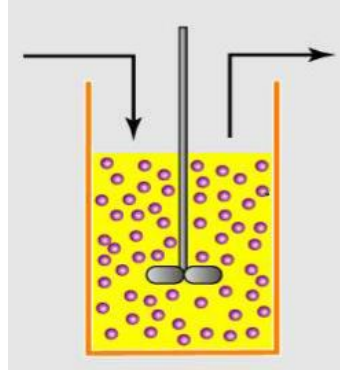


INFORME FINAL



Cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953
en un biorreactor
de 2.5 litros bajo el sistema “batch”.

M.Sc Silvana Alvarenga Venutolo.
M.Sc Olga Rivas Solano

Escuela de Biología.
Centro de Investigación en Biotecnología (CIB)
Junio 2012.

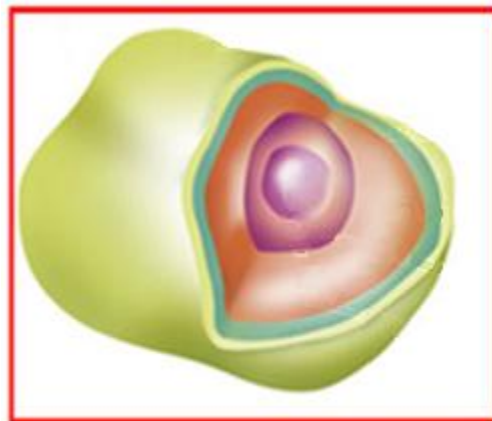


TABLA DE CONTENIDO

DOCUMENTO I.....	2
CUADRO DE AVANCE EN EL LOGRO DE OBJETIVOS Y ACTIVIDADES.....	2
RECONOCIMIENTO.....	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	6
DEFINICION DEL PROBLEMA.....	7
OBJETIVOS.....	7
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	15
RECOMENDACIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	21
DOCUMENTO II.....	24

DOCUMENTO I.

Nombre del proyecto o actividad:

Cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 en un biorreactor de 2.5 litros bajo el sistema "batch".

Departamento Académico responsable:

Escuela de Biología. Centro de Investigación en Biotecnología (CIB). ITCR

Investigador(a) responsable:

M.Sc Silvana Alvarenga Venutolo.

Otros investigadores:

MSc. Olga Rivas Solano

Período cubierto:

Enero de 2011 a junio de 2012.

I. Grado de avance

CUADRO DE AVANCE EN EL LOGRO DE OBJETIVOS Y ACTIVIDADES

Objetivo general					
Establecer el cultivo de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> en un biorreactor de 2.5 litros con el fin de obtener grandes cantidades de esporas termorresistentes con potencial para ser usadas como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.					
Objetivo específico	Actividades	Productos esperados	Fecha propuesta de cumplimiento	% avance	Comentarios
1. Establecer las condiciones de crecimiento de <i>G. stearothermophilus</i> para su cultivo en medio líquido a escala de erlenmeyer.	1a. Adquirir y propagar la cepa	1a. Cepa bacteriana disponible y establecida.	Enero a marzo 2011	100%	En el primer trimestre del desarrollo de la actividad, se presentaron retrasos en dar contenido presupuestario a la actividad para la compra de la cepa bacteriana. Posteriormente, cuando se dispuso de presupuesto y se procedió a realizar la compra de la cepa, hubo retrasos en el proceso de compra por parte del Depto de Aprovechamiento Problemática y trámites ajenos al control de las investigadoras.
	1b. Establecer una colección de reserva y una colección de trabajo	1b. Colección de reserva y colección de trabajo.	Marzo 2011	100%	
	1c. Escalar el cultivo en erlenmeyer hasta un volumen de aproximadamente 300 ml de medio de cultivo.	1c. Protocolo para el cultivo de la cepa a escala de erlenmeyer	Marzo 2011	100%	

Objetivo específico	Actividades	Productos esperados	Fecha propuesta * real** de cumplimiento	% avance	Comentarios
2. Desarrollar el escalamiento desde el erlemeyer hasta un biorreactor de 2.5 litros para obtener mayores cantidades de la cepa de interés.	2a. Poner en marcha el biorreactor.	2a. Protocolo para el cultivo de la cepa en un biorreactor de 2.5 litros.	Junio 2011 * Mayo 2012**	100%	El atraso en la llegada de la cepa de la bacteria incidió en el retraso del cronograma general planteado en el proyecto, en el escalamiento del cultivo a biorreactor, que debió realizar de junio a agosto, de 2011, se realizó en los primeros meses de 2012. Se presentaron fallos en el funcionamiento del rotámetro de aire del biorreactor y hubo que solicitar uno nuevo a la casa matriz en Suiza. Se cuenta con un rotámetro nuevo. Todos los objetivos propuestos se lograron. Se dio el escalamiento de cultivo en erlemeyer hasta un biorreactor de 2.5 litros con lo que se incrementó la biomasa de la cepa de interés. Se estableció la termorresistencia de las esporas de <i>G. stearothermophilus</i> cultivadas en el biorreactor y se determinó su potencial como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.
	2b. Escalar el cultivo de la cepa en el biorreactor.	2b. Parámetros de operación del biorreactor determinados.	Junio–Agosto 2011* Marzo-mayo 2012**	100%	
	2c. Monitorizar parámetros de operación.	2c. Cinética de crecimiento de la cepa en el biorreactor establecida.	Setiembre-noviembre 2011* Marzo-mayo 2012**	100%	
	2d. Monitorizar variables de crecimiento		Setiembre-nov. 2011 * Abril-mayo 2012**	100%	
3. Establecer la termorresistencia de las esporas de <i>G. stearothermophilus</i> cultivadas en el biorreactor para determinar su potencial como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.	3a. Inducir la esporulación del cultivo.	3a. Esporulación del cultivo inducida.	Octubre-nov. 2011* Abril-mayo 2012**	100%	Se dio el escalamiento de cultivo en erlemeyer hasta un biorreactor de 2.5 litros con lo que se incrementó la biomasa de la cepa de interés. Se estableció la termorresistencia de las esporas de <i>G. stearothermophilus</i> cultivadas en el biorreactor y se determinó su potencial como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.
	3b. Obtener y cuantificar las esporas.	3b. Esporas obtenidas y cuantificadas	Noviembre 2011* Mayo 2012**	100%	
	3c. Determinar su termorresistencia.	3c. Termorresistencia determinada	Noviembre 2011* Mayo 2012 **	100%	
	3d. Redactar el informe final.	3d. Informe final redactado.	Diciembre 2011* Junio 2012**	100%	

Cumplimiento del plan de difusión

En el marco del proyecto de investigación, se elaboró el siguiente artículo científico: Faith, M., Rivas, O. 2012. Obtención de endosporas termorresistentes de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 a partir de cultivo en un biorreactor; el cual se encuentra en preparación y cuyos resultados se divulgarán a través de la revista Tecnología en Marcha.

RECONOCIMIENTO

Se desea agradecer el trabajo realizado por la egresada Natalia Molina, quien colaboró como asistente de investigación y contribuyó a lograr el cumplimiento del objetivo de establecer las condiciones de crecimiento de *G. stearothermophilus* para su cultivo en medio líquido a escala de erlenmeyer.

Además, se desea reconocer el trabajo realizado por la Licda. Margie Faith Vargas, quien obtuvo su grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, con el proyecto de tesis: OBTENCIÓN DE ENDOSPORAS TERMORRESISTENTES DE *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* ATCC 7953 A PARTIR DE CULTIVO EN UN BIORREACTOR R'ALF (3.7 L), realizado en el marco de esta actividad de investigación. Con su trabajo de graduación colaboró en el cumplimiento de los objetivos de escalamiento desde el erlemeyer hasta un biorreactor de 2.5 litros para obtener mayores cantidades de la cepa de interés y el establecimiento de la termorresistencia de las esporas de *G. stearothermo-phillus* cultivadas en el biorreactor para determinar su potencial como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo

RESUMEN

El uso de indicadores biológicos proporciona un medio para examinar directamente la muerte de microorganismos, lo que permite asegurar la calidad y validar procesos de esterilización. El indicador biológico más utilizado contiene endosporas bacterianas de *Geobacillus stearothermophilus*. En este estudio se cultivó la cepa *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 en medio líquido bajo el sistema de fermentación en lote, para obtener endosporas termorresistentes con potencial para ser utilizadas como indicador biológico. La bacteria se cultivó en caldo nutritivo, al cual se le agregó una solución de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para inducir la esporulación. Cuando se observó más del 85 % de esporulación, se cosechó el cultivo del biorreactor. El tiempo de duplicación experimental de la bacteria fue de 14,05 minutos. Se obtuvo una concentración de esporas de $1,4 \times 10^7$ esporas/ml y un tiempo de reducción decimal de 0,73 minutos (valor $D_{121^\circ\text{C}}$). A pesar de que las esporas presentaron baja termorresistencia, se considera que la concentración obtenida es suficiente para preparar un indicador biológico. Para aumentar la termorresistencia y garantizar la germinación de las esporas, se debe optimizar la composición de los medios de cultivo.

PALABRAS CLAVE: *Geobacillus stearothermophilus*, endospora, termorresistencia, indicador biológico, biorreactor, fermentación.

ABSTRACT

The use of biological indicators provides a mean to directly examine microorganisms' death, which allows the quality assurance and validation in sterilization processes. The biological indicator most commonly used contains bacterial endospores from *Geobacillus stearothermophilus*. On this study, the *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 strain was cultivated in liquid medium under a batch system, to obtain heat-resistant endospores with potential use as biological indicator. The bacteria were cultivated in nutrient broth and a $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solution was added to induce the sporulation. When more than 85 % sporulation was observed, the culture was harvested from the biofermenter. The bacteria's experimental doubling time was 14.05 minutes. A concentration of 1.4×10^7 spores/ml and a 0.73 minutes decimal reduction time (D value) were obtained. Despite the fact that the spores showed low heat-resistance, the concentration obtained is considered to be enough to prepare a biological indicator. To increase the heat-resistance and assure the spore germination, the composition of the media cultures must be optimized.

KEY WORDS: *Geobacillus stearothermophilus*, endospore, heat-resistance, bioindicator, biofermenter, fermentation.

INTRODUCCIÓN

La esterilización es el proceso físico o químico, que destruye o elimina todas las formas de vida, especialmente microorganismos. Este término es absoluto, por ejemplo una sustancia no puede estar parcialmente estéril (Albert *et al.*, 1998).

Los efectos de la exposición de un microorganismo a temperaturas superiores a su temperatura máxima de crecimiento repercuten progresivamente sobre la viabilidad, ocasionando la desnaturalización e inactivación de proteínas y enzimas esenciales, así como el colapso de la membrana citoplasmática y la lisis térmica. En este punto los microorganismos pierden la capacidad de crecimiento y división celular, aún cuando se transfieran a un medio idóneo (Iáñez, 2005).

Sin embargo, algunas bacterias como por ejemplo, las de los géneros *Geobacillus*, *Bacillus* y *Clostridium*, entre otros, tienen la capacidad de producir, a lo largo de su ciclo de vida, estructuras especiales de reposo o latencia, denominadas endosporas, las cuales, se caracterizan por presentar inactividad metabólica, así como una elevada resistencia al calor e inclusive a compuestos químicos agresivos (Iáñez, 2006).

El descubrimiento de las endosporas bacterianas tuvo una gran trascendencia para la microbiología, porque el conocimiento de la existencia de estas estructuras, fue decisivo para desarrollar procedimientos de esterilización. La endospora bacteriana es única en cuanto a su grado de termorresistencia, también es resistente a otros agentes como la desecación, la radiación, los ácidos y desinfectantes químicos, y pueden permanecer en estado de latencia durante periodos de tiempo muy largos (Madigan *et al.*, 2004). Debido a la resistencia innata de las esporas a condiciones ambientales extremas, éstas han sido utilizadas para evaluar la eficiencia de los procesos de esterilización térmica (Knecht *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

Se ha reportado que la exposición a temperaturas entre 60 y 80°C durante cinco a diez minutos destruye las células vegetativas de bacterias y hongos; las temperaturas por encima de 80°C destruyen las esporas de levaduras y hongos; y la exposición a 120°C durante 15 minutos elimina las endosporas bacterianas. Estas últimas son altamente tolerantes a varias condiciones ambientales, son ubicuas y están distribuidas por el aire. Por esta razón, para destruirlas el proceso de esterilización por calor húmedo (autoclave) se realiza a 121°C durante 15 a 20 minutos. En el caso de la esterilización por calor seco, se requieren mayores tiempos de exposición y temperatura, por ejemplo, el vidrio y otros equipos se deben esterilizar por 2 horas a una temperatura entre 160 y 180°C (Casanova, 2012).

El efecto de la humedad reduce la temperatura requerida para desnaturalizar o coagular proteínas. En la esterilización por calor seco, los microorganismos se deshidratan antes de que la temperatura aumente lo suficiente para causar la desnaturalización de proteínas. Por lo tanto, el calor seco es un proceso oxidativo con diferente cinética que la esterilización por calor húmedo (Penna *et al.*, 2002).

La esterilización por calor húmedo se realiza a 121°C o a temperaturas mayores y suele ser el tratamiento de esterilización más comúnmente usado, ya que destruye todas las formas de vida, incluyendo las esporas bacterianas (Watanabe *et al.*, 2003). En la práctica, se debe asegurar que los productos e instrumentos han sido esterilizados adecuadamente. El método más efectivo para esto es el monitoreo biológico. Los indicadores biológicos (IB) funcionan introduciendo esporas de una bacteria altamente resistente en el ciclo de esterilización, si estas esporas son destruidas, se asume que los microorganismos contaminantes en la carga también han sido destruidos (Albert *et al.*, 1998).

En un ciclo típico de esterilización por calor húmedo, los primeros 10 minutos corresponden a la entrada de vapor y al aumento de la presión interna de la autoclave, lo cual permite alcanzar y mantener una temperatura constante de 121 °C. Para lograr la destrucción de todos los microorganismos contaminantes y sus esporas, los materiales deben permanecer dentro de la autoclave un tiempo mínimo que depende de la naturaleza y el volumen del material a esterilizar (Quesnel, 1987).

El uso de indicadores biológicos proporciona un medio para examinar directamente la muerte de los microorganismos en el proceso de esterilización. Por lo tanto, la determinación de la resistencia del IB contra el método de esterilización, es un parámetro muy importante para la evaluación de la efectividad del proceso y el equipo (Sasaki *et al.*, 2000).

DEFINICION DEL PROBLEMA

En microbiología, el descubrimiento de las endosporas bacterianas tuvo importancia ya que el alto grado de resistencia a agentes agresivos que presentan estas estructuras fue decisivo para el desarrollo de métodos de esterilización, entre ellos el método del calor húmedo, conocido también como autoclavado, el cual es ampliamente utilizado a nivel mundial para la esterilización de medios de cultivo, instrumentos y cristalería, tanto en laboratorios de investigación como en centros de salud (Madigan *et al.*, 1998).

Existen varias formas de controlar la calidad de los procesos de esterilización por calor húmedo, entre las cuales destaca el uso de indicadores biológicos a base de esporas termorresistentes. La mayoría de los indicadores comerciales disponibles en el mercado están constituidos por suspensiones de esporas de *Geobacillus*

En Costa Rica no se ha implementado la producción de indicadores biológicos a nivel comercial, sino que éstos se deben importar de otros países, lo que encarece los costos de los programas de control de calidad de procesos de esterilización por calor húmedo (Monge, 2011).

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica cuenta con un biorreactor autoclavable de mesa marca *Bioengineering*, modelo R'ALF, con capacidad de 3.7 litros de volumen total y 2.5 litros de volumen de trabajo, por lo que se cultivó la cepa *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 en medio líquido bajo el sistema de fermentación en lote, con el fin de obtener endosporas termorresistentes con potencial para ser utilizadas como indicador biológico en el control de calidad de procesos de esterilización con calor húmedo. Esto hará factible producir un indicador biológico en el país, con lo que se podrían ahorrar costos a nivel institucional e incluso generar ganancias, si posteriormente se llegara a comercializar el producto.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer el cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* en un biorreactor de 2.5 litros con el fin de obtener grandes cantidades de esporas termorresistentes con potencial para ser usadas como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.

Objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones de crecimiento de *G. stearothermophilus* para su cultivo en medio líquido a escala de erlenmeyer.
2. Desarrollar el escalamiento desde el erlemeyer hasta un biorreactor de 2.5 litros para obtener mayores cantidades de la cepa de interés.
3. Establecer la termorresistencia de las esporas de *G. stearothermophilus* cultivadas en el biorreactor para determinar su potencial como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Endosporas bacterianas

Una característica de las bacterias termofílicas y termofílicas extremas es su habilidad de sobrevivir en ambientes que se consideran extremos desde un punto de vista antropocéntrico. Los mecanismos de sobrevivencia de estos organismos resultan en parte de una adaptación adecuada de sus componentes. Las enzimas derivadas de estos organismos son de particular interés biotecnológico debido a su estabilidad excepcional (Christodoulou y Vorgias, 2002; Bonch-Osmolovskaya, 2004; Schallmey *et al.*, 2004).

Las esporas bacterianas constituyen uno de estos mecanismos, ya que algunas bacterias tienen la habilidad de formar esporas en ambientes donde los nutrientes se han agotado durante la fase estacionaria de crecimiento (Knecht *et al.*, 2011). Sin embargo, el inicio de la esporulación puede ser activado por múltiples señales ambientales, como falta de nutrientes y altas densidades celulares, lo que causa que una subpoblación específica de células tenga que cambiar a un elaborado programa genético que resulta en la formación de esporas. Las características bajo las cuales se da la esporulación determinan las características de la spora, como resistencia al calor y propiedades de germinación (Sella *et al.*, 2009).

La endospora, debe su nombre al hecho de formarse dentro de la célula, ésta se observa en el microscopio óptico como cuerpos refringentes. Las endosporas son muy impermeables a los colorantes, por lo que a veces se ven como regiones sin tñir dentro de las células que han sido teñidas con colorantes básicos (Madigan *et al.*, 2004). Por esta razón, para teñir las esporas se utilizan métodos específicos de tinción. En el método descrito por Schaeffer y Fulton (verde de malaquita al 5 % y safranina al 0,5 %) se debe aplicar calor para permitir que el colorante ingrese a las esporas y de esta forma poder visualizarlas en el microscopio (Rivas, 2011; Martínez *et al.*, 2010).

Esporulación y estructura de la endospora

El proceso de formación de endosporas se denomina esporulación, y supone una serie de procesos de diferenciación celular. La esporulación bacteriana no se produce durante el crecimiento exponencial, sino únicamente al cesar el crecimiento como consecuencia de la limitación de un nutriente esencial, como la fuente de carbono o nitrógeno. Se ha demostrado que hay alrededor de 200 genes implicados en el proceso. La esporulación requiere el cese de la síntesis de algunas proteínas funcionales en la célula vegetativa y la síntesis de nuevas proteínas específicas. Esto se lleva a cabo mediante la activación de diversos genes como *spo* y *ssp* (que codifica las SASPs) en respuesta a estímulos ambientales que inducen la esporulación. Las proteínas codificadas por estos genes catalizan los cambios que conducen a la formación de una endospora (Madigan *et al.*, 2004).

Las endosporas son formadas por algunas bacterias para protegerse de condiciones ambientales adversas, por tanto la esporulación es un proceso que resulta en la protección del ADN dentro de una cubierta dura y seca.

Aunque las esporas de diferentes bacterias tienen estructura similar, ellas difieren en forma y tamaño, y son específicas del organismo del cual se desarrollaron. Las esporas pueden sobrevivir por años en este estado de latencia, existen reportes de hasta 25 millones de años. Cuando la bacteria se encuentra en su forma esporulada, sólo algunas de sus funciones biológicas se encuentran activas, la bacteria posteriormente saldrá de su forma esporulada y se volverá activa (forma vegetativa) cuando se presenten las condiciones adecuadas. La "germinación" es el proceso mediante el cual las esporas bacterianas latentes reanudan su metabolismo y crecimiento; este proceso es provocado por la presencia de nutrientes, incluyendo aminoácidos, azúcares y nucleósidos (Dlugokenski *et al.*, 2011). Una vez que la bacteria es vegetativa, se vuelve mucho más fácil de eliminar (Knecht *et al.*, 2011; Ames y Clement, 2007).

En general, las endosporas se caracterizan por un bajo contenido de agua, no tienen un metabolismo detectable, y carecen de compuestos de alta energía como ATP y otros nucleósidos trifosfatos. Además, son altamente resistentes a la desecación, congelación, radiación y a la acción de ciertas sustancias químicas (Microbiología, 2011; Coleman *et al.*, 2007).

La formación de una endospora bacteriana en un bacilo Gram positivo, consta de varias etapas, las cuales se presentan de manera esquematizada en la Figura 1.

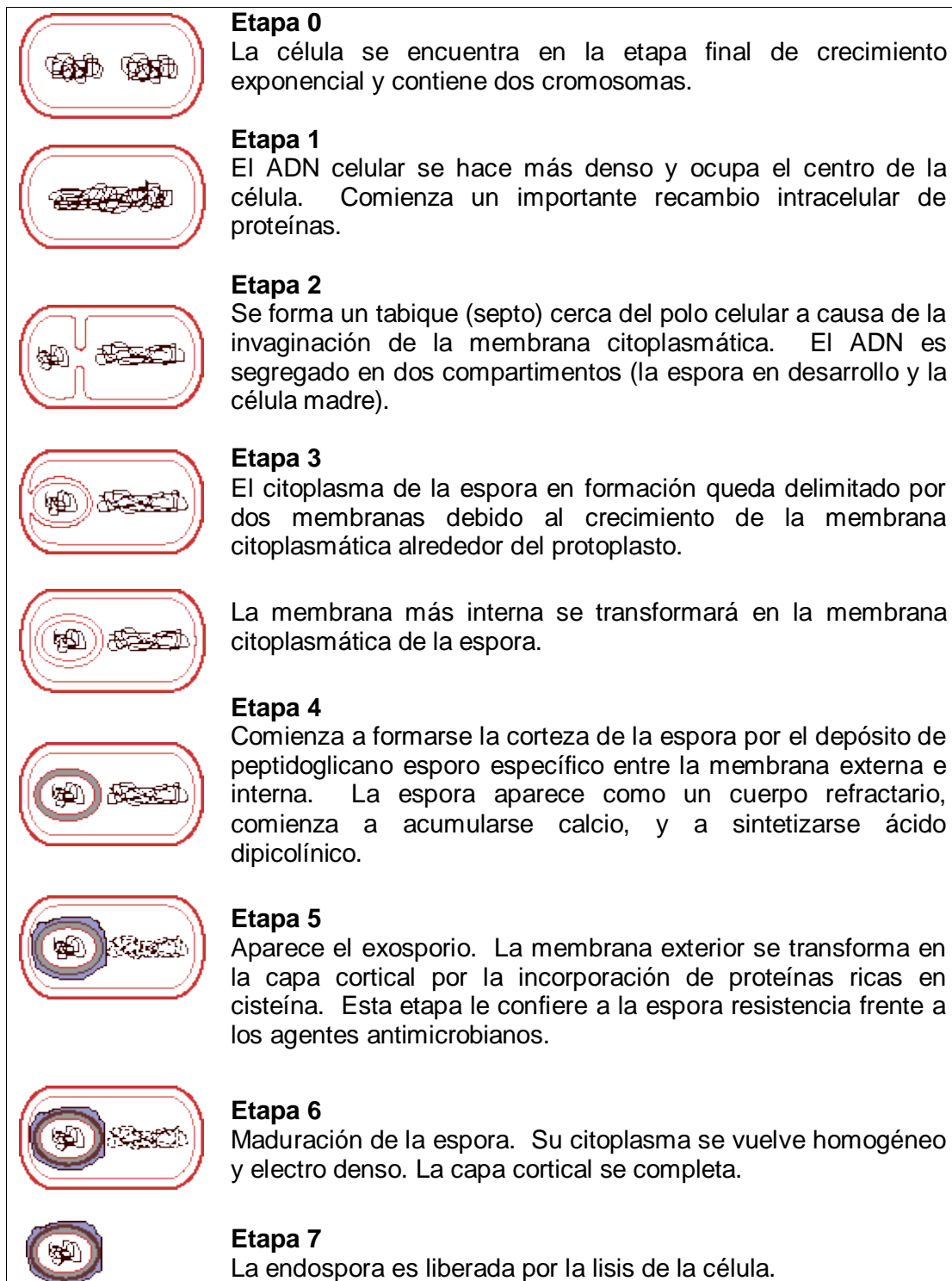


Figura 1. Formación de una endospora en un bacilo Gram positivo (Microbiología, 2011).

La estructura de la espora es muy diferente de la célula vegetativa. Como se observa en la Figura 2 es mucho más compleja y presenta muchas capas superficiales. La cubierta se compone de varias capas de proteínas específicas de la espora (multicapa proteica), que comprende la capa interna y externa. Por debajo de la cubierta se localiza la corteza, que es una capa gruesa de peptidoglicano modificado que rodea la pre-espora (sección de células madre que está involucrada con la esporulación después de la replicación del ADN y división desigual de la célula madre).

Internamente, y por debajo de la corteza, se encuentra el núcleo o protoplasto de la espora, que contiene pared celular normal (similar a la célula vegetativa), membrana citoplasmática, citoplasma, nucleóide, etc. Por tanto, en esencia, la endospora se diferencia de la célula vegetativa en el tipo de estructuras situadas fuera de la pared del núcleo de la espora (Madigan *et al.*, 2004; Knecht *et al.*, 2011). En el Anexo 1 se muestra un resumen de las principales características de las endosporas en comparación con a las células vegetativas.

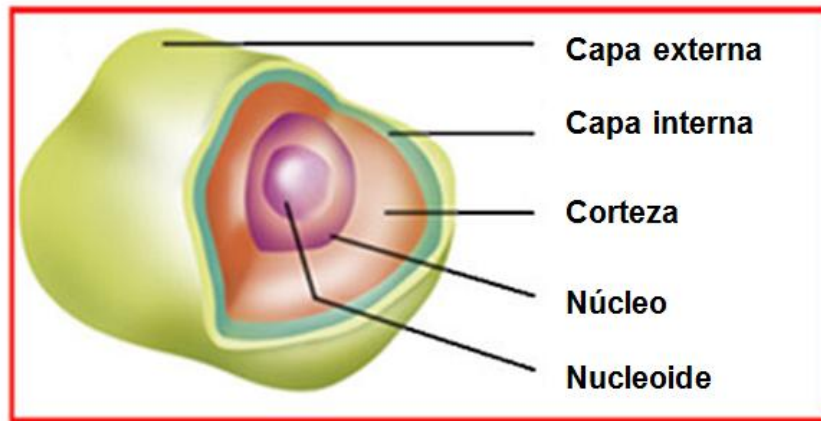


Figura 2. Estructura de la endospora bacteriana (Tomado de PKnecht *et al.*, 2011).

En el núcleo se encuentra el ADN protegido por un complejo de pequeñas proteínas ácido-solubles, que constituyen más del 20% de la composición proteica de la espora. Estas pequeñas proteínas ácido-solubles, junto con las múltiples capas de la espora, protegen las esporas de los daños ambientales, mejoran su estabilidad a temperaturas, pH y humedad extremas, y les permite no ser afectadas por radiaciones UV y gamma, así como por la presencia de químicos tóxicos (Knecht *et al.*, 2011).

Clostridium y algunas especies de *Bacillus* tienen un exosporio, una capa externa adicional compuesta por proteínas, lípidos y carbohidratos. El exosporio, sirve como sitio para los antígenos de superficie de la espora que podrían ayudar a proteger la espora de macrófagos. A pesar del estado de latencia de la espora, las proteínas receptoras en la superficie de la misma, son sensibles a pequeñas cantidades de nutrientes en el ambiente y tras la unión de estas sustancias, pueden desencadenar el proceso de germinación, que lleva a las células vegetativas a un estado metabólicamente activo (Knecht *et al.*, 2011).

Resistencia de las endosporas

A pesar del intenso estudio durante varias décadas, la razón precisa de por qué las esporas bacterianas son tan resistentes al calor, todavía no está del todo definida. Sin embargo la resistencia de las esporas al calor se ha asociado con la deshidratación de protoplastos, mineralización, y adaptación térmica (Jay *et al.*, 2005).

Un compuesto químico característico de las endosporas, ausente en las células vegetativas, es el ácido dipicolínico. Este compuesto se ha encontrado en todas las endosporas examinadas y se localiza en el núcleo de las mismas. Las esporas son también muy ricas en iones calcio, que en gran parte se combinan con el ácido dipicolínico, formando complejos de dipicolinato cálcico que suponen aproximadamente el 10 % del peso seco de la endospora (Madigan *et al.*, 2004).

Los niveles altos de iones divalentes, especialmente Ca^{2+} , presentes en el núcleo de la espora, podrían relacionarse con la resistencia de la espora al calor húmedo (Nicholson *et al.*, 2000). Por su parte, el compuesto ácido dipicolínico, exclusivo de las esporas bacterianas, se creía que era el responsable de la resistencia térmica como un complejo de calcio-dipicolinato, sin embargo se ha encontrado que la resistencia al calor es independiente de este complejo, y su papel en la resistencia al calor no está claro aún (Jay *et al.*, 2005).

Las esporas bacterianas no presentan actividad enzimática, pero han desarrollado distintas estrategias que evitan la acumulación de daños potencialmente letales en su ADN durante el estado de latencia. A continuación, se mencionan algunas de ellas.

El núcleo de una endospora madura se presenta en un estado parcialmente deshidratado y contiene sólo el 10 - 30 % del agua de la célula vegetativa, por lo que la consistencia del citoplasma se corresponde con la de un gel denso. La deshidratación aumenta mucho la termoresistencia de la endospora, al mismo tiempo le confiere resistencia frente a sustancias químicas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y hace que las enzimas estén inactivadas (Madigan *et al.*, 2004). La resistencia al calor, parece estar asociada con la corteza contráctil que reduce el contenido de agua en el protoplasto, o lo mantiene en un estado de deshidratación (Jay *et al.*, 2005).

Existe evidencia de que el contenido de agua en el núcleo está inversamente relacionado con la resistencia de la espora al calor húmedo (Nicholson *et al.*, 2000). El bajo contenido de agua retarda o altera las reacciones químicas que afectan al ADN, ya que este menor contenido de agua disminuye la tasa de depurinización y la fotoquímica del ADN frente a radiaciones UV respecto a las de una célula vegetativa; la radiación UV no genera dímeros de timina en el ADN de una espora sino un producto denominado SP (*spore photoproduct*) que es un compuesto similar a una timinil-timina (Microbiología, 2011).

Un aumento en la mineralización del núcleo de la espora también está asociado con una mayor resistencia a agentes oxidantes y, al menos en esporas de *G. stearothermophilus*, con una mayor resistencia al calor seco. No se conocen todas las razones de los efectos del contenido mineral del núcleo de la espora, sin embargo, un aumento en la mineralización es a menudo relacionado con una disminución del contenido de agua del mismo, y esto puede contribuir a un incremento en la resistencia al calor húmedo (Nicholson *et al.*, 2000).

Además del bajo contenido de agua, el pH del citoplasma de la endospora es aproximadamente una unidad menor que el de la célula vegetativa, y contiene niveles elevados de proteínas específicas denominadas pequeñas proteínas ácido-solubles alfa/beta-SASP (*small acid-soluble proteins*). Estas proteínas se forman durante el proceso de esporulación y tienen al menos dos funciones. Por un lado, se unen fuertemente al ADN y lo protegen de la lesión potencial de las radiaciones ultravioleta, la desecación y el calor seco, ya que disminuyen el daño térmico del ADN evitando la depurinización y cambian la reactividad fotoquímica de éste frente a radiaciones UV formando los SP. Por otro lado, las SASPs pueden servir como fuente de carbono y energía para el desarrollo de una nueva célula vegetativa a partir de la endospora (Madigan *et al.*, 2004; Jay *et al.*, 2005). Estas proteínas se hallan altamente conservadas en los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, son sintetizadas únicamente durante la esporulación y son degradadas al inicio de la germinación (Nicholson *et al.*, 2000).

Las capas de la espora tienen un papel importante en su resistencia, especialmente en prevenir el acceso de enzimas péptido glicolíticas a la corteza de la espora, y también en la resistencia a algunos químicos como el peróxido de hidrógeno. El núcleo de la espora exhibe relativamente baja permeabilidad a las moléculas hidrofóbicas. Debido a que la espora tiene dos membranas, alguna o ambas pueden ser la barrera de permeabilidad que restringe la entrada al núcleo de la espora. Aunque no está claro si la membrana externa se encuentra intacta en la espora madura latente, algunos datos concuerdan en que es una membrana funcional. Por su parte, la membrana interna es una membrana intacta, tiene reducida permeabilidad y se encuentra significativamente comprimida en la espora latente (Nicholson *et al.*, 2000).

Germinación de las endosporas

Una endospora es capaz de permanecer en estado de latencia durante muchos años, pero también puede dar lugar a una célula vegetativa de un modo relativamente rápido. Este proceso ocurre en tres pasos: activación, germinación y crecimiento. La activación se realiza fácilmente por el calentamiento de las endosporas recién formadas, durante varios minutos a una temperatura sub-letal pero elevada. Las endosporas activadas quedan así condicionadas a germinar cuando se colocan en presencia de los nutrientes adecuados (Madigan *et al.*, 2004). El procedimiento de laboratorio para la germinación de esporas termorresistentes como *G. stearothermophilus* se realiza con la técnica del choque térmico, que consiste en un tratamiento a una temperatura entre 80 y 110 °C por 10 - 30 minutos, seguido de un enfriamiento rápido (Fraiha *et al.*, 2010). De acuerdo con Madigan *et al.* (2004), las características de las tres fases secuenciales de germinación de una espora son:

Activación:

Proceso reversible que condiciona a la espora para germinar en un ambiente adecuado. Involucra la desnaturalización reversible de algunas proteínas. El ADN alterado durante la latencia es reparado en los primeros momentos de la germinación.

Germinación:

Proceso irreversible en el que participan enzimas que contiene la espora, normalmente es un proceso rápido que ocurre en cuestión de minutos y supone la pérdida de las características de la espora, como la refringencia, un aumento en la capacidad de tinción por colorantes, y la pérdida de la resistencia al calor y a sustancias químicas. En esta fase se produce la desaparición del dipicolinato cálcico y de los componentes de la corteza, y se degradan las SASPs.

Crecimiento:

Hay una alta actividad biosintética, se caracteriza por un hinchamiento visible de la célula debido a una acumulación de agua y por síntesis *de novo* de ARN, proteínas y ADN. Finalmente, la célula emerge una vez rota la cubierta de la endospora y se divide, se desarrolla la pared celular y se forma la célula vegetativa, la cual continúa en crecimiento vegetativo hasta que nuevamente detecta señales ambientales que ponen en marcha la esporulación.

Evaluación de termo resistencia

La resistencia de las células vegetativas al calor respecto a las endosporas bacterianas del mismo microorganismo varía considerablemente. Por ejemplo, en autoclave (a 121°C las endosporas pueden necesitar de unos 4 a 5 minutos para una reducción decimal, mientras que las células vegetativas pueden requerir sólo de unos 0,1 a 0,5 minutos a 65°C. Por tanto, los procesos para la esterilización eficaz por calor se diseñan para destruir las endosporas (Madigan *et al.*, 2004).

G. stearothermophilus ha sido evaluado por varios autores como un microorganismo extremadamente resistente a la presión. Si se compara la resistencia a la presión de *G. stearothermophilus* con otros bacilos, el orden de resistencia es el siguiente: *G. stearothermophilus* > *B. coagulans* > *B. subtilis* > *B. cereus* > *B. polymyxa* > *B. megaterium*. La estructura y espesor de la cubierta bacteriana de la spora contribuye a esta resistencia a la presión, por lo tanto, las esporas de *G. stearothermophilus* pueden dañarse con la presión y temperatura, así como el medio en el que se encuentran suspendidas las esporas (Estrada-Girón *et al.*, 2007).

La inactivación de esporas de *G. stearothermophilus* se puede evaluar como un modelo de cinética de primer orden, de acuerdo a Estrada-Girón *et al.* (2007), este se puede definir como:

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -kt$$

Donde:

N_t es el número de sobrevivientes en cualquier momento (UFC/ml),

N_0 es el conteo inicial de microorganismos (UFC/ml),

k es la constante de la tasa de inactivación (1/min),

t es el tiempo (min).

La muerte por inactivación es una función exponencial y ocurre más rápidamente conforme aumenta la temperatura (Madigan *et al.*, 2004). La tasa de inactivación (tasa de muerte) depende no sólo del tipo de especie, sino también de la forma fisiológica de la célula. Por ejemplo, el valor de k para las esporas bacterianas a 121 °C es del orden de 1 min^{-1} , mientras que los de las células vegetativas varían de 10 hasta 10¹⁰ min^{-1} dependiendo del organismo (Dutta, 2008).

La ecuación anterior muestra la disminución exponencial de la población celular. La dependencia de la temperatura de la tasa específica de inactivación (k) se puede asumir siguiendo la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right)$$

Donde E_d es la energía de activación, que se puede obtener de la pendiente de $\ln(k)$ versus el gráfico $1/T$. Por ejemplo, la energía de activación para *E. coli* es 127 kcal/g mol y la de *G. stearothermophilus* es 68,7 kcal/g mol (Dutta, 2008).

Las bacterias se mueren por el calor a una tasa de orden logarítmico de muerte, lo que significa que a una temperatura constante, el mismo porcentaje de bacterias se morirá en un intervalo de tiempo determinado. El número de bacterias no afectará la relación tiempo-temperatura-destrucción. El valor que describe esto se conoce como valor D y se define como el tiempo requerido a una temperatura específica para destruir el 90 % de una población microbiana. Cada reducción del 90 % se puede describir como una reducción de un "ciclo *log*". El tiempo de calentamiento a una temperatura constante

se determina de acuerdo a cuántos de estos “ciclos log” se desea reducir la población de bacterias (Vieira, 1996; Head *et al.*, 2008).

Para calcular el valor D, se utiliza la ecuación:

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

Donde t es el tiempo de calentamiento en minutos; a es el número inicial de microorganismos (UFC/ml); y b es el número de microorganismos sobrevivientes al tiempo de calentamiento t (Rivas, 2002; Fraiha *et al.*, 2010).

La tasa de reducción decimal D , indica por tanto, el tiempo requerido para reducir el número de esporas en un 90 % (Estrada-Girón *et al.*, 2007). Este valor es numéricamente igual al número de minutos requeridos por la curva de supervivencia para atravesar un ciclo *log*. Matemáticamente, es igual al recíproco de la pendiente de la curva de supervivencia y es una medida de la tasa de muerte de un organismo (Jay *et al.*, 2005). En la Figura 3 se muestra una curva típica de supervivencia, así como el valor D.

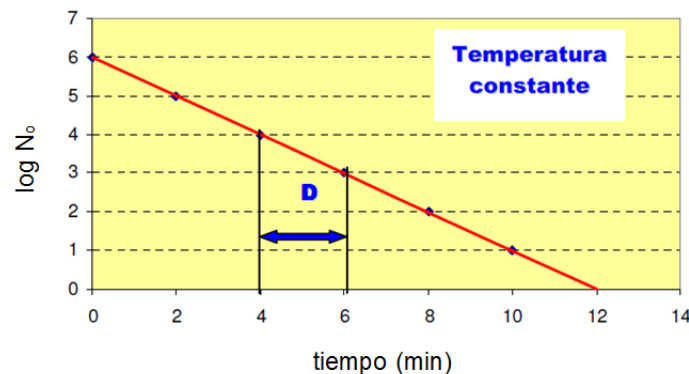


Figura 3. Curva de supervivencia y valor D (tiempo de reducción decimal) (Sella, 2008).

En el crecimiento termófilo, la fase *lag* es corta y algunas veces difícil de medir. Las esporas germinan y crecen rápidamente, la fase de crecimiento logarítmico es de corta duración. En algunos termófilos se han reportado tiempos de generación tan cortos como 10 minutos al crecer en altas temperaturas (Jay *et al.*, 2005). Específicamente, el tiempo de duplicación de la bacteria *G. stearothermophilus*, ha sido reportado por varios autores en 11 minutos (Unisa, 2011; Lee, 2006).

Para que la spora se pueda destruir, entonces, el esterilizante debe entrar en contacto con las esporas, una vez que el agente esterilizante hace contacto, la spora morirá con una tasa predecible de muerte (valor D). La tasa depende del tiempo requerido para que el esterilizante alcance las esporas de un indicador particular (Ames y Clement, 2007). El uso de indicadores biológicos provee un medio para examinar directamente la muerte de los microorganismos en el proceso de esterilización, por lo tanto, la determinación de la resistencia del IB al método de

esterilización (valor D) es un parámetro muy importante para la evaluación de la efectividad del proceso de esterilización y el equipo (Sasaki *et al.*, 2000).

Indicadores Biológicos

El principio básico de los indicadores biológicos consiste en obtener poblaciones estandarizadas de esporas que tienen una alta resistencia al proceso de esterilización. La sobrevivencia o destrucción de dichas esporas indicará la eficacia del procedimiento en el ciclo de esterilización (Dlugokenski *et al.*, 2011).

El indicador biológico más utilizado contiene endosporas de *G. stearothermophilus*. Esta bacteria es productora de esporas no patogénica; cuando se encuentra en su forma esporulada, es capaz de resistir las altas temperaturas de la esterilización por calor húmedo, y al compararla con especies patogénicas, sobrevive mucho más tiempo. Además, su cinética de inactivación es consistente. El mismo microorganismo se utiliza para monitorear la esterilización con gas de plasma, la esterilización con ozono y la esterilización química líquida con ácido peracético (Ames y Clement, 2007; Head *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 1998).

La cepa de *G. stearothermophilus* ATCC 7953 presenta colonias circulares, con bordes bien definidos, de color crema y de superficie lisa. Los bacilos son facultativos aeróbicos, Gram positivos y presentan una espora ovoide con ubicación sub-terminal dentro de las células. Sus células vegetativas presentan crecimiento masivo a 57 °C, y posterior producción de esporas (Parra-Pérez y Acosta-Gío, 1999; Ren *et al.*, 2010; Fraiha *et al.*, 2010).

El segundo organismo más utilizado es *Bacillus atrophaeus*, anteriormente llamado *Bacillus subtilis* var. *niger*. Este microorganismo es resistente a los métodos de esterilización con óxido de etileno y calor seco. Tanto *G. stearothermophilus* como *B. atrophaeus*, son utilizados en su forma de endosporas (Ames y Clement, 2007).

La presentación original de los indicadores biológicos, de primera generación, consistían en suspensiones de esporas inoculadas en tiras de papel empacadas dentro de sobres, que luego eran transferidas a medio de cultivo estéril, seguido de un proceso de incubación por 7 días. Las fallas en el proceso de esterilización se medían por determinación de la turbidez en el medio de crecimiento. Los indicadores biológicos de segunda generación son sistemas que contienen la tira con esporas y el medio de crecimiento requerido para la recuperación, en una ampolla o envase listo para usarse. Estos indicadores se basan en un indicador de pH para medir la producción de metabolitos ácidos en el medio de cultivo por parte de las esporas que lograron sobrevivir. De esta forma se elimina el problema de contaminación por manipulación (falsos positivos). Sin embargo, este sistema aún presenta la desventaja de que requiere un periodo de 24 a 168 horas de incubación para detectar la sobrevivencia de esporas (Albert *et al.*, 1998; Penna *et al.*, 2002).

Debido a la necesidad de obtener resultados de manera rápida, se desarrolló una tercera generación de indicadores biológicos para ser utilizada en ciclos de esterilización por vapor con gravedad a 121°C y esterilización con vapor asistida por vacío a 132°C. Este tipo de indicadores tiene un sistema de lectura doble, la parte rápida detecta la espora activa asociada a la enzima α -glucosidasa que sobrevivió el proceso de esterilización en una a tres horas (Albert *et al.*, 1998). La actividad de la enzima se ha correlacionado con la habilidad de la espora para crecer y replicarse (Ames y Clement, 2007). La enzima es un constituyente normal de las células vegetativas y endosporas de *G. stearothermophilus*. El segundo sistema de lectura involucra un indicador de pH que detecta los metabolitos ácidos producidos por

esporas sobrevivientes y confirma el resultado rápido en 24 a 168 horas (Albert *et al.*, 1998). Este sistema también se conoce como “enzimático” (Sella, 2008).

La función del indicador biológico es para establecer, evaluar y monitorear los parámetros físicos de un ciclo de esterilización de cierto equipo; para calificar el nivel de esterilidad alcanzado, y documentar la eficiencia del proceso. Existen regulaciones que recomiendan el uso rutinario de indicadores biológicos (IB) para monitorear un ciclo de esterilización, por lo menos semanalmente, con repeticiones cada vez que un equipo se somete a mantenimiento preventivo o correctivo para revalidar procesos previamente documentados (Dlugokenski *et al.*, 2011; Penna *et al.*, 2002).

Como no se puede garantizar un nivel de esterilidad absoluta, se considera que la esterilidad es un concepto probabilístico (Sella, 2008). Los indicadores biológicos permiten validar el proceso de esterilización, esta validación se hace para demostrar que la probabilidad de que un producto esté contaminado es extremadamente baja. Esto se expresa como el nivel de aseguramiento de la esterilidad (*Sterility Assurance Level* – SAL) y es el equivalente a la muerte de 10^{12} esporas. Por eso, al nivel de aseguramiento de esterilidad se le llama SAL 12. Los indicadores biológicos típicamente tienen entre 10^5 y 10^6 esporas, lo que significa que un indicador biológico típico muere en la mitad del tiempo requerido para alcanzar este nivel (Ames y Clement, 2007).

Por tanto, los indicadores biológicos son una herramienta importante para ayudar en las prácticas requeridas para asegurar la reproducibilidad de procesos de manufactura de productos estériles. Estos se colocan fácilmente en posiciones estratégicas para verificar la homogeneidad de la distribución del calor húmedo en una cámara de autoclave y en una unidad de carga. Las principales ventajas de su uso son su bajo costo, tamaño pequeño y la facilidad de manipulación (Penna *et al.*, 2002).

Es importante hacer una completa evaluación del indicador biológico antes de colocarlo para su uso, incluyendo el conteo de esporas viables por unidad (población del indicador biológico) y las características de resistencia requeridas (tiempo de reducción decimal, y tiempos de sobrevivencia/muerte) de acuerdo a las condiciones de esterilización, para confirmar la información que aparece en la etiqueta (Penna *et al.*, 2002).

La obtención de esporas termorresistentes para uso como indicador biológico para esterilización no es un proceso de fácil estandarización y reproducibilidad. Según Sella (2008), la bacteria necesita, para su esporulación y formación de esporas resistentes al calor, del control de muchas variables como:

- Nutrientes que constituyen el medio de esporulación
- Tiempo y temperatura de la esporulación
- Características del inóculo
- Material de soporte o empaque
- Medio de recuperación

Cultivo en biorreactor

Escalamiento y cultivo en biorreactor

La bacteria *G. stearothermophilus* anteriormente estaba clasificada dentro del género *Bacillus*; las especies de este género son ampliamente utilizadas en fermentaciones microbianas, y han sido los principales microorganismos utilizados en fermentaciones industriales en microbiología aplicada. Además, se conoce mucho sobre la bioquímica, fisiología, y genética de *B. subtilis* y otras especies, lo que facilita un

mayor desarrollo y aprovechamiento de estos organismos en procesos industriales (Schallmey *et al.*, 2004).

Para el escalamiento, el cultivo de células se coloca en caldo líquido, primero en tubos de ensayo y luego en erlenmeyers conteniendo aproximadamente 200 ml del medio. La proliferación del cultivo se da al agitar los frascos durante la noche a temperatura constante y posteriormente se preparan mayores cantidades de inóculo, dependiendo del volumen del fermentador. Luego de la inoculación, el proceso debe iniciar de inmediato y la reacción procede rápidamente (Ulber, 2011).

Las fermentaciones se llevan a cabo como cultivos puros donde solamente las cepas seleccionadas pueden crecer, ya que si existen microorganismos extraños en el medio o el equipo, se tiene que competir con los contaminantes por los nutrientes. Además, estos microorganismos extraños podrían generar productos dañinos que pueden limitar el crecimiento. Por esa razón, antes de comenzar una fermentación, el medio y todo el equipo deben ser completamente esterilizados. Además, las condiciones asépticas se deben mantener durante toda la fermentación. La esterilización por calor es el método más utilizado, ya que permite esterilizar tanto el medio líquido, como los objetos sólidos y demás implementos del biorreactor (Dutta, 2008).

Los reactores apropiados en biotecnología deben cumplir los requisitos para la agitación, aireación, resistencia a la corrosión, y operación aséptica (Ulber, 2011). En el diseño e interpretación del desempeño del reactor, intervienen factores físicos y biológicos. Los físicos incluyen parámetros como el flujo del líquido, el tiempo de circulación, la eficiencia de distribución de aire y el volumen retenido de gas, las tasas de transferencia de masa de oxígeno, la intensidad del mezclado y los efectos de corte. Estos se ven afectados por la geometría del biorreactor y del agitador, y por efectos de las propiedades físicas como la viscosidad en el líquido y la tensión superficial. Los factores biológicos implican la tasa de crecimiento celular, productividad celular y tasa de consumo de sustrato (Wang y Zhong, 2007).

Sistema de fermentación en lote

En general, los diferentes tipos de biorreactores se pueden clasificar de acuerdo al modo de funcionamiento en lote (*batch*), semi-continuo (*fed-batch*) o continuo. A pesar de que muchos parámetros favorecen el proceso de operación continuo, en biotecnología, el proceso en lote todavía es el más utilizado, este consiste en la carga, inoculación, procesamiento, cosecha y limpieza del recipiente. Las ventajas son su adaptabilidad a horas de trabajo semanales y pérdidas menores en caso de contaminación (Ulber, 2011).

Durante el periodo de crecimiento celular, ningún material adicional es añadido o removido del biorreactor, aparte de ajustes menores para controlar el pH o la espuma, pequeñas adiciones de precursores esenciales, toma de muestras, y por supuesto, el suministro continuo de aire necesario para la fermentación aeróbica. Debido a que no hay flujo hacia dentro o hacia afuera en el biorreactor, durante el funcionamiento normal, las curvas de sustrato y biomasa se comportan de acuerdo a la Figura 4.

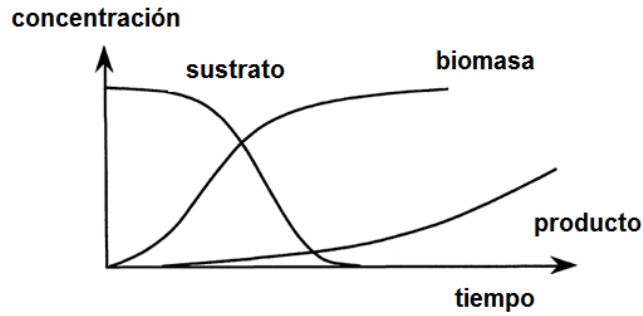


Figura 4. Perfiles de la concentración y el tiempo durante la operación de fermentación en lote (Tomado de Dunn *et al.*, 2003).

Al analizar la cinética básica de crecimiento de una fermentación en lote, se puede observar experimentalmente que la cantidad de biomasa, y por lo tanto también la concentración, aumenta exponencialmente con respecto al tiempo. Como se observa en la Figura 5, después de un periodo de adaptación celular (fase *lag*), se presenta una región de crecimiento exponencial, posteriormente hay una región donde el crecimiento es limitado por la falta de una sustancia particular (sustrato limitante) y finalmente, las células comienzan a morir, debido a la falta de nutrientes, efectos tóxicos o envejecimiento.

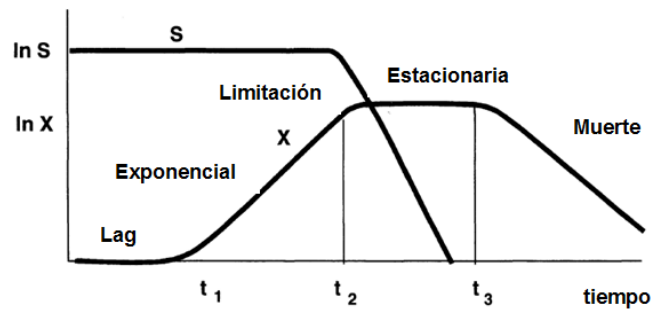


Figura 5. Concentración de biomasa y sustrato durante el crecimiento en lote (Tomado de Dunn *et al.*, 2003).

Condiciones y parámetros de operación

Es necesario determinar las condiciones en las que los organismos se desarrollan mejor para favorecer las funciones deseadas de las células; los principales factores a considerar son la temperatura, el pH, el ambiente gaseoso y el mezclado (Wang y Zhong, 2007).

La tasa de crecimiento microbiano es dependiente de la temperatura debido a que la actividad microbiana y el crecimiento son manifestaciones de la actividad enzimática, y las tasas de reacciones enzimáticas aumentan con temperaturas mayores. En el caso de los microorganismos termófilos, su temperatura para el crecimiento óptimo debe ser mayor a 50 °C (Wang y Zhong, 2007).

La actividad metabólica de las células genera una cantidad sustancial de calor en los fermentadores, el cual debe removerse para evitar incrementos en la temperatura. En los biorreactores se utiliza una chaqueta externa o espiral por la que circula vapor o agua de enfriamiento para el intercambio de calor (Doran, 1995).

Al igual que la temperatura, el pH también tiene un papel importante que determina la habilidad de las bacterias de crecer o desarrollarse en ambientes particulares. Para la mayoría de bacterias, el pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.5 (Dutta, 2008).

La mayoría de los biorreactores están equipados con electrodos de pH. En una fermentación bacteriana, el pH se controla dentro del biorreactor con la adición de una solución de ácido o base, según sea necesario. La cantidad de ácido o base normalmente se puede agregar sin afectar el proceso de fermentación. Muchos microorganismos producen ácidos como productos metabólicos, por lo que es importante controlar esta variable durante la fermentación (Nielsen *et al.*, 2003).

En cuanto a los gases, el oxígeno y el dióxido de carbono, son los principales en el cultivo de bacterias. Todos los microorganismos aeróbicos requieren de oxígeno como aceptor de electrones para la generación de energía. En estos sistemas sólo el oxígeno disuelto es utilizado por las bacterias, su solubilidad en agua es muy baja (6.2 ml/l a presión atmosférica y 20 °C), por lo tanto, el oxígeno debe suministrarse continuamente a la suspensión celular del cultivo. La densidad celular final y la producción de microorganismos dependen de la tasa de transferencia de oxígeno (Ulber, 2011).

La tasa a la que el oxígeno es consumido por las células en los fermentadores determina la tasa a la que se debe transferir del gas al líquido. Son muchos los factores que influyen en la demanda de oxígeno; los más importantes son la especie celular, la fase de crecimiento del cultivo, y la naturaleza de la fuente de carbono en el medio. En un cultivo en lote, la tasa de consumo de oxígeno varía con el tiempo debido a que la concentración de células aumenta durante la fermentación y la tasa de consumo de oxígeno total es proporcional al número de células presentes. Además, la tasa de consumo de oxígeno por célula (tasa de consumo de oxígeno específica) también varía. Típicamente, la demanda específica de oxígeno tiene su máximo al comienzo de la fase exponencial (Doran, 1995).

Para comprender la difusión molecular en líquidos, se debe tener en cuenta que cuando la concentración de un componente varía de un punto a otro, el componente tiene la tendencia de fluir en la dirección que reducirá las diferencias locales en la concentración. La transferencia de masa gas-líquido es muy importante en los bioprocesos debido al requerimiento de oxígeno en las fermentaciones aeróbicas (Treybal, 1988).

La fase gaseosa es dispersada como burbujas de gas en la fase líquida. La transferencia de masa se da a través de la interfase gas-líquido, desde el gas hasta el líquido, donde ocurre la reacción. Según Dutta (2008), la ruta de transferencia de masa de un sustrato gaseoso de una burbuja de gas a una organela de un microorganismo puede dividirse en varios pasos, como se observa en la Figura 6; adicionalmente, la agitación y aireación mejoran la tasa de transferencia de masa en este proceso.

El coeficiente de $k_L a$, se encuentra relacionado con la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al medio de cultivo. Usando el método dinámico, se puede estimar el valor de $k_L a$ para la transferencia de oxígeno en un proceso de fermentación. Este método se basa en el balance de oxígeno de los materiales en un fermentador en lote aireado mientras los microorganismos están creciendo (Dutta, 2008).

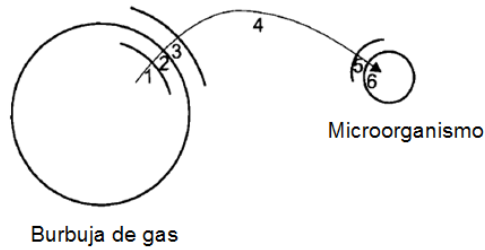


Figura 6. Diagrama esquemático de la ruta de transferencia de masa de un sustrato gaseoso a un microorganismo (Tomado de Dutta, 2008).

Inicialmente, el fermentador contiene las células en un cultivo en lote, como se muestra en la Figura 7, en cierto punto t_0 el medio es desoxigenado y la concentración de oxígeno disuelto C_{AL} cae durante este periodo. El aire es luego bombeado al caldo de fermentación en una tasa de flujo constante y el aumento en C_{AL} es monitoreado como una función del tiempo. C_{AL1} y C_{AL2} son dos concentraciones de oxígeno medidas durante la reoxigenación en los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente. La ecuación de $k_L a$ se desarrolla en términos de estos datos experimentales (Doran, 1995).

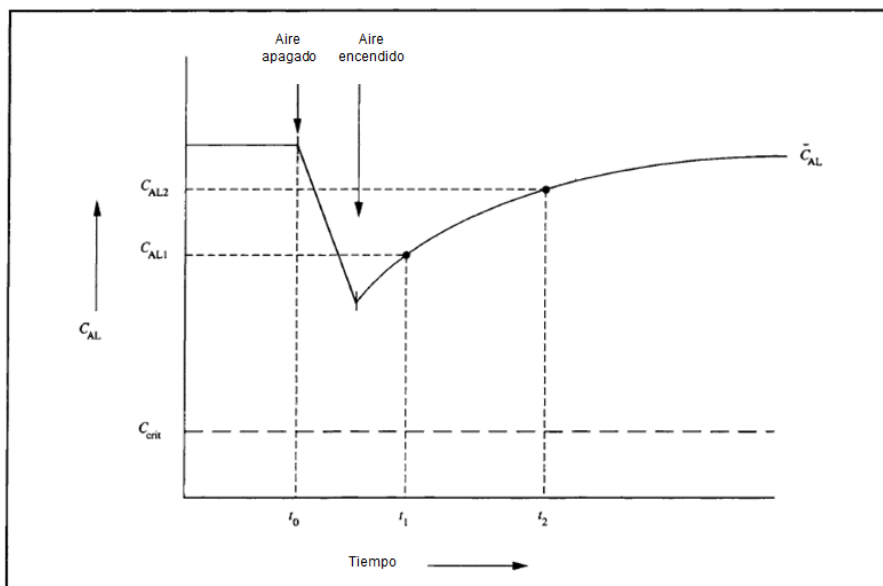


Figura 7. Variación de la tensión de oxígeno para la determinación de $k_L a$ con el método dinámico (Tomado de Doran, 1995).

Durante el paso de reoxigenación, el sistema no es estable. Asumiendo que $k_L a$ es constante con el tiempo, se puede integrar la ecuación entre t_1 y t_2 , por lo que la ecuación resultante para el cálculo de $k_L a$ utilizando el método dinámico sería:

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{\dot{C}_{AL} - C_{AL1}}{\dot{C}_{AL} - C_{AL2}}\right)}{t_2 - t_1}$$

Así, $k_L a$ se puede estimar usando dos puntos de la Figura 7, o de manera más exacta, de varios valores de (C_{AL1}, t_1) y (C_{AL2}, t_2) . Cuando $\ln\left(\frac{\dot{C}_{AL} - C_{AL1}}{\dot{C}_{AL} - C_{AL2}}\right)$ se traza contra $(t_2 - t_1)$,

como se muestra en la Figura 8, la pendiente de la curva corresponde al valor de $k_L a$ (Dunn *et al.*, 2003)

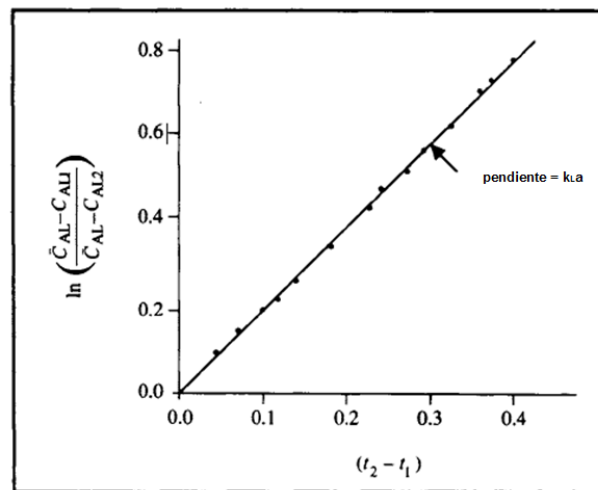


Figura 8. Evaluación de $k_L a$ utilizando el método dinámico (Doran, 1995).

Con la ecuación anterior se puede predecir la respuesta del fermentador a cambios en las condiciones de transferencia de masa. La ecuación también se puede usar para deducir algunas relaciones importantes en los biorreactores; permite estimar la concentración celular máxima que puede soportar el sistema de transferencia de oxígeno del biorreactor, ya que no es deseable que la densidad celular sea limitada por la tasa de transferencia de masa (Doran, 1995).

Otro de los factores más importantes a considerar al hacer una fermentación es proveer un adecuado mezclado de su contenido, esta es una operación física que reduce las faltas de uniformidad en el fluido. Su principal objetivo es dispersar las burbujas de aire para suspender los microorganismos y para mejorar la transferencia de calor (para mantener la temperatura deseada) y transferencia de masa en el medio. Un suministro adecuado de oxígeno a las células durante la fermentación aeróbica es crítico, ya que incluso una reducción temporal de oxígeno, puede dañar irreversiblemente a las células. Además, de no mezclarse el medio, existirán zonas de agotamiento de nutrientes conforme las células consumen rápidamente los materiales que necesitan (Doran, 1995; Dutta, 2008).

Durante el periodo de escalamiento, el mezclado se debe proveer con agitadores de laboratorio (*shakers*), el movimiento rotatorio provee un mezclado suave y aireación en la superficie. En el fermentador, el mezclado usualmente se provee mediante agitación mecánica con o sin aireación. El mezclado se logra con un impulsor dentro del tanque, localizado en la parte central en un eje de agitación que es conducido rápidamente por el motor de agitación. El efecto del impulsor rotatorio es bombear el líquido y crear un patrón de flujo regular. Además, la mampara o *baffles* son tiras verticales de metal montadas contra la pared del tanque, cuya función es reducir la agitación y formación de remolinos en el líquido (Treybal, 1988; Dutta, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de una colección de reserva y una colección de trabajo de la cepa bacteriana

Se adquirió la cepa de referencia *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 liofilizada por lo que, una vez recibida, se procedió a reactivarla de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Luego se estableció una colección de reserva, para lo cual se preparó una suspensión bacteriana concentrada en caldo nutritivo suplementado con glicerol a una concentración final del 20%. Luego se prepararon alícuotas en viales para congelación, los cuales se almacenaron a -70 °C. Por otra parte, se estableció una colección de trabajo, la cual se almacenó en refrigeración a 4 °C.

Condiciones de crecimiento y escalamiento del cultivo

Se emplearon las condiciones de crecimiento recomendadas por la casa comercial ATCC, que consisten en cultivar la cepa en caldo nutritivo (3 g/l extracto de carne, 5 g/l peptona) o agar nutritivo (3 g/l extracto de carne, 5 g/l peptona, 15 g/l agar) durante 24-72 horas a 55 °C (ATCC, 2011).

Antes de escalar el cultivo, se procedió a determinar experimentalmente la curva de crecimiento de la bacteria *G. stearothermophilus*, para lo cual se trabajó con erlenmeyers de 100 ml, inoculados con una asada proveniente de un cultivo en placa de 24 h. Los erlenmeyers fueron incubados por 32 horas a 55 °C y 75 rpm. Se tomaron dos muestras de 1 ml cada 2 horas, las cuales fueron cuantificadas por triplicado. Una de las muestras se sometió a un choque térmico (100 °C, 10 min), seguido por un enfriamiento rápido (agua del tubo, 2 min) antes de realizar las diluciones seriadas. De esta forma, por el método de conteo en placa, fue posible determinar la curva de crecimiento bacteriano, y la curva de producción de esporas. Con los datos obtenidos se calculó el tiempo de duplicación experimental de la bacteria, utilizando la fórmula descrita por Sella (2008):

$$\mu_{max} = \frac{\ln N - \ln N_0}{t}$$

$$T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

μ_{max} es la tasa de crecimiento máxima;

N es el número final de microorganismos;

N_0 es el número inicial de microorganismos;

T es el tiempo de duplicación;

t es el tiempo de cultivo.

Para escalar el cultivo, la cepa se cultivó primero por 24 horas a 55 °C en tubos de ensayos con 10 ml de caldo nutritivo. Luego se pasó a la etapa de cultivo en erlenmeyer, donde se trabajó con volúmenes de 100 ml. Con el crecimiento obtenido en este punto, se procedió a inocular el biorreactor, en el cual se empleó un volumen de medio de cultivo de 1 litro.

Cultivo en el biorreactor y análisis de la cinética de crecimiento

Se utilizó un biorreactor autoclavable de mesa marca *Bioengineering*, modelo R'ALF, con capacidad de 3.7 litros de volumen total y 2.5 litros de volumen de trabajo; con sistema de transferencia de calor de chaqueta externa por la que circula agua, y con un impulsor de tipo propela con mampara interna.

Para realizar el cultivo en biorreactor, se procedió a ensamblar el mismo, se calibró la sonda de pH y se esterilizó por calor húmedo la jarra de cultivo y demás implementos del sistema (mangueras y botellas accesorias). Luego se armó el sistema y se calibró la sonda de oxígeno disuelto (previamente polarizada). La tensión de oxígeno disuelto se estableció en un 70 % de saturación de aire, con este dato y los valores tomados durante la determinación de k_La se calculó este coeficiente utilizando el método dinámico (Doran, 1995). Durante la fase de crecimiento se realizó un monitoreo de las variables temperatura, pH, velocidad de agitación, oxígeno disuelto, densidad celular y producción de esporas.

Para inducir la esporulación, se agregó una solución de sales al cultivo en el biorreactor compuesta por $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0.001 g/l), la misma se agregó justo antes de que el cultivo entrara en la fase estacionaria. El monitoreo de la esporulación se llevó a cabo cada 24 horas, a partir de la inoculación y durante los cinco días que se mantuvo la fermentación en el biorreactor; se tomaron muestras de 1 ml, las cuales se observaron bajo el microscopio óptico utilizando aceite de inmersión (100 X) con el método de tinción descrito por Schaeffer y Fulton (verde de malaquita al 5 % y safranina al 0,5 %) (Rivas, 2011). Cuando más del 85 % de los microorganismos en la muestra correspondieron a esporas, se cosechó el cultivo del biorreactor.

Para calcular el porcentaje de esporas en el cultivo, se realizó un conteo directo al microscopio en cinco campos diferentes, y se utilizó la fórmula descrita por Sella (2008):

$$\% \text{ esporas libres} = \frac{n^\circ \text{ total de esporas libres}}{n^\circ \text{ total de células (esporas y células vegetativas)}} * 100$$

Purificación y cuantificación de las esporas

El proceso de purificación para obtener las esporas se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rivas (2011) con algunas modificaciones. Primeramente, se hizo una centrifugación del cultivo (3600 rpm, 20 min, 4 °C). Seguidamente se decantó el sobrenadante y el sedimento se re suspendió en 10 ml de agua destilada estéril (ADE) fría. En tubos Falcon de 50 ml, se mezclaron 17 ml de buffer fosfato de potasio 3 M pH 7.1; 20 ml de polietilenglicol (PEG 3350) al 30 %; y 10 ml de la suspensión de esporas. Se aforó el volumen a 50 ml con ADE fría y se mezcló en vortex por 5 minutos.

Se realizó otra centrifugación (3000 rpm, 2 min, 25 °C), la fase superior se transfirió a tubos nuevos y se descartó la fase inferior con la interfase. Luego se realizó una centrifugación de la fase superior (3600 rpm, 20 min, 4 °C) para precipitar las esporas, se descartó el sobrenadante y se re suspendió el botón en 25 ml de ADE fría. Se homogenizó en vortex por 5 min y se procedió a centrifugar (3600 rpm, 20 min, 4 °C). Esto se repitió para realizar un total de 4 lavados con ADE fría. Por último, se re suspendió el botón en 10 ml de ADE fría y se almacenó la suspensión a 4 °C.

Se realizó una tinción con el método descrito por Schaeffer y Fulton al finalizar el cultivo en el biorreactor para determinar la presencia de esporas, células vegetativas, células en esporulación y restos celulares. Así mismo, se realizó otra tinción al finalizar el proceso de purificación para observar las esporas recolectadas. Con esta

tinción es posible observar las esporas de color verde, mientras que el resto de las células se tiñe de color rojo (NHM, 1996).

Para la cuantificación, la suspensión de esporas se homogenizó en vortex durante 5 min y se preparó una dilución de trabajo equivalente a un estándar de McFarland 0,5. La concentración de la misma se determinó mediante conteo en placa, por lo que se preparó una dilución 1:10 la cual se sometió a un choque térmico. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas en tubos de ensayo con un volumen de 9 ml de solución salina estéril al 0,85 % hasta 10^{-3} . Después se realizó la siembra por el método de extensión en placa, con tres repeticiones por dilución. Las placas Petri se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 55 °C.

La viabilidad de las esporas se determinó por el método de conteo en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Watanabe *et al.*, 2003; Nguyen Thi Minh, *et al.*, 2011). La concentración de esporas se calculó multiplicando los resultados de los conteos de esporas observadas en las placas de AN, por un factor de corrección calculado con el volumen de suspensión de esporas necesario para generar la turbidez equivalente al estándar utilizado.

Evaluación de termorresistencia de las esporas

Para determinar la termorresistencia se trabajó con una suspensión de 10^6 esporas/ml en solución salina 0,85 %; se procedió a cuantificar la población inicial mediante el método descrito anteriormente, luego la suspensión se sometió a condiciones de esterilización por 1 minuto y se realizó un conteo en placa del número de esporas sobrevivientes para lo cual se efectuaron dos diluciones seriadas 1:10. Con base en la concentración inicial y final, se calculó el tiempo de reducción decimal (Rivas, 2002; Fraiha *et al.*, 2010), utilizando la ecuación:

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

Donde:

t es el tiempo de calentamiento en minutos;

a es el número inicial de microorganismos (UFC/ml);

b es el número de microorganismos sobrevivientes;

t es el tiempo de calentamiento.

RESULTADOS

Condiciones de crecimiento y escalamiento del cultivo

Se obtuvo una curva típica de crecimiento bacteriano para la bacteria *G. stearothermophilus*, en la cual se identificaron claramente la fase de crecimiento exponencial, seguida de una fase estacionaria larga (a partir de las 6 horas aproximadamente), donde no se observó aumento ni descenso en el número de células, y finalmente una fase de muerte celular después de 25 horas de cultivo (Figura 1).

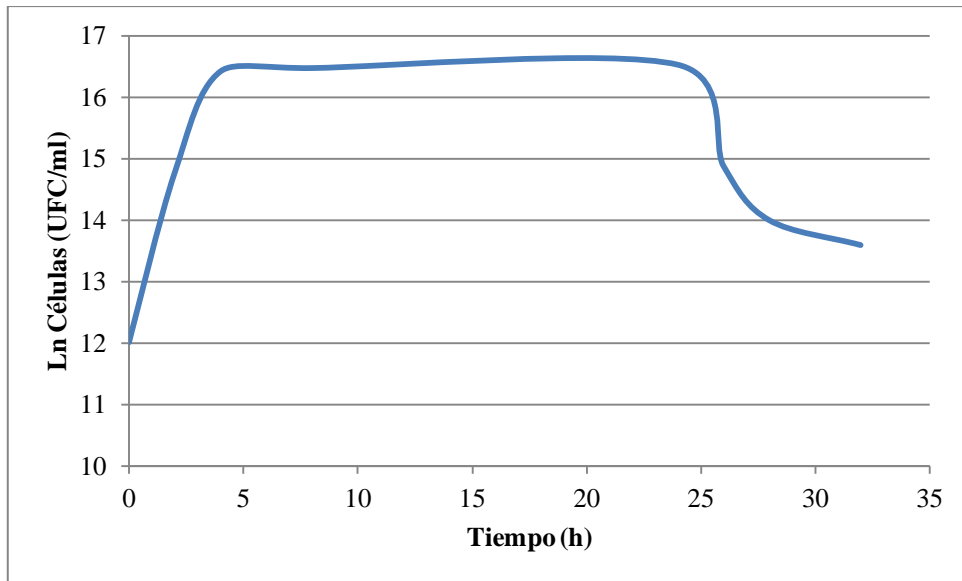


Figura 1. Curva de crecimiento celular de la bacteria *G. stearothermophilus*.

Con los datos de la curva de crecimiento celular, fue posible determinar el tiempo de duplicación experimental para la bacteria, el cual fue de 14,05 minutos. Así mismo, a partir de las muestras sometidas a choque térmico, fue posible determinar la curva de producción de esporas (Figura 2).

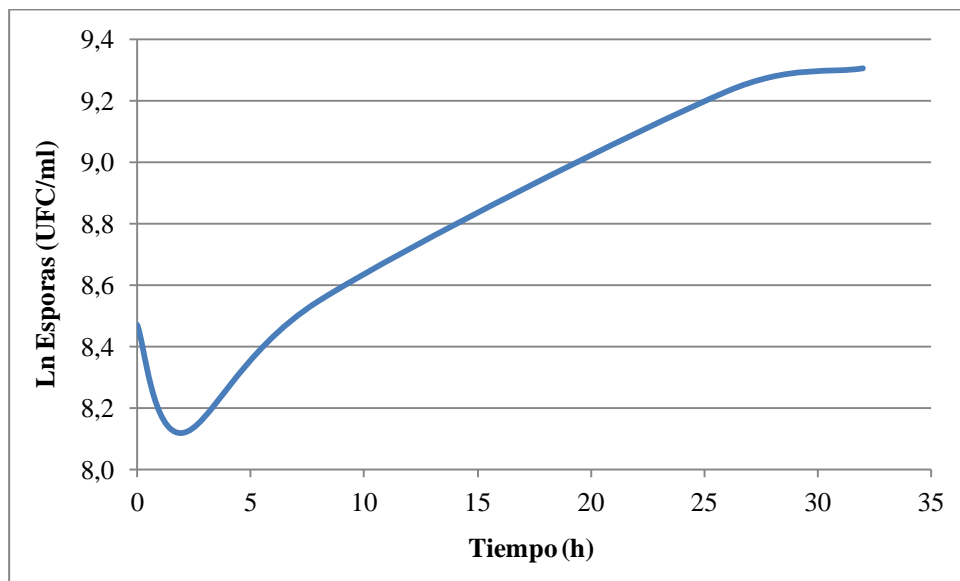


Figura 2. Curva de producción de esporas de la bacteria *G. stearothermophilus*.

La producción de endosporas bacterianas aumentó exponencialmente a partir del momento en que la bacteria entró a la fase de crecimiento estacionaria (6 - 8 horas), y esta tendencia se mantuvo hasta las 26 horas, donde permaneció constante.

Cultivo en biorreactor y análisis de la cinética de crecimiento

Durante toda la fermentación, se llevó a cabo un protocolo de muestreo en donde se reportaron las principales variables en el sistema, de esta forma se trabajó con una temperatura promedio de $53,8 \pm 0,22$ °C, una agitación constante de 750 rpm, el pH se

mantuvo en $6,60 \pm 0,10$ y el oxígeno disuelto correspondió a $99,99 \pm 0,06$ %. El coeficiente de $k_L a$ determinado fue de $0,07 \text{ s}^{-1}$.

La solución de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se utilizó para inducir la esporulación, a las 24 h después de agregarla se pudo observar un aumento en la cantidad de esporas, el cual fue incrementando gradualmente durante las siguientes horas del cultivo. En la Figura 3 se muestra el incremento de la esporulación en el cultivo.

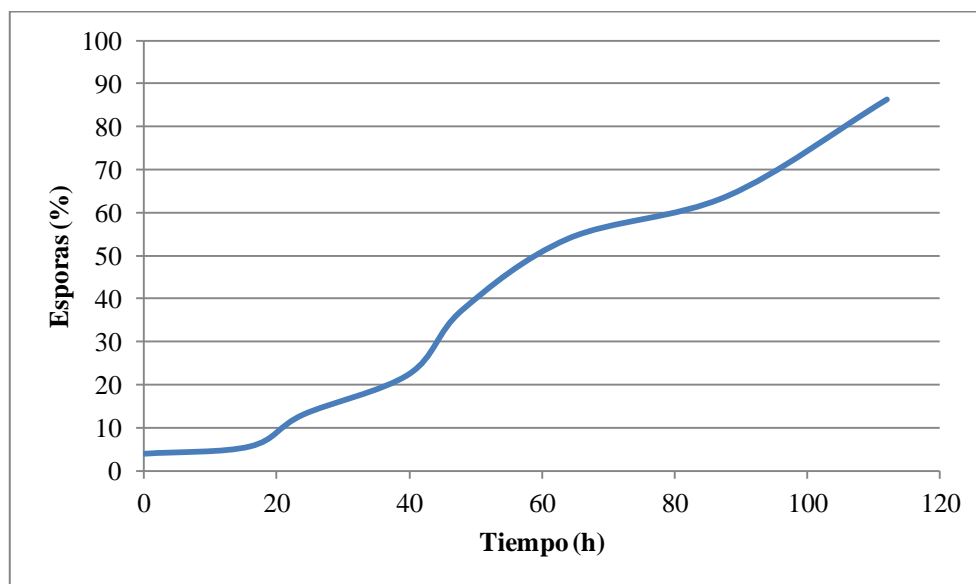


Figura 3. Monitoreo de esporulación de la bacteria *G. stearothermophilus* en el biorreactor.

Purificación y cuantificación de las esporas

Con el proceso de purificación del cultivo, se logró obtener un botón correspondiente a endosporas de la bacteria *G. stearothermophilus*; las tinciones realizadas al cultivo antes del proceso permitieron observar gran cantidad de restos celulares, así como esporas en el microscopio. Después de realizar la purificación se lograron observar las esporas recolectadas, las cuales se tiñeron de color verde y presentaban un contorno redondo bien definido.

Con respecto a la concentración de esporas en la solución de trabajo equivalente al estándar de McFarland 0,5; ésta correspondió a $1,4 \times 10^7$ esporas/ml. Los conteos de UFC en placa, permitieron observar colonias circulares de color crema, con bordes definidos y superficie lisa, características de la bacteria *G. stearothermophilus*.

Evaluación de termorresistencia de las esporas

La concentración inicial de esporas fue $7,2 \times 10^6$ esporas/ml, y luego de realizar la prueba de termorresistencia, su concentración disminuyó a $3,1 \times 10^5$ esporas/ml. El tiempo de reducción decimal (D) calculado fue de 0,73 minutos. En la Figura 4 se muestra la curva de destrucción térmica de *G. stearothermophilus* a 121°C , en donde se graficó el número de esporas sobrevivientes contra el tiempo, en minutos.

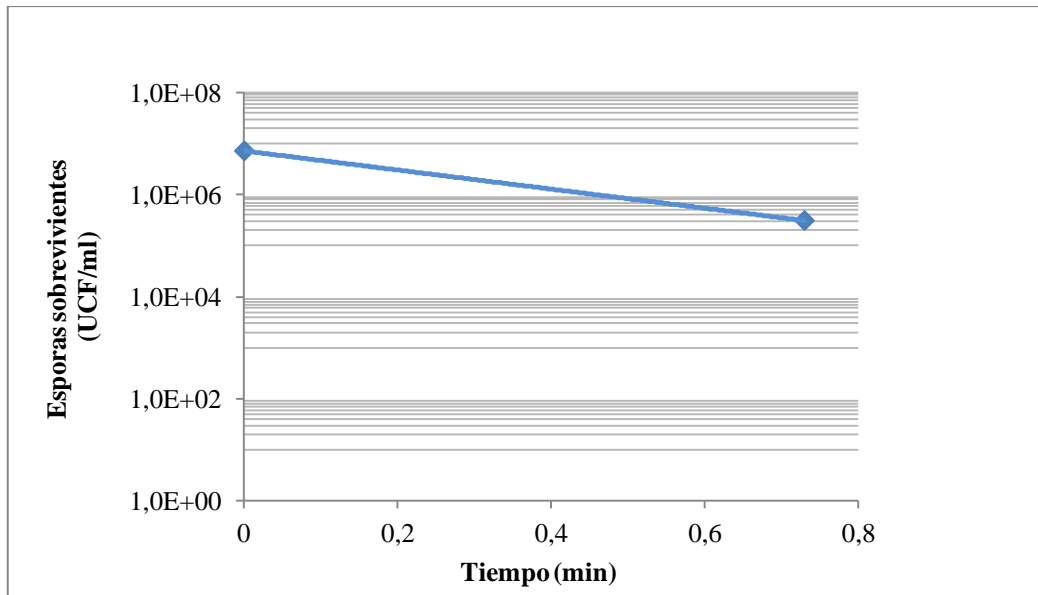


Figura 4. Curva de destrucción térmica de *G. stearothermophilus* a 121 °C, en solución salina 0,85 %.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta investigación se observó el crecimiento celular típico de una bacteria al graficar la curva de crecimiento de *G. stearothermophilus*, sin embargo no se dio una fase de latencia en el cultivo, ya que como este provenía del mismo medio y de las mismas condiciones de cultivo, no se observó el retraso debido a la adaptación al nuevo medio, y el crecimiento exponencial se inició inmediatamente (Madigan *et al.*, 2004).

La duración de la fase de crecimiento exponencial determina la población celular final de *G. stearothermophilus*, la división celular simétrica depende de condiciones exógenas favorables como temperatura, humedad, nutrientes y aireación. El tiempo de duplicación de la bacteria determinado experimentalmente está muy cercano con lo reportado en la literatura, donde se menciona un tiempo de duplicación de 11 minutos (Unisa, 2011; Lee, 2006).

La fase estacionaria es la fase de crecimiento más importante para escalar el cultivo y obtener endosporas bacterianas ya que en esta etapa, debido al agotamiento de nutrientes en el medio, o a una alta densidad celular, la bacteria deja de crecer y comienza el proceso de esporulación como un mecanismo de sobrevivencia a las condiciones ambientales (Knecht *et al.*, 2011; Sella *et al.*, 2009). La esporulación de *G. stearothermophilus* se caracteriza por ser un proceso morfológico sincronizado de múltiples fases que ocurre al comienzo de la fase estacionaria (Penna *et al.*, 2003). La curva de producción de esporas coincidió con la entrada del cultivo en la fase estacionaria, ya que a partir de las 6 a 8 horas se observó un aumento exponencial del número de esporas hasta mantenerse constante a las 26 horas en que el cultivo ya se encontraba en fase de muerte celular. Los datos obtenidos permitieron determinar el momento en que el cultivo de la bacteria entró en la fase estacionaria, y así mismo, el momento en que se debía agregar la solución de sales para inducir la esporulación en el biorreactor.

Se sabe que la resistencia térmica de las esporas está relacionada con la calidad de la célula vegetativa de la cual se originan. Las esporas producidas a partir de fase estacionaria de crecimiento del inóculo son más sensibles al calor, debido a un mayor tiempo de exposición de las células vegetativas a los metabolitos tóxicos del medio de cultivo, por esta razón, la determinación de la fase logarítmica de crecimiento es fundamental para la obtención de un inóculo de buena calidad (Sella, 2008). Por esta razón al inocular el biorreactor se utilizaron 100 ml de cultivo que se encontraba en fase de crecimiento exponencial.

Durante la fermentación se mantuvieron las condiciones físicas necesarias para que el cultivo de la bacteria se desarrollara exitosamente. La agitación se mantuvo constante en 750 rpm para asegurar la saturación de oxígeno en el medio (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). La temperatura promedio fue de $53,8 \pm 0,22$ °C, y a pesar de ser más baja que la temperatura recomendada para su crecimiento, algunos autores señalan que la bacteria puede crecer en temperaturas que van desde 45 a 60 °C, por lo que se considera que esta variable no afectó su crecimiento (Fraihia *et al.*, 2010; Dutta, 2008).

El pH se registró en $6,60 \pm 0,10$; de acuerdo con Fraihia *et al.* (2010) el pH ideal de crecimiento para la bacteria varía en el rango de 6.0 a 7.5, sin embargo al inicio del cultivo siempre es común observar una disminución en el pH, esto se debe a la utilización de azúcares y otros precursores, y a la subsecuente formación de productos ácidos necesarios para el crecimiento y división celular. Conforme la fuente de carbono en el medio es consumida, generalmente comienza la esporulación, y los productos ácidos formados durante el crecimiento vegetativo son utilizados en la formación de esporas. Lo que se observa entonces es un leve aumento en la curva de pH que indica cuándo ha iniciado la esporulación (NHM, 1996).

Por otra parte, el valor del coeficiente de $k_L a$ se encuentra dentro del rango de 0,02 a $0,25 \text{ s}^{-1}$, donde se ubica el valor de $k_L a$ típicamente en biorreactores de producción a escala. De acuerdo con Doran (1995), si al calcular $k_L a$ en un biorreactor, se obtiene un valor pequeño, la habilidad del sistema de llevar el oxígeno a las células es limitada, esto se pudo dar debido a la temperatura de operación en el sistema, ya que el efecto neto de la temperatura en la transferencia de masa depende del rango de temperatura de trabajo, de esta forma, para temperaturas entre 10 y 40 °C, un aumento en la temperatura es más probable que incremente la tasa de transferencia de oxígeno; sin embargo, al trabajar con temperaturas por encima de 40 °C, como es el caso de la bacteria *G. stearothermophilus*, la solubilidad del oxígeno se reduce significativamente, afectando negativamente la fuerza impulsora y la tasa de transferencia de masa. Esto es un factor muy importante a considerar al trabajar con microorganismos termófilos que requieren altas temperaturas de operación para lograr su crecimiento y posterior recolección de los productos deseados.

El monitoreo de la esporulación en el sistema, permitió analizar la cinética de crecimiento en el biorreactor. El cultivo se mantuvo en el sistema por un periodo de cinco días, hasta que se observó más de un 85 % de esporulación. En un estudio realizado por Nguyen Thi Minh *et al.* (2011) se determinó que tres días fueron suficientes para que todas las células de *B. subtilis* completaran la formación de esporas, obteniendo una alta concentración de las mismas (10^9 esporas/ml).

La diferencia en el tiempo se debe principalmente a que utilizaron un medio de cultivo compuesto formado por sales (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KCl, ZnSO_4 , MnCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), glucosa y extracto de levadura. Cuando estos mismos autores realizaron cambios a las condiciones de crecimiento (baja aireación, temperatura de cultivo, pH y ausencia de calcio en el medio), observaron que se incrementó la fase de esporulación y se redujo la concentración

final de esporas, esto es precisamente lo que ocurrió en el presente estudio al utilizar condiciones de cultivo diferentes.

A pesar de que la solución de sales utilizada para inducir la esporulación, compuesta por $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, aumentó la cantidad de esporas en el cultivo, como se discutirá más adelante, las esporas obtenidas en la presente investigación presentaron baja termorresistencia. De acuerdo con Sella *et al.* (2009), la dificultad de desarrollar un medio de esporulación rentable está no solo en inducir una alta producción de esporas, sino en obtener grandes cantidades de esporas que sean termorresistentes, lo cual es una condición básica para su uso en la producción de indicadores biológicos de esterilización. Las esporas termorresistentes deben ser capaces de prevenir el daño que podría inactivar componentes celulares críticos necesarios para una germinación exitosa y para la reanudación del crecimiento.

Las características de termorresistencia se desarrollan durante la maduración de la espora. Los cambios morfológicos complejos que ocurren durante la esporulación resultan de cambios regulados en la expresión génica. No obstante, la resistencia térmica de las esporas maduras puede manipularse *in vitro* ya que cuando se tratan las esporas en suspensión con cationes de sodio, potasio, magnesio y manganeso, éstas se vuelven más resistentes. La mineralización de las esporas causa una reducción en el contenido de agua de la espora, provocando un incremento en la resistencia térmica (Penna *et al.*, 2003).

Por lo anterior, se recomienda utilizar la solución de sales propuesta por Sella *et al.* (2009) para estimular la esporulación, la cual está compuesta por $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.005%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.004%; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.004%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005%; de esta forma se estarían agregando los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Mn^{2+} , Na^+ , mencionados en el estudio de Penna *et al.* (2003) como necesarios para aumentar la resistencia de las esporas al calor.

El medio de cultivo recomendado por la casa comercial ATCC para el cultivo de la bacteria *G. stearothermophilus* contiene extracto de carne y peptona como fuente de nutrientes (carbono y nitrógeno), el cloruro de sodio, por su parte, es un suplemento adicionado para modular la fuerza osmótica del medio (Sella, 2008). En el Anexo 2 se muestra la composición de los medios de cultivo utilizados en el presente estudio.

Como se mencionó anteriormente, las condiciones de esporulación determinan las características de las esporas formadas, como resistencia térmica y capacidad de germinación, por lo que debería considerarse la posibilidad de utilizar otro medio de cultivo para la bacteria. Este medio deberá ser el mismo caldo nutritivo recomendado por ATCC, pero suplementado con otros componentes, y luego adicionar la solución de sales para favorecer la esporulación en el momento en que el cultivo entre en la fase estacionaria de crecimiento.

Por ejemplo, Sella (2008) probó cinco medios de cultivo diferentes y determinó que el medio compuesto por caldo nutritivo, extracto de levadura, MnSO_4 , CaCl_2 (y agar), fue el mejor para la producción de esporas por presentar la menor cantidad de constituyentes en su composición, lo que facilita su preparación y reduce los costos, obteniendo buenos resultados. Esto es un factor importante si la finalidad es producir esporas destinadas a la fabricación de indicadores biológicos en escala industrial.

Así mismo, Penna *et al.* (2003), probaron 17 medios de cultivo diferentes para la bacteria *G. stearothermophilus* y determinaron que los componentes peptona, extracto de levadura y glucosa, proveen buena viabilidad de esporas y valores D mayores a 1,5 minutos, por lo que coinciden con los estándares internacionales para IB.

Con respecto a la concentración de esporas, en otros estudios se han reportado valores superiores a los generados en la presente investigación. Por ejemplo Nguyen Thi Minh *et al.* (2011) obtuvieron 10^9 esporas/ml de *Bacillus subtilis*; así mismo Sella (2008) obtuvo en su estudio concentraciones entre $8,4 \times 10^7$ y $2,1 \times 10^{10}$ de *Bacillus atrophaeus*; y Penna *et al.* (2003) obtuvieron $1,0 \times 10^8$ esporas/ml de *Geobacillus stearothermophilus*.

Como se mencionó anteriormente, las principales diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores, se deben a que se han utilizado medios de cultivo más complejos y específicos para favorecer el proceso de esporulación. Por lo tanto, la concentración de $1,4 \times 10^7$ esporas/ml que se obtuvo en la presente investigación es baja en comparación con lo reportado en la literatura. Sin embargo, a pesar de ello, se considera que dicha concentración es suficiente para preparar un indicador biológico, ya que los IB comerciales contienen normalmente poblaciones entre 10^5 y 10^6 esporas/ml (Sasaki *et al.*, 2000; Ames y Clement, 2007).

Al hacer la prueba de termorresistencia, se determinó un tiempo de reducción decimal (valor D) de 0,73 minutos. Este valor es inferior al D teórico establecido para la bacteria *G. stearothermophilus* en el método de esterilización por calor húmedo a 121°C , que es de 1 minuto para poblaciones mayores o iguales a $1,0 \times 10^6$ (Monge, 2011). De acuerdo con Duglozenski *et al.* (2011) el estándar oficial de un IB para esterilización por vapor, recomienda un valor $D_{121^\circ\text{C}}$ de 1,5 minutos.

El resultado obtenido con la prueba de termorresistencia se encuentra directamente relacionado con la concentración inicial de esporas, ya que de acuerdo con Fraiha *et al.* (2010), un valor D bajo se podría explicar debido a un bajo número inicial de esporas en el tubo de prueba para esa temperatura.

El valor D obtenido en el presente trabajo difiere con el valor de otros estudios reportados por Fraiha *et al.* (2010), donde se ha determinado un valor D similar al establecido teóricamente de 1 minuto.

Los valores de inactivación de células vegetativas y esporas (D) dependen no solo de las condiciones de tratamiento, sino también del tipo de medio en el que los microorganismos son suspendidos, así como el tipo de especie y cepa (Estrada-Girón *et al.*, 2007).

Un factor importante al estudiar la termorresistencia es el pH del medio de suspensión de las esporas, ya que su resistencia térmica disminuye en medio ácido (Sella *et al.*, 2009). Para demostrar esto, Duglozenski *et al.* (2011) estudiaron la influencia del pH en la germinación de esporas dañadas por calor, observando que el valor $D_{121^\circ\text{C}}$ fue mayor conforme aumentó el pH del medio en el rango de 6,0 hasta 7,3. Esto se confirma con lo expuesto por Penna *et al.* (2002), en otros estudios realizados, en los cuales los valores D variaron con el pH del medio de suspensión, por lo que se puede decir que conforme se aumenta el pH del medio, se obtienen tiempos de reducción decimal mayores ya que la acidez del medio tiene una interferencia negativa en la evaluación de la termorresistencia.

Como se mencionó anteriormente, en el presente estudio se utilizó solución salina 0,85 % como medio de suspensión para realizar la prueba de termorresistencia; sin embargo no se determinó el pH de la misma, y esto pudo afectar el resultado de la prueba, ya que condiciones levemente ácidas en la solución pudieron contribuir a una desmineralización parcial de las esporas. Con lo anterior se confirma que la resistencia térmica está asociada con el peptidoglicano presente en la corteza de la

espora, por lo que a pH bajo, el ácido protona el peptidoglicano, disminuyendo la resistencia térmica y la viabilidad de las esporas (Penna *et al.*, 2003). De acuerdo a los resultados reportados por estos autores, se debe procurar utilizar un medio de suspensión que podría ser el mismo caldo nutritivo suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.018 %; y extracto de levadura, 0.8 % con un pH ajustado a 7.3.

Por otra parte, se debe evaluar la posibilidad de utilizar un medio de germinación para recuperar una mayor cantidad de células. Las esporas que han sido dañadas por calor, muchas veces exigen condiciones especiales de cultivo para garantizar su completa germinación y el medio de recuperación debe asegurar su desarrollo (Sella, 2008).

En un estudio realizado por Sasaki *et al.* (2000), se investigó la relación entre la concentración de calcio del medio y el crecimiento de esporas de *G. stearothermophilus*; se encontró que el número de esporas sobrevivientes incrementó significativamente al agregar calcio al medio de cultivo, lo que sugiere que las esporas son dependientes del calcio para su germinación y crecimiento, y se considera que el calcio está involucrado en la reparación de esporas dañadas por calor. De esta forma, la concentración de calcio en el medio juega un papel importante en el valor D.

Así mismo, Duglozenski *et al.* (2011) determinaron que la ausencia de calcio en el medio resultó en una reducción de la capacidad de germinación de las esporas dañadas por calor, disminuyendo el valor D en medios con y sin cloruro de calcio. Finalmente, en otro estudio reportado por estos autores, se menciona que el cloruro de calcio induce la formación de las proteínas SASP, lo que ayuda a regenerar el ADN de las células dañadas. De esta forma, la presencia de calcio en el medio efectivamente afecta la resistencia térmica y la germinación de esporas, siendo éste indispensable para la recuperación de esporas afectadas por calor (Sasaki *et al.*, 2000).

Algunas esporas no son totalmente inactivadas por los procesos térmicos, pero sí son dañadas de forma sub-lethal, principalmente en el sistema de germinación y en el crecimiento de las células vegetativas, debido a la inactivación de enzimas y proteínas. Un medio óptimo de recuperación de esporas debe contener agua y agentes inductores (dipicolinato de calcio, alanina, glucosa, fructosa y otros iones inorgánicos) que penetran por la cubierta dañada, a través de receptores específicos, y activan una enzima lítica, así las esporas rompen su latencia, la célula absorbe agua y minerales, dando lugar a una germinación inmediata (Sella, 2008).

La espora de la bacteria *G. stearothermophilus* es una de las esporas más termorresistentes de los microorganismos aeróbicos. Watanabe *et al.* (2003) compararon diferentes bacterias de los géneros *Bacillus* y *Geobacillus* de acuerdo a los valores D en diferentes tratamientos de calentamiento. Los autores determinaron que las esporas de *G. stearothermophilus* fueron las más resistentes. Los resultados de otros estudios han confirmado la elevada resistencia al calor de las esporas de *G. stearothermophilus*, así como la influencia del medio de cultivo en los resultados (Fraiha *et al.*, 2010).

Algunos métodos para obtener gran producción de esporas termorresistentes requieren de un extenso periodo de tiempo, el cual es indeseable para la producción industrial de indicadores biológicos. Un método de cultivo de simple aplicación y rápido crecimiento, que permita altos índices de esporulación, debería minimizar los costos de producción industrial, resultando en un producto final de mayor valor comercial (Sella *et al.*, 2009).

En este estudio fue posible obtener una concentración de esporas adecuada para elaborar un indicador biológico, mediante un procedimiento de fermentación a escala en biorreactor, el cual es fácil de reproducir, y con algunas modificaciones a la composición de los medios de cultivo utilizados, es posible aumentar la concentración y termorresistencia de las esporas obtenidas.

RECOMENDACIONES

Utilizar una solución de sales para estimular la esporulación en el cultivo, compuesta por $K_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0.005 %; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.004 %; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.004 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005 %; de esta forma las esporas obtenidas serán más termorresistentes. Además, se debe considerar utilizar otro medio en el cultivo de las células vegetativas para obtener mayor concentración de esporas. Al mejorar las condiciones de esporulación se obtendrán esporas con mejores características, como resistencia térmica y capacidad de germinación. Se recomienda utilizar un medio compuesto por extracto de levadura, caldo nutritivo, $MnSO_4$, $CaCl_2$, (y agar).

Finalmente, para aumentar la termorresistencia de las esporas, se recomienda utilizar un medio de suspensión con un pH cercano a 7,3 y que contenga calcio entre sus componentes, ya que al aumentar el pH se aumenta la resistencia térmica (valor D); de la misma manera, la presencia de calcio y agentes inductores en el medio de recuperación favorecerán la germinación de las esporas.

BIBLIOGRAFÍA

Albert, H., Davies, D.J.G., Woodson, L.P., Soper, C.J. 1998. Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 865-874.

Ames, H., Clement, L. 2007. Evolution, a biological indicator story. *Healthcare Purchasing News*: 46-49.

ATCC. 2011. Product Description ATCC® Number: 7953™. Disponible en: <<http://www.straininfo.net/strains/38704/browser>> (Octubre, 2011)>

Casanova, V. 2012. Métodos de limpieza, desinfección y esterilización. Laboratorio de ensayos biológicos (LEBi). Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 16-21p.

Doran, P.M. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Science & Technology Books. 9-213p.

Długokenski, R., Sella, S., Guizelini, B., Vandenberghe, L., Woiciechowski, A., Soccol, C., Minozzo, J. 2011. Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90:713–719.

Dutta, R. 2008. *Fundamentals of biochemical engineering*. Ane Books India. Springer. Lucknow, India. 92-260p.

Estrada-Girón, Y., Guerrero-Beltrán, J.A., Swanson, B.G., Barbosa-Cánovas, G.V. 2007. Effect of high hydrostatic pressure on spores of *Geobacillus stearothermophilus* suspended in soymilk. *Journal of Food Processing and Preservation* 31: 546–558.

Fraiha, M., Ferraz, A.C., Biagi, J.D. 2010. Determination of thermobacteriological parameters and size of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 30(4): 1041-1045.

Iáñez, E. 2005a. Agentes físicos. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Granada, España. Disponible en: <<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm>> (27 abril, 2010).

Iáñez, E. 2006. Diferenciaciones celulares. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Granada, España. Disponible en: <<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/09esporas.htm>> (27 de abril, 2010).

Krahe, M. 2003. *Biochemical Engineering*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Alemania. 70 p.

Knecht, L.D., Pasini, P., Daunert, S. 2011. Bacterial spores as platforms for bioanalytical and biomedical applications. *Anal Bioanal Chem* 400:977–989.

Lee, Y.K. 2006. *Microbial biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2ªEd. Singapur. 32p.

Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker. 1998. Brook. Biología de los Microorganismos. 8va edición. Prentice Hall. Madrid, España. 986 p.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock Biología de los microorganismos. 10° Ed. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. PP:5-691.

Monge, M. 2011. Esterilización de dispositivos médicos. Curso Control de Calidad en la Industria de Dispositivos Médicos. FUNDATEC-CEQIATEC.

Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P. 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:1409–1417.

NHM. 1996. National Health Museums: Measurements. Ward's Natural Science Establishment, Inc. Disponible en:
<<http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e6ferm/measurements.php>>
(Noviembre, 2011).

Penna, T.C., Ishii, M., Machoshvili, I.A., Marques, M. 2002. The effect of bioindicator preparation and storage on thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. Applied Biochemistry and Biotechnology. 98-100: 525-538.

Penna, T.C., Machoshvili, I.A., Ishii, M. 2003. Effect of Media on Spore Yield and Thermal Resistance of *Bacillus stearothermophilus*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 105–108: 287-294.

Quesnel, L.B. 1987. Esterilización y esterilidad. En: Bu'Lock, J., B. Kristiansen. Biotecnología básica. Traducido por Paloma Liras Padín. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp : 175-217.

Rappert, S., O. Platas, D. Lutz, S. Oehmke, U. Jandt. 2009. Practical Course in Bioprocess and Biosystems Engineering. Institute for Technical Biocatalysis & Institute for Bioprocess and Biosystems Engineering. Technical University of Hamburg-Harburg. Hamburgo, Alemania. 34 p.

Rivas, O. 2002. Desarrollo de una metodología enfocada a la producción de un indicador biológico para el control de calidad de la esterilización por calor húmedo. Informe de práctica de especialidad. Bachillerato Ing. Biotecnología. ITCR-INCIENSA. Cartago, Costa Rica. 45-47p.

Rivas, O. 2011. Manual de Prácticas de Bacteriología Aplicada. Identificación microscópica de estructuras bacterianas. Instituto Tecnológico de Costa Rica. En preparación. 7-10p.

Sasaki, K., Shintani, H., Itoh, J., Kamogawa, T., Kajihara, Y. 2000. Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. Appl Environ Microbiol. 66(12): 5509–5513.

Sella, S.R.B.R. 2008. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de esporos termorresistentes de *Bacillus atrophaeus*. Mestre do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Área de Concentração: Saúde Animal e Humana. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil. 245pp.

Sella, S.R.B.R., Guizelini, B.P., Vandenberghe, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. 2009. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82:1019–1026.

Trejo-Espino, J.L., K. Bermúdez-Torres, G. Sepúlveda-Jiménez, G. Trejo-Tapia, A.R. Jiménez-Aparicio, M. Rodríguez-Monroy. 2007. Manual de prácticas del curso “Aspectos teórico-prácticos del cultivo de células vegetales en biorreactores”. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 60 p.

UNISA. 2011. Growth of microorganisms. Brock. Lecture Wk 3.1. <<http://www.unisanet.unisa.edu.au/Information/101032info/10%20Micro%20Lec%20Wk3%201%20Notes%20Growth.pdf> > (Setiembre, 2011).

Watanabe, T., Furukawa, S. Hirata, J., koyama, T., Ogihara, H., Yamasaki, M. 2003. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high-pressure carbon dioxide treatment. Appl. Environ. Microbiol. 69(12): 7124–7129.

DOCUMENTO II.

II. Limitaciones o problemas encontrados.

I. Cumplimiento de objetivos:

Se logró cumplir el Objetivo General del proyecto:

”Establecer el cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* en un biorreactor de 2.5 litros con el fin de obtener grandes cantidades de esporas termorresistentes con potencial para ser usadas como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo”.

Respecto a los objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones de crecimiento de *G. stearothermophilus* para su cultivo en medio líquido a escala de erlenmeyer.

Se obtuvieron los siguientes productos:

- ✓ Cepa bacteriana disponible y establecida.
- ✓ Se dispone de una colección de reserva y colección de trabajo.
- ✓ Protocolo para el cultivo de la cepa a escala de erlenmeyer

2. Desarrollar el escalamiento desde el erlemeyer hasta un biorreactor de 2.5 litros para obtener mayores cantidades de la cepa de interés.

Se obtuvieron los siguientes productos:

- ✓ Protocolo para el cultivo de la cepa en un biorreactor de 2.5 litros.
- ✓ Parámetros de operación del biorreactor determinados.
- ✓ Cinética de crecimiento de la cepa en el biorreactor establecida.

3. Establecer la termorresistencia de las esporas de *G. stearothermophilus* cultivadas en el biorreactor para determinar su potencial como indicadores biológicos en el control de calidad de la esterilización por calor húmedo.

Se obtuvieron los siguientes productos:

- ✓ Esporulación del cultivo inducida.
- ✓ Esporas obtenidas y cuantificadas
- ✓ Termorresistencia determinada

II. Limitaciones y problemas encontrados:

En el Cronograma de la Actividad de Investigación, se programó como primera actividad a desarrollar, en los meses de enero a marzo de 2011: “Adquirir y propagar la cepa de la bacteria”. Sin embargo, el presupuesto asignado no estuvo disponible para la compra, pues se nos informó que los recursos estarían sujetos a un presupuesto extraordinario.

Una vez que se tuvo acceso a los recursos se procedió a la compra de la cepa bacteriana por medio del Departamento de Aprovechamiento. Por políticas del Departamento de Aprovechamiento, la compra se realizó en conjunto con la solicitud de adquisición de cepas bacterianas solicitadas por el CEQIATEC, el 18 de julio. Como se había programado disponer de la cepa en el mes de febrero y multiplicarla en marzo, esto ocasionó un atraso en las actividades del proyecto

Además del atraso en la adquisición de la cepa, también se presentaron fallos en el funcionamiento del rotámetro de aire del biorreactor y hubo que solicitar uno nuevo a la casa matriz en Suiza, debido a que el fabricante del equipo no tiene representación a nivel nacional.

Se adquirió un rotámetro nuevo sin costo para el proyecto, ya que el equipo se encontraba con garantía de fábrica.

A mediados de julio de 2011, se inició el entrenamiento a una nueva asistente en el manejo del equipo. En los siguientes meses, se realizaron las pruebas de cultivo y escalamiento y se concluyó con éxito la actividad de investigación, gracias al apoyo del Consejo de Escuela de Biología y al Consejo de Investigación, que apoyaron la ampliación de tiempo y así se logró cumplir todos los objetivos contemplados en el proyecto.

III. Observaciones generales y recomendaciones:

Recomendaciones Técnicas:

Probar otro medio de cultivo para el cultivo de células vegetativas. El medio consisten en extracto de levadura, caldo nutritivo, $MnSO_4$, $CaCl_2$, y agar. Con el propósito de que se incremente la producción de esporas y la calidad de las mismas, incidiendo en una mayor resistencia térmica y capacidad de germinación.

Utilizar una solución de sales ($K_2HPO_4 \cdot H_2O$, 0.005 %; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.004 %; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.004 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005 %) para estimular la esporulación en el cultivo, de esta forma las esporas obtenidas serán más termorresistentes.

Con el fin de incrementar la termorresistencia de las esporas, se recomienda utilizar un medio de suspensión con calcio entre sus componentes y un pH cercano a 7,3. Al aumentar el pH se aumenta la resistencia térmica (valor D); de la misma manera, la presencia de calcio y agentes inductores en el medio de recuperación favorecerán la germinación de las esporas.

Otras recomendaciones:

Realizar un estudio de factibilidad para conocer las posibilidades de implementar la producción de indicadores biológicos a nivel comercial en Costa Rica. Actualmente se deben importar de otros países, lo que encarece los costos de los programas de control de calidad de procesos de esterilización por calor húmedo.

El Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica cuenta con un biorreactor autoclavable de mesa marca *Bioengineering*, modelo R'ALF, con capacidad de 3.7 litros de volumen total y 2.5 litros de volumen de trabajo, por lo que se pretende cultivar la cepa *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 en medio líquido bajo el sistema de fermentación en lote, con el fin de obtener endosporas termorresistentes con potencial para ser utilizadas como indicador biológico en el control de calidad de procesos de esterilización con calor húmedo. Esto permitiría, en un futuro, producir un indicador biológico en el país, con lo que se podrían ahorrar costos a nivel institucional e incluso generar ganancias, si posteriormente se llegara a comercializar el producto.