura y flujo. Descargan agua caliente ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ) o tibia ( $< 45^{\circ}\text{C}$ ) y gases, principalmente  $\text{CO}_2$  (gas carbónico) y  $\text{H}_2\text{S}$  (sulfuro de hidrógeno) (Alfaro, 2002).

La distribución bimodal de valores de pH de las aguas termales oscila entre 1.8 y 2.2 y 7.5 y 9.0, estos rangos de pH reflejan la presencia de los dos principales componentes tampón de las aguas termales, el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con un  $\text{pK}$  de 1.8 y el sistema carbonato-bicarbonato con valores de  $\text{pK}$  entre 6.5 y 10.2. (Figura 8) (Díaz & Poutou, 1998).



**Figura 8.** Fuente termal del Yellowstone National Park. (Fuente: [www.yellowstone.net/screensarvers.htm](http://www.yellowstone.net/screensarvers.htm))

## 2.8. TIPOS DE AGUAS TERMALES

El criterio de clasificación de las aguas termales puede ser asumido desde diversos puntos de vista: físico, químico o físicoquímico.

Con relación a la temperatura las aguas termales pueden clasificarse de la siguiente manera (Tabla 6) (Marín, 1992)

**Tabla 6.** Clasificación de aguas termales según su temperatura

<b>TIPO DE AGUA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>
Hipertermales	50 – 100
Mesotermiales	35 – 50
Hipotermiales	20 – 35
Prototermiales	15 – 25
Fuentes frías	< 20

*Fuente: Marín, 1992*

La composición exacta de las aguas termales dependerá de la composición química de las rocas a través de las cuales fluye, lo cual permite clasificarlas en aguas bicarbonatadas, cloruradas, sódicas, sulfuradas, cloruradas cálcicas, clorosulfuradas, ferruginosas, arsenicales y radioactivas. Las principales características de dichos tipos de aguas, son citadas a continuación ([www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf](http://www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf)):

### **2.8.1. Aguas cloruradas**

Son el tipo de agua predominante en los reservorios de sistemas geotérmicos, también identificadas como maduras o equilibradas, dado que son el resultado de la interacción prolongada fluido-roca, que permite alcanzar el equilibrio físicoquímico. Su concentración de cloruros es generalmente superior a 1000 ppm. Su pH es cercano a la neutralidad. No tienen sólidos suspendidos. Las fuentes termales naturales tienen una coloración azulosa debido a la sílice suspendida. Contiene sodio, potasio, calcio, magnesio y sílica en concentraciones altas.

El hierro y el aluminio están presentes en concentraciones trazas. Se subdividen en: fuertes (más de 50 g/l), medianas (entre 10 y 50 g/l) y débiles (menos de 10 g/l) ([www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf](http://www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf)).

### **2.8.2. Aguas sulfatadas ácidas**

Son aguas superficiales generadas por calentamiento con vapor separado por ebullición del fluido profundo. Su concentración en cloruros es muy baja (no detectable) dado que en la separación ésta especie permanece en la fase líquida. Su pH es moderadamente ácido (2 – 5) debido a la zona vadosa. Son lodosas debido al ataque ácido de la roca circundante, que produce alteración superficial de baja temperatura (arcillas como caolín). Contiene cantidades de hierro y aluminio mayores a las de las aguas cloruradas, provenientes de la lixiviación ácida. Indican zonas de ebullición del fluido geotérmico. Son muy comunes en sistemas dominados por vapor ([www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf](http://www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf)).

### **2.8.3. Aguas ácidas sulfato-cloruradas**

Son aguas superficiales receptoras de un aporte significativo del sistema volcánico-magmático. Su concentración de cloruros es muy alta (mayor a 1000 ppm), provenientes de la disolución de cloruro de hidrógeno en el agua. Tiene un pH altamente ácido (menor a 2) son turbias debido al azufre elemental suspendido. Contienen concentraciones muy altas de aluminio, hierro y otros metales pesados, extraídos por lixiviación de las rocas ([www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf](http://www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf)).

### **2.8.4. Aguas bicarbonatadas**

Son aguas superficiales, periféricas al sistema hidrotermal, formadas por acumulación de CO<sub>2</sub> por debajo del nivel de la tabla de agua. Contienen altas concentraciones de bicarbonato. Su pH va desde ligeramente ácido hasta ligeramente alcalino. Estas aguas cuando poseen gran cantidad de ácidos libres (CO<sub>2</sub> mayor de 250 mg/L), también se denominan **carbónicas** o **carbo gaseosas**. ([www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf](http://www.sld.cu/sitios/menat/docs/aguas.pdf)).

## **2.9. LOCALIZACIÓN DE LAS PRINCIPALES FUENTES TERMALES EN COLOMBIA**

El recurso hídrico de Colombia está distribuido en lagos, lagunas, manantiales y mares, de igual manera en fuentes subterráneas; estas pueden ser de origen geotermal distribuidas en la región Andina y Atlántica (Alfaro, 2002). Las principales fuentes termales en Colombia se encuentran en la Tabla 7.

### **2.9.1. FUENTES TERMALES DE PAIPA E IZA**

Los municipios de Paipa e Iza se ubican en el Departamento de Boyacá, en la región central de la Cordillera Oriental, sobre el altiplano Cundiboyacense (Alfaro, 2002). Los manantiales termales del sistema geotérmico de Paipa se localizan principalmente en dos zonas: El ITP- Hotel Lanceros y La Playa. En Iza, se encuentran registrados solamente dos manantiales al occidente del municipio. Las características químicas de las aguas de los manantiales de Paipa e Iza, son notablemente diferentes. En Paipa, se registran temperaturas hasta de 77°C, así como el mayor contenido en sales entre los manantiales termales de Colombia. En los manantiales de Iza, la temperatura máxima registrada, en superficie, es de unos 50°C y su salinidad es moderada alrededor de 1600 mg/L como máximo (Alfaro, 2002).

**Tabla 7.** Fuentes termales en Colombia

<b>DEPARTAMENTO</b>	<b>MUNICIPIO</b>	<b>NOMBRE – FUENTE – UBICACIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>ANTIOQUIA</b>	TITIRIBI	Hacienda El Líbano	Sulfurosas
	SANTO DOMINGO	Vereda Termales	Cloruro de sodio
	ALEJANDRIA	Volcán de Lodo	Carbonatada-sílice Sulfatosa, mixta y radioactiva
<b>ATLANTICO</b>	ARBOLETES		
	USIACURI	Perímetro urbano	Fría constantemente
<b>BOYACA</b>	LURUACO	Termales de Luruaco	
	PAIPA	Termales de Paipa Hacienda Alto El Salitre	Carbonatadas-sulfuradas, Radioactivas-cloruradas, alcalinas
	IZA	700m N.W. de Iza	Carbonatada
<b>CALDAS</b>	VILLA DE LEYVA	1.000m al E. de Sáchica	
	MANIZALES	Termales del Ruíz	Sulfuradas, sódicas y radioactivas Cloradas, fuertes, calcio, magnesio anhídrido carbónico
<b>CAUCA</b>	PURACE	Volcán Puracé	Sulfurosas ácidas, salinas y barrosas
		Hacienda Chiliglo, Coconuco, Paletará	Fuentes ácidas del río Vinagre, contienen ácido muriático y sulfúrico.
<b>CUNDINAMARCA</b>	CHOACHI	Agua Caliente	Térmicas sulfurosas
	GACHETA	Margen izquierdo R. Guavio	Térmicas sin olor
	GUASCA	Aguas Calientes Hacienda Salitre	Bicarbonatada cálcica, ferruginosa
	GACHALA	Minas de yeso	Sulfurosa
	TABIO	Finca Aguas Calientes	Sulfurosa
	SUBA	Cerro de Suba	Altamente térmica sulfurosa
	GIRARDOT	Balneario Casablanca	

**Tabla 7.** (continuación). Fuentes termales en Colombia

<b>DEPARTAMENTO</b>	<b>MUNICIPIO</b>	<b>NOMBRE – FUENTE – UBICACIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<b>CUNDINAMARCA</b>	ANAPOIMA	Baños de Santana	Sulfurosa
	NIMAIMA	N. Confluencia ríos Pisarma y Negro	Térmica – clorurada
	BITUIMA		Térmica – sulfurosa
	TOCAIMA	Aguata, Catárnica, Santa Lucía y El Nolia	Térmica sulfuroclorosódicas (agualata)
	MACHETA	N. cerca de la carretera Chocontá-Macheta	gaseosas (catárnica)
	GUATAQUI	E. del pueblo cerca de Confl. río Seco con quebrada Neme	Sulfuradas de cantc. Azufre
	NEMOCON	Entre Catárnica y Las Tominejas	Sulfurada radioactiva
	GUATAVITA	Cerca al Puente de Icononzo	Térmica sulfurosa
	PANDI	Orilla izq. río Negro	Térmica sulfurosa
	QUETAME	Hacienda Suratá	Térmica
SUESCA	Antiguo camino de herradura de Machetá	Térmica	
TIBIRITA	Cerca Fuentes Paloquemao	Térmica sulfurosa	
APULO		Sulfurosa, magnesio y hierro	
<b>HUILA</b>	TIMANA	Baños de Cican	Sulfurosas
	LA PLATA	Cascada de Azufrada	Azufrada
	SALADOBLANCO	Termales de Morelia	Oligometálicas
	RIVERA	Rivera	Oligométricas
<b>MAGDALENA</b>	CIENAGA	El Volcán	Cloradascálcicas-impotables
<b>NARIÑO</b>	IPIALES	Corregimiento victoria	Cloribicarbonatadas, alcalinas
	LA CRUZ	Manantiales de Tajumbina	
	MALLAMA	Margen izq. Baño Tercán	Potable
		Margen derecho de la Calera	Potable
	TUQUERRES	Terma Chimangual	Limpia/Hidróxido de hierro
	Margen derecha de la quebrada Tutacha	Termomineral, clorada mixta, ferruginosa	
	Pasto cerca de Galeras		
TMBO TABLON (PASTO)	Encima de las caleras de Ortega	Carbónico-cálcico- ferruginoso y sódicas	
BUESACO			

**Tabla 7.** (continuación). Fuentes termales en Colombia

<b>DEPARTAMENTO</b>	<b>MUNICIPIO</b>	<b>NOMBRE – FUENTE – UBICACIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICA</b>
<b>NORTE DE SANTANDER</b>	CUCUTA BOCHALEMA  CHINACOTA	Corregimiento de Villamizar Vía Cúcuta Pamplona – Caserío Diamante Margen izquierda río Pamplona	Sulfurosa
<b>PUTUMAYO</b>	VALLE DE SIBUNDOY	San Andrés cerca de Santiago	Muy caliente
<b>RISARALDA</b>	SANTA ROSA DE CABAL	A. E. de la población	Carbonatos, hidratos, cloruros
<b>SANTANDER</b>		Provincias García Rovira y Vélez	Cloruro de sodio, sulfurosas, bicarbonato de cal; de soda
<b>TOLIMA</b>	ATACO IBAGUE (Cto. De Villa Restrepo) CTO. DE TOCHE SALDAÑA CARMEN DE APICALA ICONONZO	Margen derecha quebrada Tine Margen izquierda del río Combeima  El Guayo La Arenosa Quebradas del municipio Cerca puente natural	Sulfurosas Termales, potables, radiativas, poco salinas Similares a las de Paipa

*Fuente: Marín, 1992*

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Aislar y caracterizar microorganismos termófilos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos empleando diferentes estrategias de cultivo a partir de los manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá).

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1. Evaluar diferentes estrategias de cultivo para aislar microorganismos termófilos anaerobios de los manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá).

3.2.2. Caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas de los manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá).

3.2.3. Caracterizar genotípicamente las cepas aisladas de los manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá) mediante el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA.

3.2.4. Determinar la actividad lipolítica, proteolítica y amilolítica cuantitativa para cada una de las cepas aisladas de los manantiales termominerales de Paipa e Iza (Boyacá).

## 4. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

### 4.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.1.1. Población de estudio y muestra

La población de estudio son los microorganismos termófilos anaerobios presentes en manantiales termominerales. Los MTM de los municipios de Paipa e Iza seleccionados para aislar microorganismos termófilos anaerobios son: El MTM El Batán (IZA-03) localizado al suroccidente del municipio de Iza ( $5^{\circ} 35' 22.82''$  N,  $72^{\circ} 59' 16.09''$  W) y el MTM Ojo del Diablo (PP-11) localizado en la margen derecha de la vía que lleva al parqueadero del Hotel Lanceros en el municipio de Paipa ( $5^{\circ} 45' 33.29''$  N,  $73^{\circ} 6' 49.89''$  W). Las principales características de estos MTM se encuentra en las Tablas 8 y 9 y en los Anexos 1 y 2.

**Tabla 8.** Principales característica del MTM El Batán

EL BATAN (IZA)		
PARAMETRO	TEMPERATURA	56°C
	CONDUCTIVIDAD	609 $\mu$ S/cm
	Ph	6.8
	SÓLIDOS DISUELTOS	543 mg/L
CLASIFICACIÓN	FÍSICO (T°)	Semitermal
	COMPOSICIÓN QUÍMICA	Bicarbonatada sódica
NOMENCLATURA	INGEOMINAS	IZ-3
	USBA	IZA-03

*Fuente: Alfaro, 2002*

**Tabla 9.** Principales característica del MTM Ojo del Diablo

OJO DEL DIABLO (PAIPA)		
PARAMETRO	TEMPERATURA	68.1°C
	CONDUCTIVIDAD	43200 $\mu$ S/cm
	pH	7.0
	SÓLIDOS DISUELTOS	41138 mg/L
CLASIFICACIÓN	FÍSICO (T°)	Hipertermal
	COMPOSICIÓN QUÍMICA	Sulfatada sódica
NOMENCLATURA	INGEOMINAS	PP11
	USBA	P-3

*Fuente: Alfaro, 2002*

## 4.2. MÉTODOS

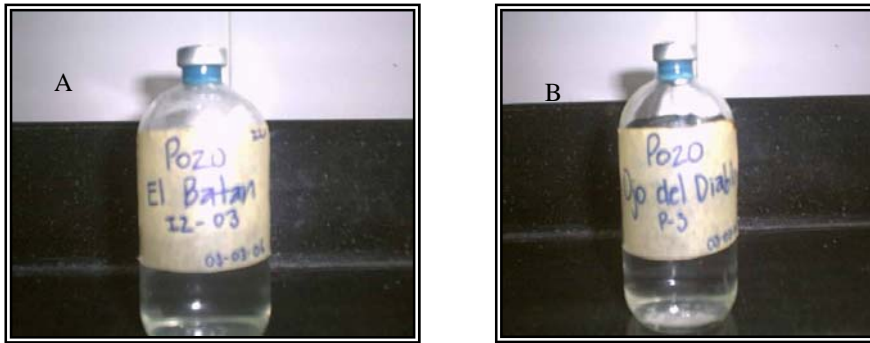
### 4.2.1. Recolección de muestras

Las muestras de los MTM IZA-03 y PP-11 se tomaron usando recipientes plásticos estériles de 5 litros y se transportaron en nevera portátil a temperatura ambiente (Figura 9).



**Figura 9.** Recolección de muestras. A) MTM P-11. B) MTM IZA-03

Se homogenizó el volumen total de la muestra y posteriormente se tomaron 50 ml de cada uno de los MTM y se adicionaron en frascos de penicilina en condiciones de esterilidad y anaerobiosis utilizando  $N_2$ , éstos fueron empleados como inóculos iniciales (Figura 10).



**Figura 10.** Inóculo de manantiales termominerales. A) MTM P-11. B) MTM IZA-03

#### 4.2.2. Estrategias de aislamiento

Para el aislamiento de microorganismos termófilos anaerobios se evaluaron tres estrategias de aislamiento correspondientes a medios oligotróficos utilizando como base el agua proveniente de cada MTM suplementado con extracto de levadura y solución de oligoelementos para la “Serie MTM E”; con extracto de levadura, solución de oligoelementos y agar para la “Serie MTM MS” y sin ningún suplemento de extracto de levadura ni solución de oligoelementos para la “Serie MTM P” (Tablas 10, 11 y 12). Posteriormente cada serie fue suplementada con diferentes fuentes de carbono y aceptor de electrones (Tabla 13). El pH final del medio se ajustó a 6.8 con HCl 10M y posteriormente se llevó a ebullición. El medio fue transferido a tubos Hungate (5 ml de medio a cada tubo) en condiciones de anaerobiosis con  $N_2$  y posteriormente se realizó intercambio de fase gaseosa con una mezcla de  $N_2$  y  $CO_2$  (80:20) (Figura 11). El medio se esterilizó a 15 psi a  $121^{\circ}C$  durante 20 minutos. Una vez autoclavados los tubos Hungate que contenían el Medio Básico (MB) se adicionó 0.05 ml de  $Na_2S$  al 2% para asegurar condiciones de anaerobiosis y 0.1ml de  $NaHCO_3$  al 10% para mantener el pH del medio.

Las fuentes de carbono y los aceptores de electrones fueron adicionados a cada tubo a partir de soluciones madres estériles.

**Tabla 10.** Composición del medio para la “Serie MTM E”

<b>SERIE MTM E</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	0.05 g
Solución traza I (Anexo 3)	1 ml
Solución traza II (Anexo 4)	1 ml
Agua del MTM	1000 ml

**Tabla 11.** Composición del medio para la “Serie MTMP”

<b>SERIE MTM P</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>g/L</b>
Agua del MTM	1000 ml

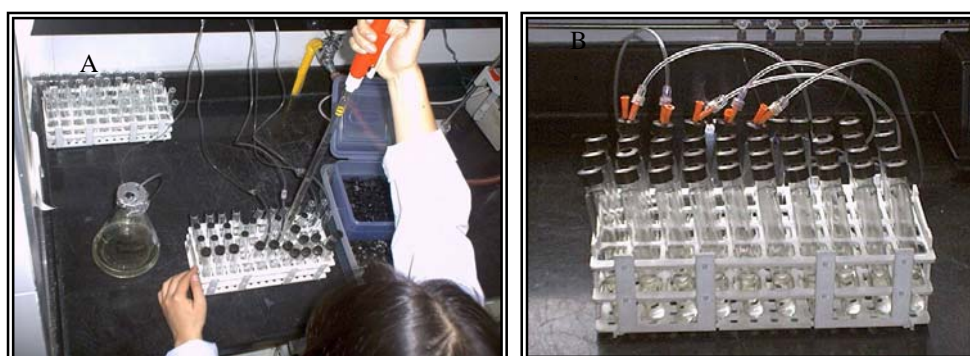
**Tabla 12.** Composición del medio para la “Serie MTM MS”

<b>SERIE MTM MS</b>	
<b>COMPONENTE</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	0.05 g
Solución traza I (Anexo 3)	1 ml
Solución traza II (Anexo 4)	1 ml
Agar noble	20 g/L
Agua del MTM	1000 ml

**Tabla 13.** Fuentes de carbono y aceptores de electrones empleados

FUENTES DE CARBONO Y ACEPTORES DE ELECTRONES			
FUENTE DE CARBONO	Tween 80	100 µl/L	
	Dimetil tartrato	5 mM	
	Etil oleato	0.25 mM	
	Trioleína	0.25 mM	
	Acido oleico	0.25 mM	
	Aceite de oliva	100 µl/L	
	Tributil acetil citrato	5 mM	
	Casaminoácidos + caseína	0.6 g /L + 0.6 g/L	
	Gelatina	0.6 g/L	
	Caseína	0.6 g/L	
	Peptona + gelatina	0.6 g/L + 0.6 g/L	
	Almidón	10 g/L	
	ACEPTOR DE ELECTRONES	S <sup>0</sup>	0.6 g/L
		S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	20 mM
KNO <sub>3</sub>		10 mM	

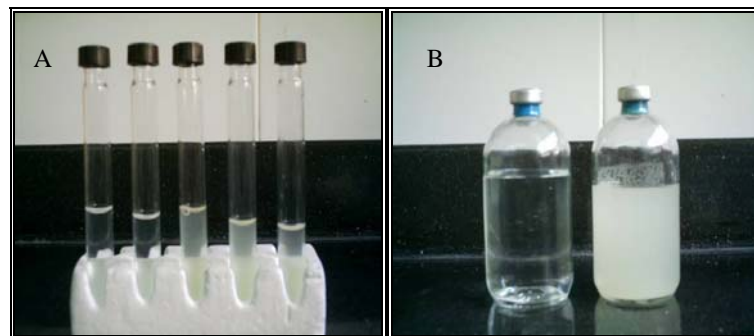
Los medios de cultivos se incubaron a 56°C para las muestras del MTM IZA-03 y 70°C para las muestras del MTM PP-11. El efecto de las diferentes estrategias de aislamiento evaluadas sobre el crecimiento de microorganismos termófilos anaerobios se determinó evaluando la densidad microbiana mediante observación en el microscopio de contraste de fases.



**Figura 11.** Medios de cultivo. A) Preparación de medios de cultivo B) Intercambio de fase gaseosa

### 4.2.3. Inoculación

Para el crecimiento de microorganismos termófilos anaerobios se inocularon 2 ml de cada una de las muestras de los MTM en las diferentes series de cultivo con diferentes fuentes de carbono y aceptores de electrones. Los criterios que se tuvieron en cuenta para determinar los tubos positivos fueron: visualización del aumento de la turbidez del medio, verificación microscópica del crecimiento del microorganismo en el medio líquido utilizando el microscopio de contraste de fases y observación de presencia de colonia en los medios sólidos utilizando el estereoscopio (Figura 12).



**Figura 12 A y B.** Aumento de turbidez en los medios de cultivo debido al crecimiento microbiano

### 4.2.4. Aislamiento

A partir de los tubos que presentaron una alta densidad bacteriana se realizaron diluciones seriadas a medio líquido ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) y a medio sólido ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , y  $10^{-9}$ ), siguiendo la técnica de tubo rodado para cultivo de microorganismos anaerobios descrita por Hungate (1969) (Figura 13) con el fin de obtener cepas puras. A partir de las últimas diluciones positivas se realizaron los aislamientos en medio sólido con agar noble 2% (Sigma) usando la técnica descrita anteriormente. Las cepas aisladas se purificaron a través del uso repetido de esta técnica hasta obtener cultivos axénicos.

Para verificar la pureza de las cepas aisladas éstas se repicaron en el medio correspondiente y enriquecido con glucosa (10 mM) y peptona (2%) y se realizó seguimiento mediante observaciones en microscopio de contraste de fases.



**Figura 13.** Aislamiento de colonias. A) Técnica de tubo rodado descrita por Hungate.  
B) Aislamiento de colonias

#### **4.2.5. Caracterización fenotípica**

Las cepas aisladas se caracterizaron fenotípicamente evaluando morfología, coloración de Gram, presencia de esporas, anaerobiosis estricta, cinética de crecimiento, utilización de aceptores de electrones y actividad enzimática.

##### **4.2.5.1. Morfología**

Para el estudio de la morfología se utilizó un microscopio de contraste de fases (Nikon), que permitió determinar la forma de las células, coloración de Gram, movilidad y presencia y posición de las esporas.

#### **4.2.5.2. Coloración de Gram**

La coloración de Gram se realizó siguiendo el protocolo Hucker (1965). Se utilizaron *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como controles.

#### **4.2.5.3. Presencia de esporas**

La presencia de esporas se determinó inoculando, después de obtener crecimiento en la temperatura habitual para cada cepa, 2 tubos en cada una de las siguientes condiciones: 10 minutos a 85°C, 20 minutos a 85°C, 40 minutos a 85°C, 5 minutos a 95°C y 10 minutos a 95°C. Cada tubo fue observado al microscopio para detectar la presencia de esporas y posteriormente repicado a un medio fresco e incubado a su temperatura habitual de crecimiento. La observación al microscopio de esporas o un crecimiento positivo posterior después de la incubación a la temperatura habitual, se consideró positivo para la presencia de esporas.

#### **4.2.5.4. Evaluación de anaerobiosis estricta**

Para verificar si las cepas aisladas eran anaerobias estrictas, estas fueron inoculadas en medios de cultivo oxigenados (exentos de agentes reductores como Na<sub>2</sub>S). Los tubos por duplicado fueron incubados a la temperatura habitual de crecimiento de las cepas. La capacidad de las cepas para crecer en aerobiosis se verificó por observación de crecimiento en el microscopio de contraste de fases.

#### **4.2.5.5. Evaluación de aceptores de electrones**

Los aceptores de electrones evaluados fueron SO<sub>4</sub> (20mM), S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (20mM), y S<sup>0</sup> (2%). Las cepas aisladas fueron subcultivadas 2 veces bajo las mismas condiciones experimentales. Se utilizó medio básico de la Serie MTM E suplementado con glucosa (20mM) y aceptor de electrones (SO<sub>4</sub> 20mM, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 20mM y S<sup>0</sup> 2%). La

evaluación de la utilización de aceptores de electrones se realizó por duplicado. En esta prueba las cepas fueron incubadas a su temperatura habitual de crecimiento por 5 días. La determinación de sulfuro se realizó mediante el método Cord-Ruwisch (1985) y teniendo en cuenta el valor de sulfuros encontrado en el control (medio básico de la Serie MTM E sin inocular y suplementado con 0.05 ml de Na<sub>2</sub>S 2%/tubo de 5 ml).

#### **4.2.5.6. Determinación de temperatura óptima de crecimiento**

Todos los experimentos fueron realizados en tubos Hungate en medio básico de la Serie MTM E suplementado con glucosa (20 mM) y tiosulfato (20 mM). Las cepas fueron subcultivadas 2 veces consecutivas bajo las mismas condiciones experimentales de temperatura. El rango de temperatura para crecimiento evaluado fue de 32°C a 75°C (32, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 75°C). esta evaluación se realizó midiendo la velocidad específica de crecimiento,  $\mu$  esp (expresada en h<sup>-1</sup>), la velocidad corresponde a la pendiente de la recta:  $\text{Log (DO)} = \mu \text{ esp} * (\text{tiempo incubación}) * \text{Log (DO)}_{10}$ . El crecimiento se midió directamente por la lectura de la densidad óptica a 580 nm en el espectrofotómetro (Jenway 6400). Para cada temperatura, la medida de la velocidad específica de crecimiento se efectuó por duplicado en inóculos del 10% de cada cepa en fase exponencial. El promedio de estas dos repeticiones fue utilizado para definir el rango y la temperatura óptima de crecimiento.

#### **4.2.6. Actividades enzimáticas**

Para la cuantificación de cada una de las actividades enzimáticas se tomaron muestras a las 0, 12, 24 y 36 horas por duplicado.

#### **4.2.6.1. Actividad lipolítica**

Para determinar la actividad lipolítica cada una de las cepas aisladas fue cultivada en medio básico con aceite de oliva (10 µl/L) por 5 días. Se utilizó *p*-nitrofenil acetato (pNPA) como sustrato (Ateslier & Metin, 2006) (Anexo 5), tomando 50µL del sobrenadante del cultivo microbiano y detectando posteriormente la presencia de *p*-nitrofenol a partir de la degradación de pNPA. La prueba se leyó en un espectrofotómetro (Jenway 6400) a 346 nm, utilizando como blanco 20 µL de la solución de pNPA + 930 µL de buffer fosfato 50 mM, pH 6.0. La curva estándar se realizó usando soluciones de 0.5 a 10 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 6.0 de *p*-nitrofenol. Una unidad lipolítica fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol (pNP) por minuto bajo las condiciones de la prueba.

Como control se utilizó un microorganismo lipolítico reportado en literatura, *Pseudomonas aeruginosa* (Sharon *et al.*, 1998; Singh & Banerjee, 2005), el cual fue obtenido del Cepario de USBA. Para la cuantificación de la actividad lipolítica, este microorganismo se repicó inicialmente en caldo nutritivo para obtener una buena densidad microbiana y se incubó durante 24 horas a 37°C, posteriormente para la prueba, el microorganismo se repicó en medio básico suplementado con aceite de oliva (10 µl/L) y se incubó a 37°C.

#### **4.2.6.2. Actividad proteolítica**

Para determinar la actividad proteolítica las cepas aisladas fueron cultivadas en medio básico con caseína (10 g/L) por 5 días. Se usó la técnica de la tirosina (Ghorbel-Frinkha *et al.*, 2005) (Anexo 6), utilizando 1 ml de cultivo microbiano por ml de solución de caseína detectando posteriormente la presencia de tirosina a partir de la degradación de la caseína. La prueba se leyó en un espectrofotómetro (Jenway 6400)

a 280 nm, utilizando como blanco una solución que contenía 1 ml de ácido tricloroacético y 1 ml de buffer fosfato 0.1 M pH 7.2. La curva estándar se realizó usando soluciones de 10 a 100 mM en agua destilada de tirosina. Una unidad proteolítica fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de tirosina por minuto bajo las condiciones de la prueba.

Para la cuantificación de proteínas extracelulares las cepas aisladas fueron cultivadas en medio básico con caseína (10 g/L) por 5 días. Se usó la técnica de Bradford (Bradford, 1976) (Anexo 7), con 1 ml de cultivo microbiano por ml de solución de caseína. La prueba se leyó en un espectrofotómetro (Jenway 6400) a 595 nm, utilizando como blanco una solución que contenía 5 ml de reactivo de Bradford y 0.1 ml de NaCl 0.15 M. La curva estándar se realizó usando soluciones de 100 a 800  $\mu$ g/ml en NaCl 0.15 M de albúmina de suero bovino (BSA).

Como control se utilizó un microorganismo proteolítico reportado en literatura, *Bacillus subtilis* (Kembhavi *et al.*, 1993; Setyorini *et al.*, 2006), la cual fue obtenido del Cepario de Monitoría del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Para la cuantificación de la actividad proteolítica, este microorganismo se repicó inicialmente en caldo nutritivo para obtener una buena densidad microbiana y se incubó durante 24 horas a 37°C, posteriormente para la prueba, el microorganismo se repicó en medio básico suplementado con caseína (10 g/L) y se incubó a 37°C.

#### **4.2.6.3. Actividad amilolítica**

Para determinar la actividad amilolítica las cepas aisladas fueron cultivadas en medio básico con almidón (10 g/L) por 5 días. Se usó la técnica del 3, 5 ácido dinitro salicílico (DNS) (Routh, 1990) (Anexo 8), utilizando 0.25 ml de reactivo DNS por cada 0.25 ml de la muestra. La actividad amilolítica se determinó en un

espectrofotómetro (Jenway 6400) a 540 nm, utilizando como blanco 0.25 ml de reactivo DNS + 2.75 ml de agua destilada. La curva estándar se realizó usando soluciones 0.5 a 2 g/L de glucosa. Una unidad amilolítica fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto bajo las condiciones de la prueba.

Como control se utilizó un microorganismo amilolítico reportado en literatura, *Bacillus licheniformis* (Bravo *et al.*, 2006), la cual fue obtenida del Cepario de Monitoría del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Para la cuantificación de la actividad amilolítica, este microorganismo se repicó inicialmente en caldo nutritivo para obtener una buena densidad microbiana y se incubó durante 24 horas a 37 °C, posteriormente para la prueba, el microorganismo se repicó medio básico suplementado con almidón (10 g/L) y se incubó a 37 °C.

#### **4.2.7. Caracterización molecular del gen 16S rRNA de las cepas aisladas**

Para la extracción de DNA, las cepas fueron cultivadas en frascos de penicilina que contenían 50 ml de medio básico de la Serie MTM E, suplementado con 10 mM de glucosa. Posteriormente se centrifugó el cultivo bacteriano 5 minutos a 12.000 r.p.m. con el fin de concentrar la biomasa celular. A partir del pellet recuperado se realizó extracción enzimática de DNA siguiendo el protocolo descrito por Baena *et al* (1999). Se verificó la extracción de DNA mediante un gel de agarosa al 1.2% teñido con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, utilizando como marcador de peso molecular EZ-Load™.

Para la amplificación del gen 16S rRNA se utilizaron los iniciadores universales Fd1 (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y R6 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGAC-3') para obtener un producto de PCR de

aproximadamente 1500 pb correspondientes a las posiciones 8 a 1494 del gen 16S rRNA basado en la numeración de *E. coli*. La reacción de PCR de volumen final 50  $\mu\text{L}$  contenía 5.0  $\mu\text{L}$  de buffer 10x, 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 200  $\mu\text{M}$  de dNTP y 0.05 U de Taq DNA polymerase. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler<sup>TM</sup> (BioRad) con el siguiente programa de amplificación: 2 min a 96 °C, 30 s a 96 °C, 40 s a 56°C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C (30 ciclos). El producto PCR fue secuenciado a MacroGen (Corea), donde se secuenciaron aproximadamente 900 pb. Para el posicionamiento filogenético de las cepas aisladas se realizó el análisis de cada secuencia en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO

Para el aislamiento de microorganismos termófilos anaerobios en fuentes termales de Paipa e Iza (Boyacá) se evaluaron 3 estrategias de cultivo: “Serie MTM E”, “Serie MTM P” y “Serie MTM MS”, siendo todas series oligotróficas puesto que se ha demostrado que medios con bajas concentraciones de nutrientes permiten un aislamiento efectivo de microorganismos de ambientes acuáticos porque éstos se caracterizan por vivir en condiciones limitadas de nutrientes (Bartscht *et al.*, 1999; Fry, 2004). Las muestras fueron tomadas a partir de dos manantiales termominerales (MTM) del departamento de Boyacá: El Batán (Iza) (IZA-03) y Ojo del Diablo (Paipa) (PP-11). El MTM El Batán tiene una temperatura de 56°C y un pH de 6.8 mientras que el MTM Ojo del Diablo tiene una temperatura de 68°C y un pH de 7.0 (Alfaro, 2002).

Los medios de cultivo de cada una de las series evaluadas inoculados con las muestras de los MTM fueron incubados a 55°C para las muestras del MTM IZA-03 y a 70°C para las muestras del MTM PP-11. Después de 4 semanas de incubación, en los medios de cultivo del MTM IZA-03 se evidenció un muy bajo crecimiento microbiano en la Serie MTM E, mientras que en las series MTM P y MTM MS no se evidenció crecimiento ni presencia de colonias. Por otro lado, en los medio de cultivo del MTM PP-11 no se evidenció crecimiento en ninguna de las tres series evaluadas transcurridas 4 semanas de incubación. Debido a esto, todos los medios de cultivo de la Serie MTM E se suplementaron con 10 mM de glucosa y solución de vitaminas de Balch (Balch *et al.*, 1979) con el fin de impulsar el crecimiento de de los microorganismos que se encontraban en las muestras en una baja densidad.

En las muestras del MTM IZA-03 de la Serie MTM E después de 5 días de incubación se evidenció crecimiento de bacilos cortos móviles en los medios que contenían como fuente de carbono original gelatina y en los medio que contenían como fuente de carbono original caseína + casaminoácidos se observaron bacilos delgados rectos no móviles, bacilos largos gruesos rectos no móviles y bacilos cortos gruesos no móviles. Esto se debió posiblemente a que los microorganismos presentes no estaban creciendo a expensas del substrato inicial sino que estaban usando el extracto de levadura presente en el medio y por los tanto se determinó que los microorganismos que crecieron posteriormente eran sacarolíticos que utilizaron la glucosa adicionada al medio, igualmente la presencia de solución de oligoelementos y vitaminas de Balch estimulo el crecimientos de los microorganismos ya que estas contienen elementos traza como manganeso, hierro, cobalto, níquel, zinc, selenio y molibdeno los cuales son indispensables para el crecimiento.

De otra parte, no se evidenció crecimiento en las muestras del MTM PP-11; por lo tanto, se decidió suplementar los medios de cultivo de la serie MTM E con 0.05% de extracto de levadura adicional y disminuir la temperatura de incubación de 70 a 60°C, debido a que en el segundo muestreo este MTM reportó una temperatura de 62°C. Después de 1 semana de incubación se evidenció crecimiento de bacilos largos gruesos no móviles en las muestras de las Serie MTM E (con aceite de oliva como fuente de carbono). Posteriormente para estimular el crecimiento de estos microorganismos el medio fue suplementado con fructosa 10 mM, ya que la fructosa ha sido reportada como una importante fuente de carbohidrato para la producción de lipasas extracelulares (Papaparaskevas *et al.*, 1992), y se observó un mayor crecimiento microbiano después de 6 días de incubación.

Los MTM, por lo general se caracterizan por ser ambientes oligotróficos, razón por la cual para el aislamiento de microorganismos en este tipo de ambientes extremos es ideal utilizar medios con bajas concentraciones de nutrientes, Böckelmann *et al*

(2000) mostró que medios poco enriquecidos que contienen concentraciones de 0.025% de glucosa y de extracto de levadura presentaron mejores recuentos y generaron un amplio rango de morfologías de colonias en comparación con medios enriquecidos como CPS (agar caseína peptona almidón) o R2A que contienen concentraciones de glucosa y extracto de levadura de 0.5 g/L. Sin embargo, en la Serie MTM P evaluada que no estaba suplementada con extracto de levadura y solución de oligoelementos no se evidenció crecimiento de microorganismos organotróficos en ninguno de los dos manantiales termominerales. Cabe anotar que las cepas aisladas de la Serie MTM E, crecen en medios con bajas concentraciones de nutrientes (0.66 g/L ó 0.25 mM a 5 mM de fuente de carbono y 0.05 g/L de extracto de levadura) en comparación con otros microorganismos termófilos anaerobios aislados de fuentes termales, como por ejemplo *Thermoanaerobacter tengcongensis* el cual fue aislado en un medio que contenía 10 g/L de almidón y 1 g/L de extracto de levadura (Xue *et al.*, 2001) o *Thermoanaerobacter yonseiensis* el cual fue aislado de un medio que contenía 5 g/L de fuente de carbono y 1 g/L de extracto de levadura (Kim *et al.*, 2001)

Los resultados de las estrategias de cultivo usadas en este estudio enfatizaron la importancia de la optimización del medio para ganar la máxima eficiencia de aislamiento de microorganismos termófilos anaerobios. Se pudo determinar que para el aislamiento de microorganismos termófilos anaerobios presentes en los manantiales termominerales IZA-03 y PP-11 el medio de cultivo debe contener, además de la fuente de carbono, 0.05g/L de extracto de levadura, 1 ml/L de solución de oligoelementos, solución de vitaminas y agua del correspondiente MTM.

A partir de los tubos que presentaron un alto crecimiento microbiano se realizaron los aislamientos en medio sólidos con agar noble al 2% empleando la técnica de tubo rodado (Hungate, 1969) hasta obtener colonias puras. Se aislaron dos cepas del MTM

IZA-03 denominadas IZA-03-2 e IZA-03-3 de la Serie MTM E que estaba suplementado con glucosa y se aisló una cepa del MTM PP-11 denominada P3-18, de la Serie MTM E que contenía aceite de oliva como fuente original de carbono suplementado con fructosa.

## 5.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

### 5.2.1. Morfología

La descripción morfológica de cada una de las cepas comprende la descripción microscópica de la forma de las células y macroscópica de la colonia, así como su coloración de Gram y la movilidad y se encuentra en la Tabla 14 (Figura 14, 15 y 16). La morfología de las 3 cepas aisladas es muy similar, todas son de forma bacilar, se disponen solos o en parejas y son Gram positivas; sin embargo presentan variaciones en su morfología lo cual permite establecer diferencias entre ellas: la cepa IZA-03-3 a diferencia de las otras dos cepas es móvil, además esta cepa no formaba cadenas mientras que las otras dos cepas si formaban cadenas después de dos días de incubación, el tamaño de las células de la cepa IZA-03-2, a diferencia de las otras cepas, alcanzaba en fase tardía exponencial longitudes hasta de 14  $\mu\text{m}$  de largo. En cuanto a las características macroscópicas, las colonias de las cepas IZA-03-2 e IZA-03-3 son muy similares, pero presentan diferencias en su color y tamaño, por otro lado la morfología de colonias de la cepa P3-18 difiere por completo de las otras dos cepas ya que las colonias de esta cepa son blancas, rugosas, opacas y dentadas.

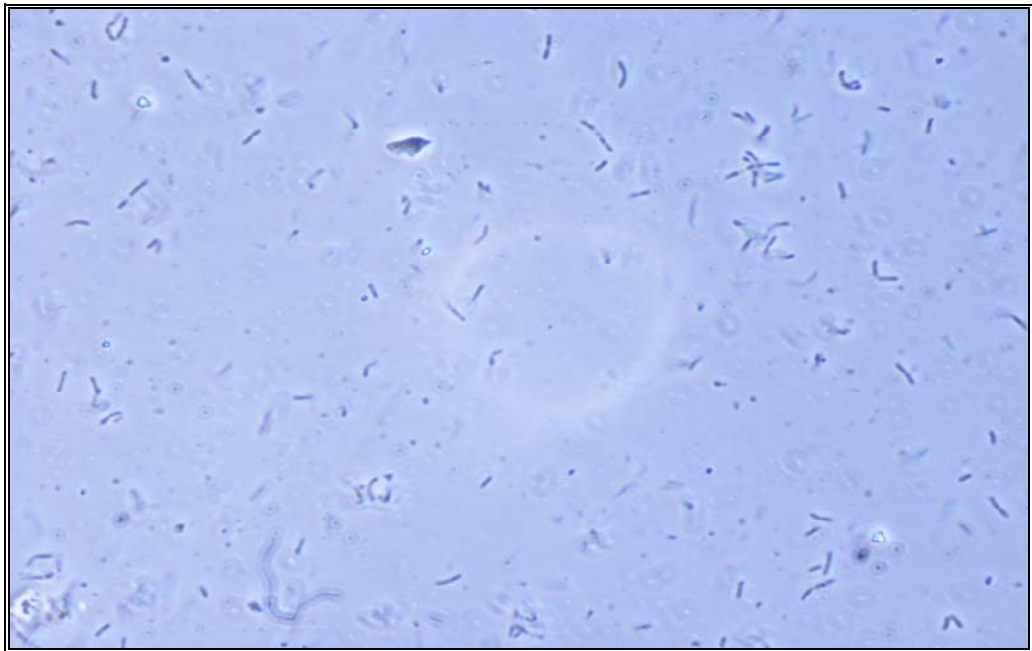
Por otro lado, en estudios microbiológicos en ambientes termales similares a los MTM IZA-03 y PP-11 se han reportado miembros de los géneros *Anoxybacillus*, *Caloramator*, *Thermoanaerobacter* y *Thermobrachium*, que presentan características similares a las cepas aisladas en este estudio (Engle *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1993; Pikuta *et al.*, 2000; Plugge *et al.*, 2000; Seyfried *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2001)

**Tabla 16.** Caracterización fenotípica de las cepas aisladas de los MTM El Batán y Ojo del Diablo

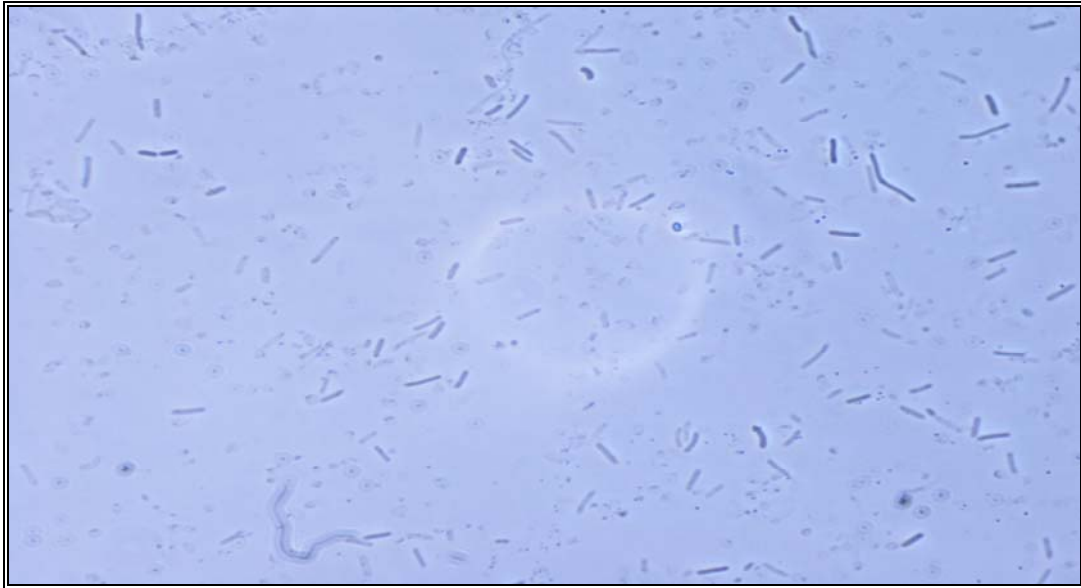
CEPA	MTM	MORFOLOGÍA CELULA	MORFOLOGÍA A COLONIA	COLORACION DE GRAM	SUSTRATO DE AISLAMIENTO	RANGO DE T°	T° ÓPTIMA	ACEPTOR DE ELECTRONES DE AISLAMIENTO	MOVILIDAD
<b>IZA-03-2</b>	IZA-03	Bacilos largo curvos no móviles, se disponen solos, en parejas, y en algunas ocasiones en cadenas. El tamaño de la célula es de 2-5 µm de largo y 0,4 µm de ancho. Después de dos días de incubación las células alcanzan longitudes de 14 µm de largo.	Colonia redonda, transparente, cremosa con bordes lisos con un diámetro de 0.3 mm.	Gram positivo	Caseína + casaminoácidos	45 – 55 °C	50 °C	Tiosulfato	No móvil
<b>IZA-03-3</b>	IZA-03	Bacilos cortos móviles se disponen solos o en parejas. El tamaño de las células es de 1-3µm de largos y 0.3 µm de ancho.	Colonia redonda, blanca, grande con bordes lisos con un diámetro de 0.5 mm.	Gram positivo	Gelatina	50 – 60 °C	55 °C	Tiosulfato	Móvil
<b>P3-18</b>	PP-11	Bacilos rectos no móviles, se disponen solo, en parejas o en cadenas, el tamaño de las células es de 2-4µm de largo y 0,7 µm de ancho; cuando forma cadenas alcanza longitudes de 6 µm de largo.	Colonia blanca, dentada, rugosa, opaca con un diámetro de 0,5 mm	Gram positivo	Aceite de oliva	45 -60 °C	60 °C	Tiosulfato	No móvil



**Figura 14.** Vista microscópica de las cepa IZA-03-2



**Figura 15.** Vista microscópica de las cepa IZA-03-3



**Figura 16.** Vista microscópica de las cepa P3-18

### 5.2.2. Presencia de esporas

En las diferentes condiciones evaluadas (10 minutos a 85°C, 20 minutos a 85°C, 40 minutos a 85°C, 5 minutos a 95°C y 10 minutos a 95°C) todas las cepas presentaron esporas al ser observadas al microscopio. La presencia de estas fue luego confirmada al obtener crecimiento en un medio fresco inoculado con las muestras sometidas a las respectivas condiciones (Tabla 15).

Especies pertenecientes a los géneros *Thermoanaerobacter* como *T. Brockii* (Cayol *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1993), *T. finni* (Cayol *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 1986), *T. italicus* (Kozianowski *et al.*, 1997), *T. mathranii* (Larsen *et al.*, 1997) y *T. yonseiensis* (Kim *et al.*, 2001); *Caloramator* como *C. proteoclasticus* (Tarlera *et al.*, 1997) y todas las especies del género *Anoxybacillus* (Belduz *et al.*, 2003; De Clerck *et al.*, 2004; Dulger *et al.*, 2004; Pikuta *et al.*, 2000; Kevbrin *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2006; Yumoto *et al.*, 2004) las cuales tienen una morfología similar a las cepas aisladas en este trabajo, forman esporas terminales esféricas o redondas.

**Tabla 15.** Presencia de esporas de las cepas aisladas en este estudio

<b>CEPA</b>	<b>PRESENCIA DE ESPORAS</b>
IZA-03-2	Espora terminal redonda
IZA-03-3	Espora terminal esférica
P3-18	Espora terminal esférica

#### **5.2.4. Anaerobiosis estricta**

En esta prueba ninguna de las cepas presentó crecimiento en medio aerobio, excepto la cepa P3-18; no obstante, el crecimiento que presentó ésta cepa en el medio aerobio no fue tan abundante como el medio completamente anaerobio (Tabla 16). Esta característica fenotípica es un claro indicio la cepa P3-18 es diferente a las otras dos cepas aisladas.

Debido a la baja solubilidad del oxígeno a altas temperaturas y a la presencia de gases reducidos en ambientes hidrotermales como los manantiales termominerales IZA-03 “El Batán” y PP-11 “Ojo del Diablo” es muy alta la posibilidad de encontrar microorganismos anaerobios estrictos, ya que estas condiciones favorecen la proliferación de microorganismos que crecen en ausencia de oxígeno. Sin embargo, en este tipo de ambientes extremos las superficies expuestas al aire pueden tener cantidades razonables de oxígeno lo cual permite también el crecimiento de microorganismos aerobios facultativos o microaerofílicos (Huber & Stetter, 1998), tal es el caso de la cepa P3-18 que creció bajo condiciones de aerobiosis aunque en menor proporción que cuando esta en medio anaerobio.

**Tabla 16.** Anaerobiosis estricta de cada una de las cepas aisladas

<b>CEPA</b>	<b>ANAEROBIOSIS Estricta</b>
IZA-03-2	Anaerobio estricto
IZA-03-3	Anaerobio estricto
P3-18	Anaerobio facultativo

### 5.2.5. Evaluación de aceptores de electrones

Empleando el método de Cord-Ruwisch (1985) se determinó la producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) utilizando tres aceptores de electrones ( $S^0$ ,  $SO_4$  y  $SO_3$ ) (Tabla 17).

**Tabla 17.** Evaluación de la reducción de Tiosulfato/Azufre elemental/Sulfato por las cepas aisladas

	ACEPTORES DE ELECTRONES EVALUADOS		
	Condiciones de cultivo evaluadas <sup>1</sup>		
CEPA	Glucosa + Tio*	Glucosa + $S^0$ *	Glucosa + $SO_4$ *
IZA-03-2	1.15	1.12	1.05
IZA-03-3	0	0	0
P3-18	1,38	1,26	1,15
Control <sup>2</sup>	0,028		

\* Concentración de sulfuro (mM).

<sup>1</sup> Esta evaluación se realizó en tubos Hungate por duplicado en medio básico de la Serie MTM E suplementados con glucosa (20 mM), extracto de levadura (0.05g/L) y aceptor de electrones (tiosulfato y sulfato, 20 mM; azufre elemental, 2%).

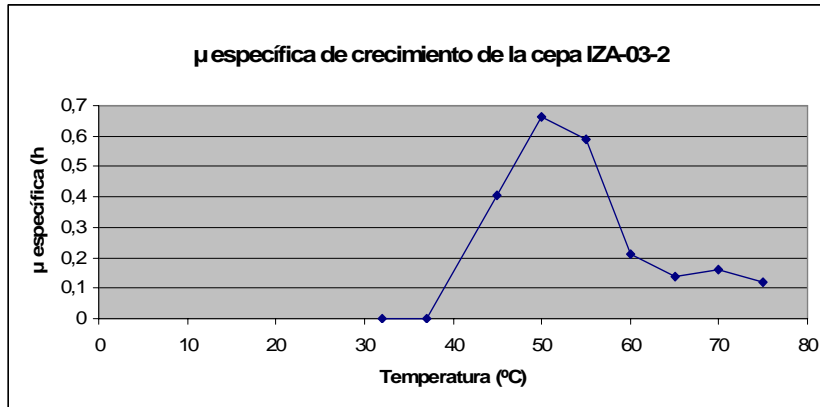
Estos datos corresponden a los datos de los promedios duplicados realizados para cada una de las cepas y cada uno de los aceptores de electrones evaluados.

<sup>2</sup> El control fue medio básico de la Serie MTM E suplementado con glucosa (20 mM) y  $Na_2S$  (0.05ml/tubo 5ml).

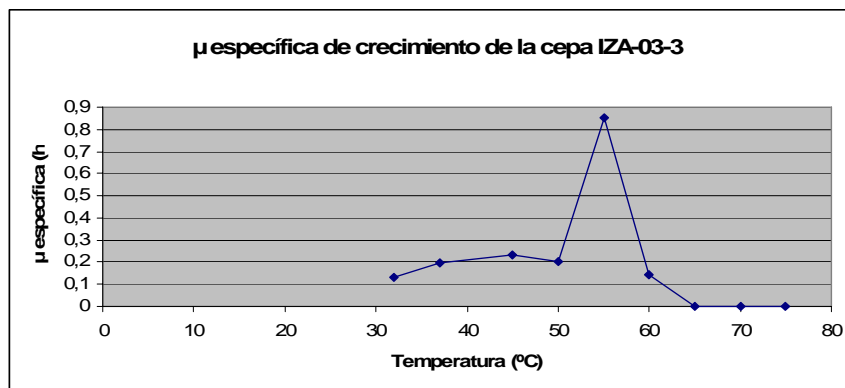
Con base en las concentraciones de sulfuro de hidrógeno producidas por la reducción de los aceptores de electrones, ninguno de los aceptores de electrones evaluados es utilizado por las cepas y por lo tanto se sugiere que las cepas aisladas tienen un metabolismo fermentativo.

### 5.2.6. Temperatura óptima de crecimiento

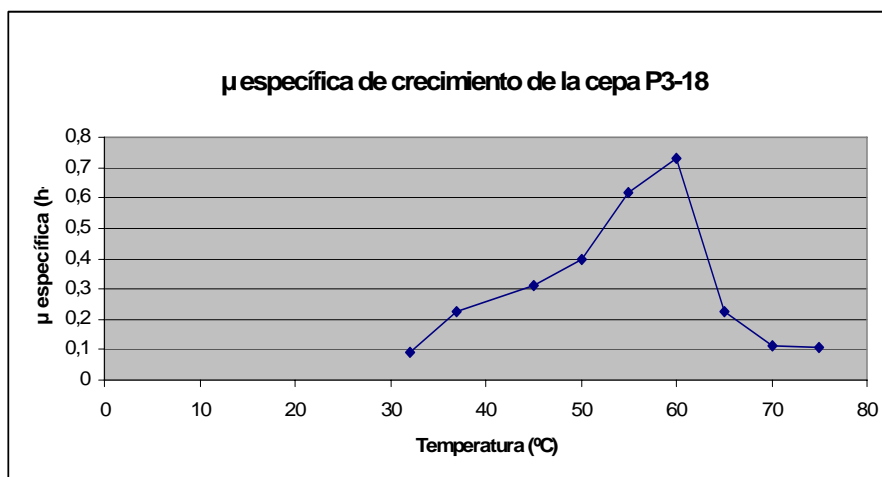
La rango de temperatura de crecimiento para la cepa IZA-03-02 es de 45 a 75°C con un óptimo de 50°C, para la cepa IZA-03-3 el rango de temperatura de crecimiento es de 45 a 60°C con un óptimo de 55°C y para la cepa P3-18 la temperatura óptima de crecimiento es de 37 a 65°C, con un óptimo de 60°C. En las figuras 17, 18 y 19 se muestran los rangos y temperatura óptima de crecimiento de las cepas aisladas.



**Figura 17.** Rango y temperatura óptima de crecimiento de la cepa IZA-03-2



**Figura 18.** Rango y temperatura óptima de crecimiento de la cepa IZA-03-3



**Figura 19.** Rango y temperatura óptima de crecimiento de la cepa P3-18

Con los resultados obtenidos se confirmó que los microorganismos aislados de los manantiales termominerales IZA-03 y P3-18 son termófilos ya que crecen a temperaturas superiores a los 50 °C e igualmente se confirmó que ninguna de las cepas crece a una temperatura superior a los 80 °C.

### 5.2.7. Actividades enzimáticas

#### 5.2.7.1. Actividad lipolítica

La cepa IZA-03-2 presentó la más alta actividad lipolítica con una máxima actividad de 2.06 U/min/ml la cual se evidenció a las 24 horas de crecimiento del microorganismo, mientras que las cepas IZ-03-3 y P3-18 presentaron una baja actividad lipolítica de 1.05 y 1.52 U/min/ml, respectivamente (Tabla 18).

**Tabla 18.** Resultados de la actividad lipolítica cuantitativa obtenidos por la técnica de *p*-NPA

CEPA	Absorbancia 346 nm	Concentración de <i>p</i> -nitrofenol (g/L) <sup>2</sup>	U/5min/L	U/ml/L	U/min/ml
<b>IZA-03-2</b>	0.860	2.06	10335.22	2067.04	2.06
<b>IZA-03-3</b>	0.414	1.05	5289.35	1057.87	1.06
<b>P3-18</b>	0.572	1.52	7640.70	1528.14	1.53
<i>P. aeruginosa</i>	0.916	2.41	12080.3	2416.06	2.42
<b>Control<sup>1</sup></b>	0.073	0.21			

<sup>1</sup> El control fue medio básico estéril de la Serie MTM E suplementado con Aceite de oliva (10µl/L).

<sup>2</sup> Concentración del *p*-nitrofenol en las muestras menos la concentración del *p*-nitrofenol obtenida en el control.

Comparando la actividades lipolíticas reportadas por microorganismos termófilos aislados de fuentes termales como *Bacillus thermocatenuatus* que tiene 2.074 U/min/ml (Schmidt-Dannert *et al*, 1996), la actividad lipolítica de la cepa IZA-03-2 es bastante significativa teniendo en cuenta que la lipasa producida por *Bacillus thermocatenuatus* es utilizada a nivel industrial (Rúa *et al.*, 1997; Schmidt-Dannert *et al*, 1996).

Las lipasas catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formando glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Estas reacciones usualmente se producen con alta regio- y/o enantioselectividad, haciendo de las lipasas un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica. Las razones para el enorme potencial biotecnológico de las lipasas microbiales incluye el hecho que estas enzimas son estables en solventes orgánicos, no requieren de cofactores, poseen una amplia especificidad de sustrato y presentan una altas enantioselectividad (Jaeger & Reetz, 1998). Teniendo en cuenta esto se considera fundamental profundizar en los estudios de las actividades lipolíticas de la cepa IZA-03-2 con el fin de determinar su utilidad a escala biotecnológica, ya que las lipasas tiene aplicaciones en síntesis orgánica, hidrólisis de grasas y aceites, modificación de grasas, resolución de mezclas racémicas y análisis químicos (Sharma *et al.*, 2001).

#### **5.2.7.2. Actividad proteolítica**

La actividad proteolítica de las cepas aisladas se muestra en la Tabla 19 y 20. Todas las cepas expresaron actividad proteolítica. La cepa P3-18 presentó la más alta actividad proteolítica de 107.62 U/mg mientras que las cepas IZA-03-2 e IZA-03-3 mostraron una baja actividad proteolítica de 67.58 y 74.05 U/mg , respectivamente. Sin embargo, teniendo en cuenta que la actividad proteolítica reportada por microorganismos como *Thermus* sp. (1467 U/mg) (Freeman *et al.*, 1993) o *Bacillus stearothermophilus* (187 U/mg) (Sookkheo *et al.*, 2000) los cuales son usadas comercialmente, se puede sugerir que la actividad proteolítica expresada por la cepa P3-18 no tiene relevancia a nivel industrial.

**Tabla 19.** Resultados de la actividad proteolítica cuantitativa obtenidos por la técnica de la tirosina

CEPA	Absorbancias 280 nm	Concentración de tirosina (g/L) <sup>2</sup>	UP/60min/L	UP/ml/L
<b>IZA-03-2</b>	0.687	6.0083	33195.08	553.25
<b>IZA-03-3</b>	0.705	6.1745	34113.34	558.55
<b>P3-18</b>	0.740	6.4976	35898.84	598.31
<i>B. subtilis</i>	0.878	7.7719	95949.75	1599.16
<b>Control<sup>1</sup></b>	0.064	0.8467		

<sup>1</sup> El control fue medio básico estéril de la Serie MTM E suplementado con caseína (10g/L).

<sup>2</sup> Concentración de la tirosina en las muestras menos la concentración de tirosina obtenida en el control.

**Tabla 20.** Resultados de la cuantificación de proteínas extracelulares obtenidos por la técnica de Bradford

CEPA	Absorbancias 595 nm	Proteínas totales (mg) <sup>2</sup>	Actividad específica (U/mg) <sup>3</sup>
<b>IZA-03-2</b>	0.374	3.5122	67.58
<b>IZA-03-3</b>	0.783	7.6772	74.05
<b>P3-18</b>	0.575	5.5590	107.62
<i>B. subtilis</i>	0.308	2.8401	563.06
<b>Control<sup>1</sup></b>	0.025	0.2128	

<sup>1</sup> El control fue medio básico estéril de la Serie MTM E suplementado con caseína (10g/L).

<sup>2</sup> Concentración de proteínas en las muestras menos la concentración de proteínas obtenida en el control.

<sup>3</sup> La actividad específica se determinó dividiendo las UP/min/L en la concentración de proteínas totales.

### 5.2.7.3. Actividad amilolítica

Todas las cepas presentaron actividad amilolítica cuantitativa. La cepa P3-18 presentó la más alta actividad amilolítica (973.38 UA/min/L); mientras que las cepas IZA-03-2 e IZA-03-3 presentaron una actividad de 270.23 UA/min/L y 578.87 U/min/L, respectivamente (Tabla 21).

En estudios previos realizados en el MTM PP-10 “Pozo Hotel Lanceros”, ubicado en el municipio de Paipa, se reportaron actividades amilolíticas de *Thermoanaerobacter* spp. de mínimo 563.89 UA/min/L y máximo 905.65 UA/min/L (Posada *et al.*, 2004);

e igualmente la actividad reportada por especies de microorganismos termófilos aislados de fuentes termales como *Thermococcus hydrothermales* es de 289 UA/min/L (Legin *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que las amilasas de estos microorganismos son usadas comúnmente a nivel industrial se sugiere que la actividad amilolítica presentada por la cepa P3-18 puede tener potencial aplicación a nivel industria, ya que este tipo de enzimas son de gran interés en la producción industrial de glucosa. (Léveque *et al.*, 2000).

**Tabla 21.** Resultados de la actividad amilolítica cuantitativa obtenidos por la técnica de DNS

CEPA	Absorbancias 540 nm	Concentración de glucosa (g/L) <sup>2</sup>	UP/30min/L	UA/min/L
<b>IZA-03-2</b>	0.094	1.4592	8107.07	270.23
<b>IZA-03-3</b>	0.360	3.1259	17366.33	578.87
<b>P3-18</b>	0.700	5.2562	29201.47	973.38
<i>B. licheniformis</i>	0.895	6.4780	35989.27	1199.64
<b>Control<sup>1</sup></b>	-0.011	0.7324		

<sup>1</sup> El control fue medio básico estéril de la Serie MTM E suplementado con almidón (10g/L).

<sup>2</sup> Concentración de la glucosa en las muestras menos la concentración de la glucosa obtenida en el control.

### 5.2.8. Caracterización molecular del gen 16S rRNA de las cepas aisladas

El análisis de la secuencia 16S rRNA y la comparación subsecuente con la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) a través del BLAST, permitieron ubicar a la cepa P3-18 dentro de la familia *Bacillaceae* específicamente dentro del género *Anoxybacillus* (Garrity *et al.*, 2004); esta cepa presentó una similitud del 99% con *Anoxybacillus flavithermus*.

Las características fenotípicas del género *Anoxybacillus* coinciden con las características presentadas por la cepa P3-18. Las especies pertenecientes al género *Anoxybacillus* (*A. flavithermus*, *A. pushchinoensis*, *A. gonensis*, *A. ayderensis*, *A. contaminans*, *A. voinovskiensis* y *A. kamchatkensis*) se caracterizan por ser bacilos rectos, el tamaño de las células varía de 0.4 a 0.85 µm de ancho x 2.5 a 3.0 µm de

largo, se disponen en parejas o cadenas, con bordes redondos, Gram positivo, forman esporas terminales o subterminales y son anaerobios obligados o anaerobios facultativos y alcalófilos (Pikuta *et al.*, 2000; Pikuta *et al.*, 2003). Todas las especies pertenecientes al genero *Anoxybacillus* son quimiorganotróficas, con metabolismo fermentativo, las especies de este género son nutricionalmente versátiles y usan una amplia variedad de carbohidratos como por ejemplo sucrosa, fructosa, glucosa, maltosa, manitol, arabinosa, trehalosa y rafinosa (Belduz *et al.*, 2003; Den Clerck *et al.*, 2004; Dulger *et al.*, 2004; Pikuta *et al.*, 2000; Kevbrin *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2006; Yumoto *et al.*, 2004).

Los rangos de temperatura de crecimiento de las especies del genero (30 a 72°C), son comparables con el rango de temperatura de la cepa P3-18, de 37 a 65°C; igualmente las temperaturas óptimas de crecimiento reportados en bibliografía por las especies del genero *Anoxybacillus* (50 a 65°C) son similares a la temperatura óptima de crecimiento presentada por la cepa P3-18 (60°C) (Belduz *et al.*, 2003; De Clerck *et al.*, 2004; Dulger *et al.*, 2004; Pikuta *et al.*, 2000; Kevbrin *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2006; Yumoto *et al.*, 2004).

Al igual que las especies pertenecientes al genero *Anoxybacillus* la cepa P3-18 no produce sulfuro de hidrógeno a partir de la reducción de azufre elemental, tiosulfato o sulfato. Por el contrario, se ha reportado que las especies *A. pushchinensis*, *A. flavithermus*, *A. contaminans* y *A. voinovskiensis* son denitrificantes, es decir, que tienen la capacidad de reducir nitrato a nitrito, óxido nitroso o dinitrógeno (Yamamoto *et al.*, 2006). Vale la pena aclarar que en este estudio no se evaluó la reducción de nitrato por las cepas aisladas, sin embargo, se sugiere en futuras investigaciones determinar la utilización de  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones, ya que una característica típica de este género es la reducción de nitrato a nitrito.

La caracterización fenotípica de la cepa P3-18 coincide con las características descritas por el género *Anoxybacillus* y sumado al valor de similitud entre las secuencias del gen 16S rRNA de la cepa y *Anoxybacillus flavithermus*, se considera que la cepa P3-18 pertenece a esta especie.

En cuanto a la cepa IZA-03-3 los análisis de la secuencia 16S rRNA y la comparación subsecuente con la base de datos de la NCBI, mostraron una similitud del 94% con el clon LNE-6, el cual está cercanamente relacionado con una especie aún no cultivada del género *Caloramator*. El clon LNE-6 fue aislado de una fuente termal en Grensdalur (Islandia) utilizando simultáneamente métodos de enriquecimiento y métodos moleculares. (Hobel *et al.*, 2004).

Algunas características fenotípicas del género *Caloramator* coinciden con las características presentadas por la cepa IZA-03-3. Las especies pertenecientes al género *Caloramator* son bacilos un poco curvos, filamentosos y las células tienen un tamaño de 0.4-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 2-100  $\mu\text{m}$  de largo y se disponen solas o parejas. Estas características coinciden con la morfología presentada por la cepa IZA-03-3. Al igual que la cepa IZA-03-3, las especies del género *Caloramator* se caracterizan por ser anaerobias estrictas y no utilizan sulfato, azufre elemental o tiosulfato como aceptor de electrones (Chrisostomos *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1987; Plugge *et al.*, 2000; Seyfried *et al.*, 2002; Tarlera *et al.*, 1997).

El rango de temperatura (32 a 60°C) y la temperatura óptima (55°C) de crecimiento de cepa IZA-03-3 son comparables con los presentados por el género *Caloramator*, ya que el rango de temperatura de crecimiento de *Caloramator* spp es de 37 a 80°C, pero la temperatura óptima de crecimiento permite clasificar a sus cinco especies dentro de dos grupos: en el primero especies moderadamente termofílicas como *C. prosteoclasticus* (55°C), *C. coolhaasii* (50 a 55°C) y *C. viterbensis* (58°C), mientras que en el segundo, termofílico, el cual tiene temperaturas óptimas de crecimiento

superiores a los 60°C. (*C. fervidus*, 68°C y *C. indicus*, 60-65°C) electrones (Chrisostomos *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1987; Plugge *et al.*, 2000; Seyfried *et al.*, 2002; Tarlera *et al.*, 1997).

Sin embargo, el género *Caloramator* presenta algunas diferencias con las características reportadas para las especies de este género. Las células de *Caloramator* tiñen Gram negativas pero la ultraestructura de la pared celular se parece a la de las bacterias anaerobias Gram positivas (Chrisostomos *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1987; Plugge *et al.*, 2000; Tarlera *et al.*, 1997). Sin embargo, la cepa IZA-03-3 presento una coloración Gram positiva.

La formación de esporas termoresistentes ha sido demostrada solo por dos especies de *Caloramator* spp, (*C. fervidus* y *C. prosteoclasticus*), pero no para *C. indicus* y *C. viterbensis* (Chrisostomos *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1987; Plugge *et al.*, 2000; Seyfried *et al.*, 2002; Tarlera *et al.*, 1997). Bajo las condiciones evaluadas en esta prueba se observó esta característica en la cepa IZA-03-3.

Teniendo en cuenta las características fenotípicas y el porcentaje de similitud (94%) de la cepa IZA-03-3 con el género *Caloramator*, esta cepa puede ser considerada una nueva especie del género *Caloramator*. Se requiere un análisis polifásico más completo para definir este estatus taxonómico.

Finalmente, la secuencia del 16S rRNA de la cepa IZA-03-2, enviado por MacroGen, no fue de buena calidad, ya que los cromatogramos obtenidos para la secuencia de esta cepa no tenían una buena resolución, y por lo tanto no se obtuvo una secuenciación correcta, lo cual no permitió su análisis y no se pudo obtener el posicionamiento filogenético de esta cepa.

A nivel fenotípico la cepa IZA-02-2 es anaerobia estricta, termófila moderada, sacarolítica y forma esporas terminales. La cepa IZA-03-2 se caracterizó por formar vesículas en los extremos de la célula en la fase tardía exponencial, esta característica es similar a la estructura presentada por miembros del orden *Thermotogales*, pero además este orden se caracteriza por reducir tiosulfato lo cual difiere con la cepa IZA-03-2, razón por la cual se descartó que pertenezca a este orden (Fardeau *et al.*, 1996; Miranda-Tello *et al.*, 2004; Ravot *et al.*, 1995).

Comparando con microorganismos que han sido aislados también de fuentes termales como los miembros de los géneros *Caminibacter*, *Caloranaerobacter* y *Caminicella*, también se descarta que la cepa IZA-03-2 pertenezca a alguno de estos géneros debido a que presenta notables diferencias en características como la coloración de Gram (Gram negativa), la ausencia de esporas y la utilización de azufre elemental como aceptor de electrones por el género *Caminibacter* (Alain *et al.*, 2002; Miroshnichenko *et al.*, 2004), la movilidad, la coloración de Gram (Gram negativa) y la utilización de azufre elemental como aceptor de electrones por el género *Caminicella* (Alain *et al.*, 2002) y la coloración de Gram (Gram negativa) por el género *Caloranaerobacter* (Wery *et al.*, 2001).

Debido a que la secuencia obtenida de la cepa IZA-03-2 fue de mala calidad se debe enviar nuevamente el producto pPCR a secuenciar para poder comparar la secuencia de esta cepa con la base de datos de la NCBI y de esta manera poder determinar el posicionamiento filogenético de la cepa.

## 6. CONCLUSIONES

- Se determinó que el medio de cultivo de la “Serie MTM E”, el cual contiene agua del MTM, extracto de levadura (0.05 g/L), glucosa (10 mM), solución de oligoelementos y solución de vitaminas de Balch (1 ml/L) funcionó para el aislamiento de microorganismos termófilos anaerobios lipolíticos, amilolíticos y proteolíticos de los manantiales termominerales IZA-03 y PP-11.
- Se aislaron tres cepas anaerobias, termófilas, sacarolíticas y formadoras de esporas de los manantiales termominerales IZA-03 y PP-11.
- La cepa P3-18 presentó la más alta actividad amilolítica (973.38 UA/min/L) comparada con actividades amilolíticas reportadas por microorganismos usados a nivel industrial como *Bacillus licheniformis*.
- La cepa IZA-03-2 presentó la más alta actividad lipolítica (2.06 U/min/ml) comparada con la lipasa producida por *Bacillus thermocatenulatus*, la cual es utilizada a nivel industrial.
- Ninguna de las cepas presentó actividad proteolítica significativa comparada con las actividades enzimáticas reportadas por microorganismos como *Thermus* sp. o *Bacillus stearothermophilus*
- De acuerdo a la caracterización fenotípica y genotípica de la cepa P3-18 se considera que pertenece al género *Anoxybacillus* y a la especie *Anoxybacillus flavithermus*, ya que presenta una similitud del 16S rRNA del 99% con esta especie.

- Con base en la caracterización fenotípica de la cepa IZA-03-3, y teniendo en cuenta el análisis de la secuencia del 16S rRNA, se puede considerar que esta cepa es una nueva especie del género *Caloramator*.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar en futuros estudios concentraciones de glucosa menores a las usadas en este estudio, con el fin de determinar la concentración óptima de glucosa que permita una mayor recuperación de microorganismos termófilos.
- Finalizar el análisis polifásico, así como la evaluación de la utilización de substratos y los productos formados mediante cromatografía de gases, de las cepas aisladas en este estudio con el fin de determinar su estatus taxonómico.
- Profundizar el estudio de las actividades enzimáticas presentadas por las cepas IZA-03-2 y P3-18 debido a la potencial aplicación biotecnológica que tienen.
- Profundizar en el estudio en la optimización del medio de cultivo para obtener la máxima producción de enzimas o metabolitos que pueden ser de potencial interés a nivel biotecnológico.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIN, K., MARTEINSSON, V. T., MIROSSHNICHENKO, M. L., BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. PRIEUR, D. and BIRRIEN, J.L. 2002. *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1331-1339.

ALAIN, K., PIGNET, P., ZBINDEN, M., QUILLEVERE, M., DUCHIRON, F., DONVAL, J. P., LESONGEUR, F., RAGUENES, G., CRASSOUS, P., QUERELLOU, J. and CAMBON-BONAVITA, M. A. 2002. *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from a East-Pacific Rise hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1621-1628.

ALAIN, K., QUERELLOU, J., LESONGEUR, F., PIGNET, P., CRASSOUS, P., RAGUÉNES, G., CUEFF, V. and CAMBON-BONAVITA, M.A. 2002. *Caminibacter hydrogeniphilus* gen.nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacificum Rise hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1317-1323.

ALFARO, Claudia. 2002. Geoquímica del sistema geotérmico de Paipa. Ingeominas. Bogotá D.C. Pág. 2-5.

ANDO, S., ISHIDA, H., KOSUGI, Y. and ISHIKAWA, K. 2002. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 430-433.

ANDRADE, C., PEREIRA, N. and ANTRANIKIAN, G. 1999. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiología*. 30: 287-298.

ANWAR, A. and SALEEMUDDIN. 1998. Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*. 64: 175-183.

ATLAS, R. y BARTHA, R. 1998. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Ed. Addison Wesley. España. Pág. 290-294.

ATESLIER, Z.B.B. and METIN, K. 2006. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme Microbial. Technology*. 38: 628-635.

BAENA, S., FARDEAU, M. L., WOO, T.H., OLLIVIER, B., LABAT, M. and PATEL, B.K.C. 1999. Phylogenic relationship of three amino acid utilizing anaerobes *Selemonas acidaminovorans*, *Selemonas acidaminophila* and *Eubacterium acidanophilum* as inferred from partial 16S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 259-264.

BALCH, W.E., FOX, G.E., MAGRUM, L.J., WOESE, C.R. and WOLFE, R. 1979. Methanogens: re-evaluation of a unique group. *Microbial. Rev.* 43: 260-296.

BARTSCHT, K., CYPIONKA, H and OVERMANN, J. 1999. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 249-259.

BELDUZ, A. O., DULGER, S and DEMIRBAG, Z. 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1315-1320.

BÖCKELMANN, U., MANZ, W., NEU, T. R and SZEWZYK. U. 2000. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 33: 157-170.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.

BRAVO, V., JURADO, E., MARTINEZ, J., REYES, A and GARCÍA, A. 2006. Thermal deactivation of a commercial  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. *Biochemical Engineering Journal.* 27: 299-304.

BRISBARRE, N., FARDEAU, M. L., CUEFF, V., CAYOL, J. L., BARBIER, G., CILIA, V., RAVOT, G., THOMAS, P., GARCIA, J. L. and OLLIVIER, B. 2003. *Clostridium caminithermale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1043-1049.

BURGGRAF, S., HUBER, H. and STETTER, K. O. 1997. Reclassification of the Crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 47(3): 657-660

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 zaeae* sp. nov., emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 293-302.

CAYOL, J.L., DUCERF, S., PATEL, B.K., GARCÍA, J.L., THOMAS, P. and OLLIVIER, B. 2002. *Thermohalobacter berrensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 559-564.

CAYOL, J., OLLIVIER, B., PATEL, B.K., RAVOT, G., MAGOT, M., AGERON, E., GRIMONT, P. and GARCIA, J. L. 1995. Description of *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *lactiethylicus* subsp. nov., Isolated from a Deep Subsurface French Oil Well, a Proposal To Reclassify *Thermoanaerobacter finnii* as *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finnii* comb. nov., and an Emended Description of *Thermoanaerobacter brockii*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 45(4): 783-789

CHEN, W.M., CHANG, J., CHIU, C.H., CHANG, S., CHEN, W.C. and JIANG, C.M. 2005. *Caldimonas taiwanensis* sp. nov., a amylose producing bacterium isolated from a hot spring. *Systematic and Applied Microbiology.* 28: 415-420.

CHRISOSTOMOS, S., PATEL, B.K.C., DWIVED, P.P. and DENMAN, S.E. 1996. *Caloramator indicus* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from the deep-seated nonvolcanically heated waters of an Indian artesian aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 46: 497-501.

CHUNG, A. P., RAINEY, F. A., VALENTE, M., NOBRE, M. F. and DA COSTA, M. S. 2000. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 209-217.

CONSTANTINOS, E. V. and ANTRANIKIAN, G. 2004. Extremophiles: pH, temperature, and salinity, 146-152p. In Ass Press (ed.), *Microbial diversity and bioprospecting*. Washington. D. C.

CORD-RUWISCH, R. 1985. A quick method of determination of dissolved and precipitates sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 4: 33-36.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. 1993. *Biotechnología: Manual de Microbiología Industrial*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

DE CLERCK, E., RODRIGUEZ-DIAZ, M., VANHOUTTE, T., HEYRMAN, J., LOGAN, N. A. and DE VOS, P. 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov., and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 941-946.

DEMIRJIAN, D.C., MORIS-VARAS, F. and CASSIDY, C. S. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*. 5: 144-151.

DENGER, K., WARTHMAN, R., LUDWIG, W. and SCHINK, B. 2002. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 173-178.

DIAZ, P. y POUTOU, R. A. 1998. Aislamiento de bacterias Gram negativas termófilas autóctonas de manantiales termales de Iza, Boyaca. Tesis de Pregrado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá D. C.

DULGER, S., DEMIRBAG, Z and BELDUZ, A. O. 2004. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov., and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1499-1503.

EDWARDS, C., FRY, J. C., M-GADD, C., GILMORE, D., IGLEDEW, W. J., JENNINGS, D. H. and KROLL, R. G. 1990. Microbiology of extreme environments. Primera edición. Ed. Clive Edwards. Buckingham, Great Britain. 251p.

ENGLE, M., LI, Y., RAINEY, F., DeBLOIS, S., MAI, V., REICHERT, A., MAYER, F., MESSNER, P. and WIEGEL, J. 1996. *Thermobrachium celere* gen. nov., sp. nov., a rapidly growing thermophilic, alkalitolerant, and proteolytic obligate anaerobe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46(4): 1025-1033.

FARDEAU, M.L., FAUDON, C., CAYO, J.L., MAGOT, M., PATEL, B.K.C. and OLLIVIER, B. 1996. Effect of thiosulphate as electron acceptor on glucose and xylose oxidation by *Thermoanaerobacter finnii* and *Thermoanaerobacter* sp. isolated from oil field water. *Res. Microbiol.* 147: 159-165.

FREEMAN, S.A., PEEK, K., PRESCOTT, M and DANIEL, R. 1993. Characterization of a chelator-resistant proteinase from *Thermus* strain Rt4A2. *Biochem. J.* 295: 463-469.

FRY, J. C. 2004. Culture-dependent microbiology, 80-87p. In Ass Press (ed.), *Microbial diversity and bioprospecting*. Washington. D. C.

FUJIWARA, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 94 (6): 518-525.

GARRITY, G.M., BELL, J.A. and LILBURN, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición. Ed. Springer. New York, USA.

GHORBEL-FRIKHA, B., SELLAMI-KAMOUN, A., FAKHFAKH, N., HADDAR, A., MANNI, L. and NASRI, M. 2005. Production and purification of calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 186–194.

GLAZER, Alexander. 1998. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Editorial WH Freeman and company. Estados Unidos. 249–256p.

GRANADOS, L y VALDERRAMA, J. 2003. Evaluación de la actividad proteolítica y amilolítica de actinomicetes termofílicos aislados a partir de pilas de compost. Tesis de Pregrado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. 57p.

GREENE, A.C., PATEL, B.K.C. and SHEEHY, A.J. 1997. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from petroleum reservoir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47: 505-509.

GUPTA, R., GUPTA, N. and RATHI, P. 2004. Bacterial lipases: a overview of production, purification and biochemical properties. *App. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763-781.

GUPTA, R., GUPTA, K., SEXENA, R. and KHAN, S. 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 21: 135-138.

HAKI, G and RAKSHIT, S. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresourse Technology*. 89: 17-34.

HOBEL, C., MARTEINSSON, V., HAUKSDÓTTIR, S., FRIDJÓNSSON, O., SKIRNISDÓTTIR, S., HREGGVIDSSON, G. and KRISTJÁNSSON, J. K. 2004. Use of low nutrient enrichments to access novel amylase genes in silent diversity of thermophiles. *World. J. Microbiol, Biotechnol.* 20: 801-809.

HOTTA, Y., EZAIKI, S., ATOMI, H. and IMANAKA, T. 2002. Extremely stable and versatile carboxyl esterase from a hyperthermophilic *archaeon*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3925-3931.

HOUGH, D.W. and DANSON, M.J. 1999. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3: 39-46.

HUBER, R., JANNASCH, H.W., RACHEL, R., FUCHS, T. and STETTER, K. O. 1997. *Archaeoglobus veneficus* sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, insolated from abyssal black smokers. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 374-380.

HUBER, H and STETTER, K.O. 1998. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotechnology*. 64: 39-52.

HUNGATE, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, 117-132p. In J.R. Norris and D.W. (ed), *Methods in Microbiology*. Vol. 36. Academic Press, inc. London.

INFORME COLCIENCIAS. 2005. Estudio de la diversidad microbiana en ambientes extremófilos en aguas minerales termales de Boyacá (Colombia). Fase I.

ITOH, T., SUZUKI, K., SANCHEZ, P. C. and NAKASE, T. 2003. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1149-1154.

JAEGER, K. E. and REETZ, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH.* 16: 396-403.

KEMBHAVI, A., KULKARNI, A. and PANT, A. 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM. *Applied Biochemical Biotechnology.* 38:64. 83-92p.

KEVBRIN, V., ZENGLER, K., LYSENKO, A. and WIEGEL, J. 2005. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from Geysir valley, Kamchatka. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 9: 391-398.

KIM, B., GROTE, R., LEE, D., ANTRANIKIAN G and PYUN, Y. 2001. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 °C. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1539-1548.

KIM, H., PARK, S., LEE, J. and OH, T. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 66-71.

KOZIANOWSKI, G., CANGANELLA, F., RAINEY, F. A., HIPPE, H. and ANTRANIKIAN, G. 1997. Purification and characterization of thermostable pectate-lyase from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles.* 1: 171-182.

KUMAR, G. C. and TAKAGI, M. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17: 561-594.

LARSEN, L., NIELSEN, P and AHRING, B. K. 1997. *Thermoanaerobacter mathranii* sp. nov., an ethanol-producing, extremely thermophilic anaerobic bacterium from a hot spring in Icel. *Arch. Microbiol.* 168: 114-119.

LEE, Y. E., JAIN, M., LEE, C., LOWE, S.E. and ZEIKUS, J. 1997. Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov., reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* E 100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* com. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 43: 41-51.

LEGIN, E., COPINET, A. and DUCHIRON, F. 1998. Production of thermostable amylolytic enzymes by *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotech. Lett.* 20: 363-396.

LEVÉQUE, E., JANECEK, S., HAYE, B. and BELARBI, A. 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microbial Technology*. 26: 3-14.

LOWE, S. E., JAIN, M. K. and ZEIKUS, J. G. 1993. Biology, ecology and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stress in temperature, pH, salinity or substrates. *Microbiol. Rev.* 57(2): 451-509.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. and PARKER, J. 2000. Brock Biología de los microorganismos. Novena edición. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. 1064p.

MARIN, R. 1992. Estadísticas sobre el recurso del agua en Colombia. Segunda edición. Ministerio de Agricultura. Instituto Colombiano de Hidrología, Meteorología y adecuación de tierras. Bogotá D.C. 80-85p.

MARTEINSON, V.T., HAUKSDÓTTIR, S., HOBEL, C., KRISTMANNSDÓTTIR, H., HREGGVIDSSON, G.O. and KRISTJÁNSSON, J.K. 2001. Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. 67(9): 4242-4248.

MARTEINSSON, V.T., SIGURBJORG, H. and CÉDRIC, F. 2001. Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:9. Pág. 4242-4248.

MENES, R. J. and MUXI, L. 2002. *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, emended description of the genus *Anaerobaculum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 157-164.

MIRANDA-TELLO, E., FARDEAU, M. L., THOMAS, P., RAMÍREZ, F., CASALOT, L., CAYOL, J. L., GARCÍA, J. L. and OLLIVIER, B. 2004. *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 169-174.

MIROSHNICHENKO, M., HARIDON, S.L., SCHUMANN, P., SPRING, S., BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A., JEANTHON, C. and STACKEBRANDT, E. 2004. *Caminibacter profundus* sp.nov., a novel thermophile of *Nautiliales* ord. nov. within the class “*Epsilonproteobacteria*”, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 41-45.

MOSÉ, R., CIARAMELLA, M., CANNIO, R., PISANI, F.M., MORACA, M. and BATOLUCCI, S. 2002. Extremophiles. *J. Bacteriol.* 185: 3683-3689.

OLLIVIER, B., PATEL, B.K.C., and GARCÍA, J.L. 2000. Anaerobes from extreme environments. *Journal Seckbach.* (ed). 73-90p.

PACHON, L. y 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.

PAPAPARASKEVAS, D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D and MACRIS, B.J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 14: 397-402.

PATEL, B.K.C., MONK, C. LITTLEWORTH, H., MORGAN, H.W., and DANIEL, R.M. 1987. *Clostridium fervidus* sp. nov., a new chemoorganotrophic acetogenic thermophile. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 37: 123-126.

PEDROZA, A. M. 2001. Aislamiento y caracterización de dos cepas de *Thermus* sp. con actividad amilolítica termoestable. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá.

PIKUTA, E., CLELAND, D. and TANG, J. 2003. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinensis* K1<sup>T</sup>: emended descriptions of *A. pushchinensis* and the genus *Anoxybacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1561-1562.

PIKUTA, E., LYSENKO, A., CHUVILSKAYA, N., MENDROCK, U., HIPPE, H., SUZINA, N., NIKITIN, D., OSIPOV, G. and LAURINAVICHIOUS, K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkalophilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2109-2117.

PLUGGE, C., ZOETENDAL, E. and STAMS, A. 2000. *Caloramator coolhaasii* sp. nov., a glutamate-degrading, moderately thermophilic anaerobe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1155-1162.

POLI, A., ESPOSITO, E., LAMA, L., ORLANDO, P., NICOLAUS, G., APPOLONIA, F., GAMBACORTA, A and NICOLAUS, B. 2006. *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 300-307.

POSADA, Y., PACHON, L., AGUDELO, A., ALVAREZ, E., DÍAZ, C., FARDEAU, M.L., JOULIAN C., OLLIEVIER, B. and 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.

RAVOT, G., OLLIVIER, B., MAGOT, M., PATEL, B.K.C., CROLET, J. L., FARDEAU, M. L. and GARCIA, J. L. 1995. Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5): 2053-2055.

ROH, Y., SHI, V., GUANGSHAN, L., HUANG, H. and HOU, J. 2002. Isolation and characterization of metal-reducing *Thermoanaerobacter* strains from deep subsurface environments of the Piceance Basin, Colorado. *App. Environ. Microbiol.* 68: 6013-6020.

ROUTH, J.L. 1990. Compendio esencial de química general, orgánica y bioquímica. 2ª edición. Ed. Reverte. Barcelona, España. 677-694p.

RÚA, M.L., SCHMIDT-DANNERT, C., WAHL, S., SPRAUER, A. and SCHMID, R.D. 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*. 56: 89-102.

SAKO, Y., TAKAI, K., ISHIDA, Y., UCHIDA, A. and KATAYAMA, Y. 1996. *Rhodothermus obamensis* sp. nov., a modern lineage of extremely thermophilic marine bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46(4): 1099-1104.

SCHINK, B. 2002. Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81:257-261.

SCHLEGELTI, G. 1993. General Microbiology. 7ed. Cambridge University Press, 234, 446p

SCHMID, U., GIESEL, H., SCHOBERTH, S. and SAHM, H. 1986. *Thermoanaerobacter finni* sp. nov., a new ethanologenic sporogenous bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 80-85.

SCHMIDT-DANNERT, C. S., RÚA, M. L., ATOMI, H. and SCHMID, R. D. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1301: 105-114.

SEKIGUCHI, Y., KAMAGATA, Y., NAKAMURA, K., OHASHI, A. and HARADA, H. 2000. *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic syntrophic, fatty-acid- oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 771-779.

SETYORINI, E., TAKENAKA, S., MURAKAMI, S and AOKI, K. 2006. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular protease *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70(2): 433-440.

SEYFRIED, M., LYON, D., RAINEY, F. A. and WIEGEL, J. 2002. *Caloramator viterbensis* sp. nov., a novel thermophilic, glycerol-fermenting bacterium isolated from a hot spring in Italy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1177-1184.

SHARMA, R., CHISTI, Y. and BANERJEE, U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances.* 19: 627-662.

SHARON, C., FUROGOH, S., YAMAKIDO, T., OGAWA, H. and KATO, Y. 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 304-307.

SHIMADA, Y., WATANABLE, Y., SAMUKAWA, T., SUGIHARA, A., NODA, H., FUKUDA, H. and TOMINAGA, Y. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica*. *JAACS.* 76: 789-793.

SIEVERT, S.M. and KUEVER, J. 2000. *Desulfacinum hydrothermale* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from geothermally heated sediments near Milos Island (Greece). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1239-1246.

SINGH, S and BANERJEE, U.C. 2005 Enantioselective hydrolysis of methoxyphenyl glycidic acid methyl ester [(±)-MPGM] by a thermostable and alkalostable lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Catalysis*. 36: 30-35.

SLOBODKIN, A.J., REYSENBACH, A.L., STRUTZ, N., DREIER, M. and WIEGEL. 1997. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe (III) reducing bacterium from a continental hot spring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 541-547.

SOKOLOVA, T., GONZALEZ, J. M., KOSTRIKINA, N. A., CHERNYH, N. A., TOUROVA, T. P., KATO, C., BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. and ROBB, F. T. 2001. *Carboxidobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium Okinawa Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 141-149.

SOOKKHEO, B., SINCHAIKUL, S., PHUTRAKUL, S. and CHEN, S.T. 2000. Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification*. 20: 142-157.

STAMS, A.J. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in metanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66: 271-294.

STETTER, K.O. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*. 452: 22-25.

STOHR, R., WABERSKI, A., VOLKER, H., TINDALL, B.J. and THOMM, M. 2001. *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic

hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum ' *Hydrogenobacter/Aquifex*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1853-1862.

SUNNA, A. and ANTRANIKIAN, G. 1996. Growth production of xylanolytic enzymes by the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga thermarium*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 45: 671-676.

TARLERA, S., MUXI, L., SOUBES, M and STAMS, A. 1997. *Caloramator prosteoclasticus* sp. nov., a new moderately thermophilic anaerobic proteolytic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47(3): 651-656.

VAN DEN BURG, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology.* 6: 213-218

WAGNER, M., ROGER, A.J., FLAX, J. L., BRUSSEAU, G. A. and STAHL, D.A. 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports and early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* 180: 2975-2982.

WERY, N., MORICET, J. M., CUEFF, V., JEAN, J., PIGNET, P., LESONGEUR, F., CAMBON-BONAVITA, M. A. and BARBIER, G. 2001. *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1789-1796.

WILLIAMS, R.A.D., SMITH, K.E., WELCH, S.G. and MICALLEF, J. 1996. *Thermus oshimai* sp. nov., Isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of *Thermus* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46(2): 403-408.

WISEMAN, A. 1991. Manual de Biotecnología de las Enzimas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

XUE, Y., XU, Y., LIU, Y., MA, Y. and ZHOU, P. 2001. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1335-1341.

YAMAMOTO, M., ISHII, A., NOGI, Y., INOUE, A and ITO, M. 2006. Isolation and characterization of novel denitrifying alkalithermophiles, AT-1 and AT-2. *Extremophiles*.

YUMOTO, I., HIROTA, K., KAWAHARA, T., NODASAKA, Y., OKUYAMA, H., MATSUYAMA, H., YOKOTA, Y., NAKAJIMA, K. and HOSHINO, T. 2004. *Anoxybacillus voinovskiensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a hot spring in Kamchatka. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1239-1242.

ZAVARZINA, D.G., ZHILINA, T.N., TOUROVA, T.P., KUZNETZOV, B.B., KOSTRIKINA, N.A. and BONCH-OSMOLOVSKAYA, E.A. 2000. *Thermonaerovibrio velox* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, organotrophic bacterium that reduces elemental sulfur, and emended description of the genus *Thermonaerovibrio*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1287-1295.

ZEYKUS, J.G., HEGGE, P.W. and ERSSON, M.A. 1979. *Thermoanaerobacterium brockii* gen. nov. sp. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 122: 44-48.

### ANEXO 1. Análisis de aguas de Hostelería el Balneario El Batán

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Turbiedad en SiO <sub>2</sub>	7.0 mg/L
Conductividad específica 25 °C	572 ms/cm
Bicarbonato en HCO <sub>3</sub>	310 mg/L
Cloruro en Cl	55 mg/L
Sulfatos en SO <sub>4</sub>	1.8 mg/L
Nitratos en NO <sub>3</sub>	0.08 mg/L
Hierro total en Fe	0.10 mg/L
Calcio en Ca	20 mg/L
Magnesio en Mg	4.0 mg/L
Manganeso en Mn	0.2 mg/L
Sodio en Na	105 mg/L
Potasio en K	15 mg/L
Litio en Li	0.4 mg/L
Boro en B	0.26 mg/L

*Fuente:* Alfaro, 2002

## ANEXO 2. Análisis de aguas del manantial termomineral Ojo del Diablo

PARÁMETRO	CONCENTRACIÓN
Turbiedad en SiO <sub>2</sub>	77.1 mg/L
Conductividad específica 25 °C	43200 ms/cm
Bicarbonato en HCO <sub>3</sub>	2606 mg/L
Cloruro en Cl	5103 mg/L
Sulfatos en SO <sub>4</sub>	19250 mg/L
Hierro total en Fe	0.2 mg/L
Calcio en Ca	175 mg/L
Magnesio en Mg	21.2 mg/L
Manganeso en Mn	1.6 mg/L
Sodio en Na	12375 mg/L
Potasio en K	1562 mg/L
Litio en Li	18.2 mg/L
Boro en B	5.10 mg/L

*Fuente:* Alfaro, 2002

**ANEXO 3. Composición Solución Traza I (solución stock ácida)**

<b>COMPUESTO</b>	<b>CONCENTRACION</b>	<b>CANTIDAD (por litro)</b>
HCl	50 mM	1.8 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mM	61.8 mg
MnCl <sub>2</sub>	0.5 mM	61.52 mg
FeCl <sub>2</sub>	7.5 mM	943.5 mg
CoCl <sub>2</sub>	0.5 mM	64.5 mg
NiCl <sub>2</sub>	0.1 mM	12.86 mg
ZnCl <sub>2</sub>	0.5 mM	67.7 mg

**ANEXO 4. Composición Solución Traza II (solución stock alcalina)**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>CANTIDAD (por litro)</b>
NaOH	10 mM	400 mg
NaSeO <sub>3</sub>	0.1 mM	17.3 mg
NaWO <sub>4</sub>	0.1 mM	29.4 mg
NaMoO <sub>4</sub>	0.1 mM	20.5 mg

## **ANEXO 5. TÉCNICA DEL pNPA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA**

### **Preparación de las soluciones de concentración conocidas**

A partir de una solución stock de p-nitrofenol de 10 mM, preparar concentraciones de 0.5 – 10 mM en agua destilada.

### **Elaboración de la curva de calibración**

- Tomar 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración y transferir a tubos que contienen 930  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM, pH 6.0. Incubar a la temperatura de crecimiento del microorganismo por 5 minutos.
- Adicionar de 20  $\mu\text{L}$  de la solución del sustrato (50 mM pNPA disuelto en acetona).
- Leer en espectrofotómetro a 346 nm, utilizando como blanco 20  $\mu\text{L}$  de la solución de pNPA + 930  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM, pH 6.0.
- Elaborar la curva de calibración Abs vrs. concentración y por regresión lineal obtener la ecuación de la recta y determinar m, b y  $R^2$ .

### **Determinación de la actividad lipolítica**

- Centrifugar las muestras por 20 minutos a 5000 r.p.m.. Tomar 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada muestra y transferirlo a tubos que contiene 930  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM, pH 6.0. Incubar a la temperatura de crecimiento de microorganismo por 5 minutos.

- Adicionar de 20  $\mu\text{L}$  de la solución del sustrato (50 mM pNPA disuelto en acetona).
- Leer la prueba en espectrofotómetro a 346 nm, utilizando como blanco 20  $\mu\text{L}$  de la solución de pNPA + 930  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM, pH 6.0.

### **Determinación de *p*-nitrofenol (g/L) y unidades enzimáticas**

Con los datos obtenidos en la curva de calibración aplicar la siguiente forma para determinar la concentración de *p*-nitrofenol en la muestra:

$$p\text{-nitrofenol (g/L)} = \frac{\text{Abs} - \text{intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

Una unidad lipolítica fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol (pNP) por minuto bajo las condiciones del ensayo.

## **ANEXO 6. TÉCNICA DE LA TIROSINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

### **Preparación de las soluciones de concentración conocidas**

A partir de una solución stock de tirosina de 100 mM, preparar concentraciones de 10–100 mM en agua destilada y leer en espectrofotómetro de luz U.V. a 280 nm.

### **Elaboración de la curva de calibración**

Elaborar la curva de calibración Abs vrs. concentración y por regresión lineal obtener la ecuación de la recta y determinar m, b y  $R^2$ .

### **Determinación de actividad proteolítica**

- Centrifugar la muestra por 20 minutos a 5000 rpm. Tomar 1 ml del extracto crudo de cada muestra y transferirlo a tubos que contienen 1 ml de caseína 1% p/v en buffer fosfato 0.1 M pH 7.2. Incubar a la temperatura de crecimiento del microorganismo por 60 min.
- Terminado el periodo de incubación agregar 1 ml de ácido tricloroacético 15% p/v con el fin de precipitar la caseína hidrolizada.
- Frenar la reacción sometiendo la muestra a 4°C por 5 min.
- Tomar el sobrenadante y leer en espectrofotómetro de luz U.V. a 280 nm, utilizando como blanco una solución que contiene 1 ml de ácido tricloroacético y 1 ml de buffer fosfato 0.1 M pH 7.2.

### **Determinación de la tirosina liberada (g/L) y unidades enzimáticas**

Con los datos obtenidos en la curva de calibración aplicar la siguiente forma para determinar la concentración de tirosina en la muestra:

$$\text{Tirosina (g/L)} = \frac{\text{Abs} - \text{intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

Una unidad proteolítica será definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un  $\mu\text{mol}$  de tirosina por minuto por litro.

## **ANEXO 8. CUANTIFICACION DE PROTEINAS EXTRACELULARES MEDIANTE LA TÉCNICA DE BRADFORD**

### **Reactivos**

- Ácido fosfórico 85% 100 ml
- Etanol 95 % 50 ml
- Azul de comassie G-250 100 mg
- Agua destilada 100 ml
- NaCl 0.15 M
- Agua destilada 1 litro

### **Preparación del reactivo de Bradford**

- Pesar 100 mg de azul de Coomassie G – 250 en balanza analítica y depositarlo en un frasco color ambar.
- Adicionar 50 ml de etanol al 95 % v/v y 100 ml de ácido fosfórico al 85 % v/v. Completar a un litro con agua destilada. Filtrar con papel Whatman y almacenar a 4°C.

### **Preparación de cloruro de sodio 0.15 M**

En un balón volumétrico de un litro, disolver el NaCl en 500 ml de agua destilada, homogenizar la solución y completar hasta un litro con agua.

### **Preparación de la solución concentrada de albúmina de suero bovino (BSA) 1200 $\mu\text{gml}^{-1}$**

- Pesar 120 mg de BSA en balanza analítica y disolver en 100 ml de NaCl 0.15 M, homogenizar hasta obtener un solución homogénea.

### **Preparación de las soluciones de concentración conocida 200 – 1200 $\mu\text{g/ml}$**

Empleando la fórmula de  $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$ . Se preparan 6 soluciones que tengan un volumen final de 1.2 ml.

### **Elaboración de la curva de calibración**

- Tomar 1 ml de cada concentración y agregar 5 ml de reactivo de Bradford. Proteger los tubos de luz, esperar 5 minutos y realizar las determinaciones en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 595 nm, utilizando como blanco 0.1 ml de NaCl 0.15 M + 5 ml de reactivo de Bradford.
- Elaborar la curva de calibración Abs vrs. concentración y por regresión lineal obtener la ecuación de la recta y determinar m, b y  $R^2$ .

### **Cuantificación de proteínas extracelulares**

- Centrifugar las muestras por 30 minutos a 5000 rpm y retirar el sobrenadante.
- Tomar 1 ml del sobrenadante y agregar 5 ml de reactivo de Bradford. Proteger los tubos de luz, esperar 5 minutos y realizar las determinaciones en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 595 nm, utilizando como blanco 0.1 ml de NaCl 0.15 M + 5 ml de reactivo de Bradford.

## **Determinación de proteínas extracelulares liberadas (g/L) y unidades enzimáticas**

Con los datos obtenidos en la curva de calibración aplicar la siguiente forma para determinar la concentración de proteínas extracelulares en la muestra:

$$\text{Proteínas (g/L)} = \frac{\text{Abs} - \text{intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

## **ANEXO 8. TÉCNICA DEL ACIDO 3, 5 DINITRO SALICÍLICO (DNS) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA**

### **Reactivos**

- |                               |         |
|-------------------------------|---------|
| • Acido 3,5 dinitrosalicílico | 1 g     |
| • Tartrato de sodio y potasio | 43.8 g  |
| • Glucosa anhidrida           | 2 g     |
| • Hidróxido de sodio          | 1.6 g   |
| • Agua destilada              | 1000 ml |

### **Preparación Reactivo DNS**

- Depositar en un beaker de 50 ml agua destilada para disolver el hidróxido de sodio por agitación en plancha magnética.
- Adicionar lentamente el tartrato de sodio y potasio hasta que se disuelva por completo.
- Recubrir el beaker con papel aluminio y agregar el ácido 3,5 dinitro salicílico., completar con agua destilada a 1000 ml
- Dejar en agitación toda la noche

### **Preparación de solución stock de glucosa (2 g/L)**

En un balon aforado de 1000 ml depositar 2 g de glucosa anhidrida en agua destilada, homogenizar y aforar a 1000 ml

### **Preparación de las soluciones de concentración conocidas**

Emplear la fórmula de  $C_1V_1 = C_2V_2$  para preparar soluciones de 0.5 – 2 g/L en un volumen final de 2 ml

### **Elaboración de la curva de calibración**

- Tomar 0.25 ml de cada concentración y agregar 2.5 ml de DNS. Llevar a ebullición durante 5 minutos. Adicionar 2.5 ml de agua destilada a cada tubo.
- Leer en el espectrofotómetro a 540 nm, utilizando como blanco 2.5 ml de DNS + 2.75 ml de agua destilada.
- Elaborar la curva de calibración Abs vrs. concentración y por regresión lineal obtener la ecuación de la recta y determinar m, b y  $R^2$ .

### **Determinación de la actividad amilolítica**

- Centrifugar las muestras por 20 minutos a 5000 rpm. Tomar 1 ml del extracto crudo de cada muestra y transferirlo a tubos que contienen 1 ml de almidón al 1% p/v en buffer fosfato pH 7.0. Incubar las muestras por 30 minutos a la temperatura de crecimiento del microorganismo.
- Frenar la reacción con hielo durante 5 minutos y centrifugar la muestra por 5 minutos a 5000 rpm para separar el almidón no hidrolizado.
- A partir del sobrenadante tomar 0.25 ml de cada muestra y se mezclar con 2.5 ml de DNS, llevar a ebullición durante 5 minutos, frenar la reacción con hielo durante 5 minutos, y completar con 2.5 ml de agua destilada.
- Leer en el espectrofotómetro a 540 nm, utilizando como blanco 2.5 ml de DNS + 2.75 ml de agua destilada.

### **Determinación de la glucosa liberada (g/L) y unidades enzimáticas**

Con los datos obtenidos en la curva de calibración aplicar la siguiente forma para determinar la concentración de glucosa en la muestra:

$$\text{Glucosa (g/L)} = \frac{\text{Abs} - \text{intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

Una unidad amilolítica será definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto por litro.