

CONDICIONES DE CULTIVO EN LA BIOSÍNTESIS DE LIPOPÉPTIDOS POR UNA BACTERIA MARINA

Fecha de aceptación: 02/09/2024

Tomás López Gutiérrez

Docente e Investigador de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche

Baldemar Aké Canché

Docente e Investigador de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la U.A.C.

Betty Sarabia Alcocer

Docente e Investigadora de la Facultad de Medicina de la U.A.C.

Eduardo Jahir Gutiérrez Alcántara

Docente e Investigador de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche

Román Pérez Balan

Es Docente e Investigador de la Facultad de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Campeche

Josefina Graciela Ancona León

Docente e Investigador de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche

RESUMEN: En este estudio se investigó la bacteria *Bacillus mojavensis* por su capacidad para producir lipopéptidos. La adición de 0.2 g/L de hierro al medio Luria Bertani Miller aumentó la producción de lipopéptidos iturinas, efectivos contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Se usaron diseños factoriales para evaluar cómo las variaciones en el medio afectan la diversidad y actividad de los lipopéptidos. Las condiciones de cultivo planctónico favorecieron la producción de lipopéptidos bioactivos, mientras que el cultivo sésil produjo altas concentraciones de células viables, pero menos lipopéptidos. Un diseño factorial fraccionado mostró que variables como la concentración del inóculo, temperatura, pH y agitación no afectaron significativamente la actividad antifúngica. Los extractos de cultivos planctónicos mostraron una amplia versatilidad antifúngica contra varios hongos fitopatógenos, destacando la eficacia de los lipopéptidos de *B. mojavensis*. Estos resultados subrayan la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de compuestos bioactivos.

PALABRAS CLAVE: Lipopéptidos, marino, *Bacillus mojavensis*, cultivo

INTRODUCCIÓN

En nuestro planeta, la hidrosfera marina representa más del 70% de la biosfera terrestre, siendo el origen de las primeras formas de vida. Las grandes extensiones de este hábitat permiten una alta diversidad debido a sus cambiantes condiciones fisicoquímicas como temperatura, pH, salinidad, radiación UV, presión barométrica, corrientes, regímenes de precipitación y patrones de viento. Los microorganismos marinos han desarrollado adaptaciones fisiológicas y metabólicas únicas, haciendo de ellos una fuente incomparable de diversidad química. La colonización de superficies es una adaptación ecológica universal en sistemas marinos, permitiendo a los microorganismos adherirse a superficies submareales e intertidales formando biopelículas. Estas adaptaciones resultan en la producción de metabolitos secundarios como antibióticos, antioxidantes y biosurfactantes. Los biosurfactantes, con estructuras diversas, tienen aplicaciones biotecnológicas e industriales por su compatibilidad ambiental, biodegradabilidad y baja toxicidad. *Bacillus* spp. destacan por producir biosurfactantes lipopéptidos como surfactina, iturina y fengicina, con actividad antimicrobiana. *B. mojavensis* produce un lipopéptido con fuerte actividad antifúngica. Las condiciones de cultivo influyen en la producción de estos metabolitos secundarios.

METODOLOGÍA

Síntesis de lipopéptidos en condiciones planctónicas y sésiles

Se realizó el cultivo de la cepa de la bacteria de *Bacillus mojavensis* utilizando las condiciones de cultivo planctónico y sésiles. En ambos casos se utilizó un precultivo en condiciones planctónica.

Parámetros Cinéticos de *Bacillus mojavensis* en Condiciones de Cultivo Planctónicas

Se realizó la cinética de crecimiento y extracción del biosurfactante de *Bacillus mojavensis* durante 96 h en caldo Luria Bertani Miller, con sales marinas, L-tirosina y sulfato de hierro II. L-tirosina se preparó en solución concentrada de 0.2 g/150 mL de agua destilada, esterilizada en autoclave. Sulfato de hierro II se preparó en solución concentrada de 0.1 g/100 mL de agua destilada, esterilizada mediante filtración.

Precultivo de *Bacillus mojavensis*

Se inocularon 100 μ L de *Bacillus mojavensis* en 10 mL de CLBMGA-Fe, incubando a 140 rpm y 25 °C por 48 h. El precultivo se ajustó a una densidad óptica (DO) de 3 a 520 nm.

Cultivo planctónico de *Bacillus mojavensis*

Diez mililitros del precultivo se agregaron a 90 mL de CLBMGA-Tyr-Fe en matraces de 500 mL (18 matraces). Se evaluaron la DO (520 nm), UFC/mL de células vegetativas y esporas, biomasa, pH del sobrenadante y cantidad de lipopéptido cada 12 h durante 96 h.

Cultivo sésil de *Bacillus mojavensis*

El aditamento que resultó crucial para la mayor producción y actividad del o los lipopéptidos en el cultivo planctónico fue el FeSO_4 , por lo tanto, se usó el medio CLBM-Fe para la cinética de crecimiento sésil de *Bacillus mojavensis*, mediante el sistema de fermentación de Roller Bottle.

Para realizar este sistema de fermentación, se depositaron 35 mL de agar Luria Bertani Miller en botellas de cultivo de vidrio con capacidad para 250 mL. Después, se esterilizaron las botellas y se giraron manualmente sobre hielo para que el agar recubriera toda la superficie interna de cada botella. Las botellas fueron incubadas durante 48 h con luz constante a 28° C y después de transcurrido este tiempo, se agregó a cada botella 1 mL del precultivo de 48 h de *B. mojavensis*, cultivado en CLBM-Fe, y ajustado a una DO520nm de 3. El precultivo agregado, se extendió sobre toda la superficie y las botellas se incubaron durante 48 h, en el sistema rotatorio horizontal Benchtop roller mini, a 2 rpm para la formación de la biopelícula. Después de la formación estable de la biopelícula, se agregaron 40 mL del CLBM-Fe por botella y se prosigo con la incubación a las mismas condiciones a 4 rpm (Yan et al., 2002).

Determinaciones Analíticas de los cultivos planctónicos y sésiles

Densidad Óptica (DO): Se midió la DO a 520 nm con diluciones 1:10 del cultivo. Las mediciones se realizaron por triplicado.

UFC/mL Viables Totales: Se realizaron diluciones seriadas en solución salina (0.85%), se depositaron 500 μL en placas con agar LBMGA, incubando a 28 °C por 24 h.

UFC/mL de Esporas: Se realizaron diluciones seriadas, incubadas a 80 °C por 15 min, se depositaron 500 μL en placas con agar LBMGA, incubando a 28 °C por 24 h. El número de células vegetativas se calculó restando UFC/mL de esporas de UFC/mL viables totales.

pH: Se midió en sobrenadantes filtrados mediante un pHmetro.

Extracción del Lipopéptido de los cultivos planctónicos y sésiles

El extracto crudo del lipopéptido se obtuvo precipitando el sobrenadante libre de células a pH 2 con HCl, agitando a 5 °C durante la noche. El precipitado se re-suspendió en agua basificada, congeló y liofilizó. El liofilizado se pesó y el rendimiento del extracto crudo se reportó en g/100 mL de medio.

Evaluación de la Actividad Biológica de los cultivos planctónicos y sésiles

Se evaluó la actividad biológica del biosurfactante mediante ensayos de actividad hemolítica y antifúngica.

RESULTADOS

Cultivo Planctónico

Los suplementos que se evaluaron fueron la Sal marina (Gal Aquarium), el aminoácido L-tirosina y el hierro en forma de FeSO₄. El diseño factorial de dos niveles, fue utilizado para evaluar las múltiples variables independientes y detectar las variables significativas en un solo diseño. En el cuadro 8 se representan en las columnas las distintas variables que fueron evaluadas, y en cada fila a los diferentes experimentos que se llevaron a cabo. Cada variable se examinó a dos niveles: un nivel alto (+) y un nivel bajo (-) (Tobias, 2003). Dos experimentos más se realizaron y se consideraron como controles de los experimentos. Se realizaron en total 3 réplicas para el diseño factorial de dos niveles (Figura 1).

Experimentos	Patrón	Variables		
		L-tirosina	Sal Gal Aquarium	Sulfato de hierro
1	---	-	-	-
2	+--	+	-	-
3	-+-	-	+	-
4	++-	+	+	-
5	--+	-	-	+
6	+++	+	-	+
7	-++	-	+	+
8	+++	+	+	+
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Figura 1. Diseño factorial de dos niveles

Con la finalidad de determinar el tiempo en el cual se produce la mayor cantidad y actividad antifúngica del lipopéptido; usando el medio de LBM suplementado con Tyr y Fe, se realizó el seguimiento del crecimiento de *B. mojavensis* MC3B-22 durante 4 días, mediante mediciones cada 12 horas de DO520nm, UFC de células vegetativas, UFC de esporas, biomasa seca, pH del sobrenadante libre de células y la extracción del extracto crudo del lipopéptido

El análisis de los resultados correspondientes a los parámetros cinéticos de las (UFC) tanto de células vegetativas como de esporas, determinó que la cinética tiene un comportamiento de primer orden, donde se observan las cuatro etapas características de un cultivo microbiano discontinuo o “batch” (Figura 2). Durante el tiempo monitoreado, el crecimiento de *B. mojavensis* en el medio CLBM-tyr-Fe presentó una fase corta de adaptación (Fase lag) de solo 12 h, que era un dato esperado, ya que el pre-inóculo utilizado se realizó con el CLBM-Fe. A partir de las 24 horas se observa la fase exponencial; y a las 60 h se obtuvo el valor de duplicación bacteriana más alto (3.5×10^{11} UFC/mL). Los valores encontrados superaron en dos órdenes de magnitud la concentración de células viables de la misma bacteria marina reportadas por Mier (2013), con una concentración máxima de 1.8×10^9 UFC/mL de células viables de la misma bacteria marina en CLBM pero sin agregar Fe y Tyr.

Determinación de la actividad biológica del biosurfactante

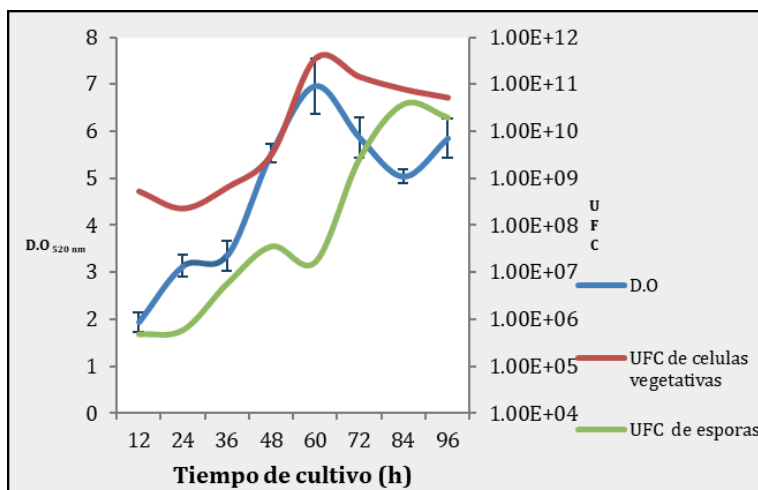


Figura 2. Cultivo planctónico de la bacteria *Bacillus mojavensis*

Se determinó la actividad hemolítica y antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* ATCC 42374 del lipopéptido extraído durante la cinética de *Bacillus mojavensis*, los datos muestran que a las 72 h se obtiene la mayor actividad antifúngica (Figura 4). El seguimiento de la actividad antifúngica fue el parámetro determinante, para establecer el tiempo óptimo de expresión del lipopéptido al utilizar el medio de cultivo CLBM con 0.1 g/L de tirosina y 0.2 g/L de sulfato de hierro. Estos suplementos agregados al medio CLBM lograron aumentar la actividad hemolítica y antifúngica con una disminución en el tiempo de máxima expresión en comparación a las 84 h de cultivo de *Bacillus mojavensis* en el CLBM solo con sales marinas (Durán, 2010; López, 2012).

Tiempo (h)	Actividad antifúngica diámetro (mm)
12	11.5 ± 0.70
24	16.0 ± 2.83
36	16.0 ± 0.00
48	18.0 ± 2.83
60	16.0 ± 0.00
72	19.5 ± 3.54
84	14.5 ± 0.70
96	15.5 ± 0.70

Figura 3. Datos de la actividad antifúngica del extracto de *Bacillus mojavensis* en cultivo planctónico



Figura 4. Actividad antifúngica del extracto de *Bacillus mojavensis* en cultivo planctónico

Cultivo sésil

Una característica interesante de la cinética de crecimiento del cultivo sésil de *B. mojavensis*, es que no presentó la fase de declinación, característica de las cinéticas de crecimiento. Estos resultados indican que los nutrientes siempre estuvieron disponibles en las fases líquida (CLBM+ Fe) y sólida (Agar Luria Bertani Miller) del medio de cultivo. Posiblemente, la cepa *B. mojavensis* en condiciones séviles, no requiere altas concentraciones de nutrientes en contraste a los requeridos en los cultivos planctónicos.

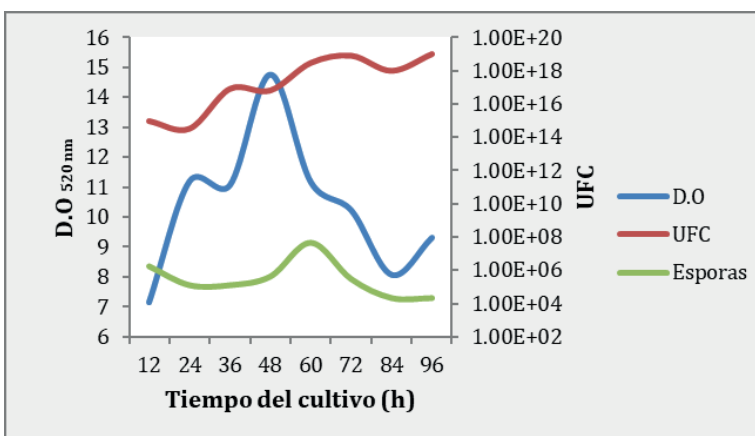


Figura 5. Cultivo planctónico de la bacteria *Bacillus mojavensis*

Determinación de la actividad biológica del lipopéptido del cultivo sésil

Se determinó la actividad hemolítica y antifúngica del biosurfactante extraído de la cinética de crecimiento de *B. mojavensis* contra *C. gloeosporioides* ATCC 42374 (Figura 6 y 7). Sin embargo, ninguno de los extractos presentó actividad la actividad antifúngica (12 mm) disminuyó drásticamente en comparación de los extractos de los cultivos planctónicos (22 mm). Aunque la producción de metabolitos secundarios depende de estímulos externos de competencia, infección y limitación de nutrientes, Yan y colaboradores (2003) determinaron que la producción del antibiótico bacitracina mediante el cultivo sésil de *B. licheniformis* fue independiente de la esporulación (Yan et al., 2003). Por lo tanto, la actividad del biosurfactante de *B. mojavensis*, obtenido mediante el cultivo sésil, contra otros microorganismos no queda descartada.

Tiempo de cultivo (h)	Rendimiento del biosurfactante (g/L)	Actividad antifúngica (mm)
12	0.122	12
24	0.115	13
36	0.187	11
48	0.167	11
60	0.125	10
72	0.135	11
84	0.187	11
96	0.250	12

Figura 6. Datos de la actividad antifúngica del extracto de *Bacillus mojavensis* en cultivo sésil



Figura 7. Actividad antifúngica del cultivo sésil de lipopéptido de *Bacillus mojavensis*.

CONCLUSIONES

El tiempo óptimo de cultivo de *B. mojavensis* en CLBM con tirosina y hierro, bajo condiciones planctónicas, para la producción de lipopéptidos fue de 72 h. La producción de UFC/mL de células vegetativas fue de 1.4×10^{11} y las esporas fue de 2.69×10^9

La actividad antifúngica del lipopéptido producido por *B. mojavensis* en el medio de cultivo CLBM con tirosina y hierro fue a las 72 horas de 19.5 ± 3.54 mm de diámetro de inhibición.

El sulfato de hierro (0.2 g/L), fue el aditamento que presentó el mayor efecto sobre la producción por *B. mojavensis* en CLBM, de lipopéptidos activos contra *C. gloeosporioides* ATCC 42374, en comparación con la tirosina y la Sal Gal Aquarium ya que se detectaron las mayores o, mejores actividades antifúngica (21 ± 1 mm) evaluadas a una concentración del 1%. Este aditamento promovió la producción de lipopéptidos de *B. mojavensis* pertenecientes a las familias de las iturinas y en pequeñas cantidades a la de las surfactinas con un efecto positivo sobre la actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*. 1×10^{11} y las UFC/mL de esporas fue de 2.69×10^9 .

El cultivo sésil de *B. mojavensi* mediante el sistema de roller bottle produjo una concentración de células viable/mL de 9.5×10^{18} y tan solo 4.4×10^7 de esporas/mL. El biosurfactante lipopeptídico producido no presentó actividad hemolítica y su actividad antifúngica fue muy baja (12 mm de diámetro).

REFERENCIAS

De la Rosa Escalante ER (2013) Actividad antagónica de *Bacillus mojavensis* (MC3B-22) y *Paenibacillus* sp. (TS3B-45), para el control biológico de la antracnosis en mango y papaya. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Campeche, 71.

Durán-Reyes D (2010) Evaluación y caracterización de un biosurfactante producido por *Bacillus mojavensis* con actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Campeche. pp. 73.

López Gutiérrez TJ (2012) Aislamiento biodirigido de un biosurfactante producido por la bacteria marina *Bacillus mojavensis* con actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Sacc var. *Minor Simmonds*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Campeche.

Perfumo A, Smyth TJP, Marchant R, Banat IM (2010) Production and roles of a biosurfactant and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates En: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Timmis KN, (Ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Northern Ireland, UK, pp: 1502-12.

Yan L, Boyd KG, Burgess JG (2002) Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Marine Biotechnology*, 4: 356-66.

Yan L, Boyd KG, Adams DR, Burgess JG (2003) Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in *Bacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 7: 3719-27.