

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

El aislamiento y la identificación de microorganismos presentes en un ambiente natural es el primer paso de una investigación para determinar las propiedades y características particulares de los diferentes géneros presentes y los metabolitos o enzimas extracelulares que pueden producir.

Esta primera etapa de aislamiento e identificación es de importancia para una caracterización posterior tanto de los géneros seleccionados como de las enzimas proteolíticas y determinar objetivamente su aplicabilidad a nivel industrial en el país.

La investigación científica acerca de la microbiota presente en ambientes extremos es muy reducida en nuestro país a pesar de la gran diversidad geológica y ecológica que presenta. El mayor conocimiento que se ha logrado en el Ecuador sobre este campo se ha enfocado al aislamiento e identificación de bacterias capaces de degradar hidrocarburos para su uso en procesos de biorremediación

En años recientes, el aislamiento e identificación de microorganismos extremófilos de ambientes hipersalinos ha cobrado gran relevancia científica debido a las múltiples aplicaciones biotecnológicas de los metabolitos y enzimas extracelulares producidas. Dentro de estas enzimas, las haloenzimas con actividad proteolítica han despertado un gran interés ya que su aplicabilidad se extiende cada vez más dentro de los campos de la industria.

1.2. Justificación del problema

Aislar e identificar bacterias halófilas con actividad proteolítica en la costa ecuatoriana, es un trabajo pionero que contribuirá en el conocimiento de las microbiota presente en ecosistemas marinos en el país y permitirá identificar aislados bacterianos con gran potencial biotecnológico, ya que no sólo producen compuestos de gran interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial.

Las enzimas que tienen actividad proteolítica son las más representativas en cuanto a importancia industrial ya que en procesos industriales se emplean enzimas en condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad (Ramírez *et al.*, 2004).

Las enzimas proteolíticas son utilizadas principalmente como aditivos para la fabricación de detergentes, en el curtido de cuero, el reciclaje de derivados de películas fotográficas, en la elaboración de quesos, en la elaboración de suplementos hidrolizados de caseína o de soja, en la obtención de seda, elaboración de bebidas, entre otras (Rao *et al.*, 1998).

En el enfoque económico se estima que las ventas mundiales de enzimas industriales son muy elevadas, de las cuales el 75% presentan actividades hidrolíticas. Las proteasas representan uno de los tres grupos de enzimas industriales más importantes y constituyen alrededor del 60% del total de las ventas mundiales (Godfrey *et al.*, 1996).

1.3. Objetivos del proyecto

1.3.1. Objetivo general

Aislar e identificar bacterias aerobias halófilas que manifiesten actividad proteolítica, procedentes de piscinas de sal de la industria ECUASAL localizadas en la provincia de Santa Elena.

1.3.2. Objetivos específicos

- Aislar bacterias aerobias halófilas moderadas.
- Determinar si los aislados de bacterias halófilas manifiestan actividad proteolítica.
- Identificar los géneros predominantes del grupo de bacterias halófilas moderadas aisladas.
- Mantener los aislados identificados en condiciones adecuadas para permitir posteriores investigaciones.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Ambientes extremos

Ambiente extremo es aquel que presenta valores extremos de determinados parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH, presión hidrostática, potencial redox, actividad del agua, salinidad, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, condiciones inusuales poco favorables o letales para la mayoría de organismos. Los organismos que toleran e incluso requieren para su desarrollo estas condiciones se los denomina organismos extremófilos (Ventosa *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista taxonómico se ha definido el término ambientes extremos como “ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos”. En las últimas décadas, los estudios basados en los microorganismos extremófilos ponen de manifiesto que la diversidad taxonómica

presente en los ambientes extremos no es tan reducida como se pensó en un principio (Benlloch *et al.*, 2002).

Actualmente, se definen diferentes grupos de organismos extremófilos de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se desarrollan. La mayor parte de estos pertenecen a bajos niveles de organización, siendo la gran mayoría de estructura celular procarionte. En la figura 1.1 se indican las diferentes condiciones extremas ambientales y los organismos que viven en ellas.

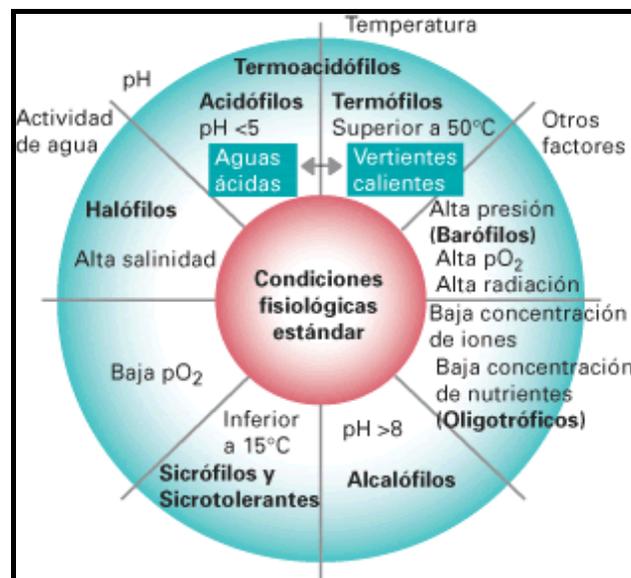


Figura 1.1. Diferentes condiciones ambientales extremas y grupos de organismos adaptados a ellas (extremófilos). Comerio *et al.*, (2007). Bacterias Adaptadas al frío.

1.4.1.1. Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos son ambientes extremos que se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de sal. Estos ambientes presentan, a más de un alto contenido de iones (factor que le atribuye la característica de ser un ambiente inhóspito para la mayoría de los microorganismos), características ambientales peculiares tales como elevadas o muy bajas temperaturas, elevados valores de pH o bajas concentraciones de oxígeno (Rodríguez – Valera, 1993).

Los suelos salinos están extendidos por todo el mundo y son aquellos que presentan una concentración superior al 0,2% de sales solubles.

Estudios realizados en suelos salinos han revelado la presencia de una diversidad de microorganismos. Dentro de los hábitats hipersalinos formados en suelos, se encuentran los desiertos de sal que están distribuidos en el mundo, en estos lugares la evaporación del agua es predominante sobre las precipitaciones (Rodríguez-Valera, 1993).

Los ambientes salinos acuáticos se caracterizan por tener una concentración de sales inorgánicas más elevada que la del agua de mar, que corresponde aproximadamente a un 3,5% de sales.

En base al origen y naturaleza de las sales presentes, se clasifican a las aguas salinas en talasosalinas (del griego *thalasso*, mar) y atalosalinas.

Las aguas talasosalinas tienen origen marino y poseen una composición salina similar a la del agua del mar, como las lagunas costeras hipersalinas, que se encuentran distribuidas por las zonas cálidas del mundo y que son aprovechadas e incluso son provocadas por el hombre, como en el caso de las salinas (Fig. 1.2).



Figura 1.2. Piscina de sal de la empresa ECUASAL en Salinas, Ecuador.

En las salinas la evaporación del agua permite la concentración de las sales, manteniendo proporciones relativas muy similares a las que se presentan en el mar. Las salinas, a más de la elevada concentración de sales, presentan más características como estar sometidas a irradiación solar, a oscilaciones de temperatura entre el día y la noche y poseer un bajo contenido en oxígeno, ya que su solubilidad en estos medios tan concentrados es mínima. Una excepción dentro de este tipo de aguas talososalinas la representa el Gran lago salado, en Utah (Estados Unidos) ya que no siendo su origen marino, mantiene una composición química similar a la del agua de mar (Rodríguez-Valera, 1993).

Las aguas atalosalinas son aquellas formadas por disoluciones de depósitos minerales de origen continental, como los lagos salados naturales, cuya concentración salina no se asemeja a la del agua de mar, los cationes predominantes en estas aguas son cationes divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} (Rodríguez-Valera, 1993). La composición iónica de estas aguas puede variar en función de las características topográficas, geológicas o climatológicas a las que estén sometidas.

Las aguas atalosalinas se encuentran en el Mar Muerto, en algunos lagos hipersalinos de la Antártida, los lagos Wadi Natru en Egipto, el lago Magadi en Kenia, entre otros (Oren, 2002).

1.4.2. Microorganismos halófilos

Los microorganismos halófilos son organismos que están especializados para vivir en ambientes salinos, el término halófilo se origina del griego *hals* (sal) y *phil* (afín) por lo que etimológicamente halófilo significa “amigo, amante de la sal”.

Los microorganismos marinos, en mayoría son por naturaleza psicrotróficos y halotolerantes, es decir capaces de crecer en temperaturas bajas y en ausencia como en presencia de sal; se han descrito microorganismos halotolerantes que crecen mejor en ausencia de concentraciones elevadas de sal (Kushner, 1978).

En los ambientes hipersalinos se han descrito diversidad de seres vivos; esta variedad varía en una función de determinados parámetros como la salinidad, la composición iónica, la solubilidad del oxígeno, el pH o la temperatura (Oren *et al.*, 1993).

1.4.2.1. Clasificación de los microorganismos halófilos según sus requerimientos salinos

Kushner y Kamekura, en 1988 propusieron categorías de microorganismos dependiendo de la concentración de sal que requieren para su crecimiento óptimo, determinado como microorganismos no halófilos a aquellos que crecen óptimamente a una concentración de NaCl inferior a 0,2M (aprox. 1% p/v). Se denominan Halófilos débiles (bacterias marinas) a los microorganismos que tienen su crecimiento óptimo en medios que contienen una concentración de NaCl de 0,2 a 0,5M (aprox. 1-3% p/v), esto es considerando que el agua de mar contiene una concentración de NaCl cerca del 3% p/v. Se definen como halófilos moderados a los microorganismos que tienen crecimiento óptimo en medios con concentraciones de NaCl de 0,5-2,5 M (aprox. 3-15% p/v). halófilos extremos son aquellos microorganismos que presentan un crecimiento óptimo en medios que contienen de 2,5-5,2 M (saturación) de NaCl, generalmente su crecimiento óptimo es a 25% p/v de NaCl (Margesin *et al.*, 2001).

Los microorganismos halófilos moderados y extremos son comunes en ambientes salinos e hipersalinos, especialmente en los ambientes que presentan una concentración de sal superior a 1,5M de NaCl, siendo predominantes las bacterias halófilas moderadas a concentraciones salinas intermedias (1,5-3M de NaCl).

Las altas concentraciones salinas afectan a la estabilidad de las proteínas, así las enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas poseen unos mecanismos específicos que las hacen permanecer estables a elevadas salinidades. Las enzimas producidas por bacterias halófilas suelen tener carácter marcadamente ácido en su superficie si se compara con las enzimas no halófilas, estos residuos ácidos contribuyen a la estabilidad de las mismas (Madigan *et al.*, 1999).

1.4.3. Importancia del aislamiento e identificación de bacterias

Para el aprovechamiento de las bacterias con propiedades y características particulares de interés industrial es necesario diferenciar los variados aislados presentes en los ambientes naturales propios de los microorganismos en estudio. Este proceso de aislamiento permite la selección de aquellas bacterias adaptadas a las condiciones que revelan las características particulares buscadas. En el presente estudio las características particulares buscadas en los aislados fueron: la capacidad halofílica y la secreción de enzimas proteolíticas. La identificación es crucial para el proceso de búsqueda y selección de las características de interés dentro de las bacterias aisladas, y culmina con la identificación taxonómica de aquellos aislados seleccionados.

1.4.4. Bacterias halófilas

La principal característica de las bacterias halófilas moderadas es la necesidad de NaCl en el hábitat, las concentraciones necesarias de sal para su crecimiento varían entre las distintas especies, se ha determinado que el requerimiento de sal en muchas bacterias halófilas moderadas aumenta con la temperatura. El rango de salinidad óptimo de crecimiento de las bacterias también se relaciona directamente con la concentración de nutrientes presentes en el medio (Cánovas *et al.*, 1996).

Los requerimientos nutricionales de las bacterias halófilas moderadas varían considerablemente entre las diferentes especies, en el laboratorio se ha determinado que uno de los medios más recomendados para su cultivo son los enriquecidos con un 0,5% de extracto de levadura (Ventosa *et al.*, 1995). La mayoría de las bacterias halófilas moderadas son sensibles a metales pesados como mercurio, plata y zinc, algunas bacterias presentan una alta tolerancia al cobalto, níquel y cadmio, la toxicidad del cadmio cobalto y cobre disminuye con el aumento de salinidad, la toxicidad del níquel y zinc disminuye en aumento de concentración de extracto de levadura presente en el medio de cultivo (Nieto *et al.*, 1993).

En las últimas décadas los estudios en ambientes hipersalinos de diferentes zonas del planeta han permitido el aislamiento y caracterización taxonómica de un elevado número de bacterias halófilas.

La mayoría de los estudios concernientes a las bacterias halófilas se han desarrollado en España, por lo que las bacterias halófilas moderadas mayormente registradas han sido aisladas de aguas talasosalinas pertenecientes a salinas españolas (Ventosa *et al.*, 1998).

La microbiota de aguas atalasosalinas mayormente estudiadas corresponde a lagos salinos alcalinos africanos y el Mar Muerto. Debido a que el Mar Muerto mantiene una composición química tan peculiar y una elevada concentración de sal, se encuentra baja proporción de microorganismos halófilos moderados (Arahal, 1997; Ventosa *et al.*, 1999). También se han estudiado los microorganismos halófilos moderados del Océano Pacífico (Kaye *et al.*, 2000).

En hábitats anaerobios se ha estudiado el Gran Lago Salado, donde las bacterias halófilas moderadas anaerobias mayoritariamente encontradas pertenecen al género *Halanaerobium*. También se han aislado bacterias de los géneros *Desulfohalobium* y *Desulfovibrio* (Tardy – Jacquenod *et al.*, 1996).

En suelos salinos también se han realizado estudios de donde se aisló bacterias halófilas cuyo rango de salinidad tolerable es de 0,9 – 20% de sales totales. Los géneros predominantes que se han identificado del suelo no son muy variables en comparación a los encontrados en muestras de aguas hipersalinas así se han identificado los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudomonas* y en menor proporción *Nesterenkonia* y *Agrobacterium* (Ventosa *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2004).

También se ha encontrado microorganismos halófilos en la superficie de las hojas de *Atriplex halimus*, una planta que secreta sal y se encuentra en los suelos salinos de Israel (Simon *et al.*, 1994).

Las bacterias halófilas moderadas representan el grupo más común de las bacterias halófilas, en los ambientes hipersalinos se encuentran en mayor frecuencia representantes de bacterias Gram negativas aerobios o anaerobios facultativos (Martínez-Cánovas *et al.*, 2004).

En un estudio en el 2004 se presentan una extensa revisión sobre las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas basados en aspectos relacionados con su ecología en los ambientes hipersalinos y sus características como microorganismos extremófilos y sus diversas e importantes aplicaciones y potencialidades en la industria y en la biotecnología dada su alta estabilidad en condiciones extremas, y se determinó que son útiles en la producción de enzimas, polímeros, solutos compatibles y en la biodegradación de residuos, así como en la producción de alimentos fermentados incluso para aprovecharlas como fábricas celulares alternativas a *Escherichia coli*, para la producción de proteínas recombinantes (Ramírez *et al.*, 2004).

Del grupo de bacterias halófilas moderadas aisladas e identificadas en diversos proyectos de investigación, se destaca el género *Pseudomonas*. Los miembros pertenecientes a esta familia son bacilos Gram-negativos rectos o ligeramente curvos, mótils por medio de flagelos polares, estrictamente aerobios y están ampliamente distribuidos en la naturaleza particularmente en ambientes acuáticos (Frerichs *et al.*, 1993).

En relación a la actividad proteolítica que se evalúa en este estudio, las bacterias del género *Pseudomonas* en varios proyectos se ha revelado una alta manifestación de la actividad de enzimas proteolíticas, como se describen en trabajos realizados en España y Perú. En España se ha aisló y caracterizó una serie de bacterias halófilas moderadas que

manifiestan actividad proteasa provenientes de salinas de Huelva, Cádiz y Almería (Sánchez-Porro *et al.* 2003), las cepas identificadas corresponden a los géneros *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* y *Bacillus*. En un proyecto posterior se seleccionó una cepa bacteriana halófila moderada proveniente de una salina de la Isla Cristina (Huelva). La cepa seleccionada tiene actividad proteasa, y se caracterizó taxonómicamente; tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico, determinado que pertenecía al género *Pseudoalteromonas*. (Sánchez – Porro *et al.* 2003).

En la investigación realizada en Perú se aisló e identificó cinco cepas de bacterias halófilas productoras de proteasas provenientes de efluentes pesqueros de una zona costera de Perú, estas cepas fueron evaluadas por su actividad proteolítica específica sobre la caseína, siendo las cepas del género *Pseudomonas* las que mayor actividad proteolítica presentaron, seguidas del género *Aeromonas* (Sánchez *et al.* 2004).

Las diferentes especies del género *Aeromonas* pueden crecer en los medios diferenciales y selectivos empleados para el aislamiento de las bacterias Gram negativas. Las bacterias del género *Aeromonas* son considerados autóctonos del medio acuático se encuentran ampliamente presentes en hábitats naturales como suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mar (Borrell *et al.*, 1998)

Las bacterias del género *Aeromonas* son descritas con menos frecuencia en los trabajos relacionados a aislamiento e identificación de halófilas moderadas, sin embargo el género es bastante nombrado en proyectos relacionados a la caracterización de exoenzimas. A las bacterias pertenecientes a este género se las ha caracterizado como bacilos cortos de 0.3-1.0 x 1.0-3.5 μm , Gram-negativos. Todas las especies excepto *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media* son móviles gracias a un flagelo polar, en general son aerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos, pueden crecer en medios que contienen 3% a 5% de NaCl.

Los miembros del género *Aeromonas* producen varias exoenzimas que degradan activamente complejos proteicos, polisacáridos, mucopolisacáridos y moléculas que

contienen lípidos (Pemberton *et al.*, 1997). Se ha descrito varias exoenzimas como: proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras descritas (Altwegg *et al.*, 1999).

El género *Agrobacterium* pertenece a un grupo de alfa-proteobacterias de la familia *Rhizobiaceae* (Ugalde, 2003). Es uno de los géneros con mayor adaptabilidad a los ambientes terrestres. Las bacterias de éste género han cobrado gran interés a nivel científico debido a la producción de metabolitos secundarios de utilidad industrial gracias a la tolerancia de éstos frente a condiciones extremas, entre ellas la alta salinidad. Se ha evidenciado también la presencia frecuente de *A. radiobacter* en ambientes marinos y la producción de biofilms con una composición polisacárida especial (Cadmus, 1993).

1.4.5. Aplicaciones industriales de las bacterias halófilas moderadas

1.4.5.1. Producción de enzimas

Una de las aplicaciones más importantes y actuales es la producción de enzimas por ejemplo hidrolasas: amilasas, lipasas, proteasas, nucleasas y pululanases. De las enzimas de bacterias halófilas se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática para la fabricación de biosensores, utilización en técnicas moleculares como PCR, entre otras); y en la industria farmacéutica y cosmética (Margesin *et al.*, 2001).

1.4.5.2. Producción de biopolímeros

Los biopolímeros tienen aplicación en la industria petrolera gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes, pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de los depósitos de petróleo, disminuyendo así su tensión superficial. Los depósitos o bolsas de petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros.

Entre las bacterias conocidas que producen biopolímeros se encuentra *Halomonas eurihalina* y en recientes estudios se ha determinado como productor de biopolímeros al género *Agrobacterium* (Mata *et al.*, 2006). Los estudios llevados a cabo con dicho biopolímero revelan su potencial en procesos de biorremediación o en la industria petrolera (Martínez-Checa *et al.*, 2002). Las soluciones de este polisacárido tienen un comportamiento pseudoplástico, son bastante termoestables y presentan una elevada viscosidad a pH ácido (Quesada *et al.*, 1993).

1.4.5.3. Solutos Compatibles

Un mecanismo de adaptación a la sal de las bacterias halófilas moderadas es la acumulación en su citoplasma de determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que no interfieren con el metabolismo celular, que se denominan solutos compatibles.

Los compuestos osmoprotectores han despertado un gran interés en la industria, ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad (Louis *et al.*, 1994).

1.4.5.4. Biorremediación

El interés en las bacterias halófilas moderadas se ha incrementado notablemente en el campo de la degradación de los residuos tóxicos ya que representan una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas; esto sucede, por ejemplo, en la producción de diversas sustancias químicas como los productos farmacéuticos, herbicidas y pesticidas, y en los procesos de extracción de petróleo y gas (Oren *et al.*, 1993).

En 1991 estudios demostraron la degradación de varios compuestos aromáticos nitro-sustituídos a concentraciones salinas de 13 a 14% por las bacterias *Halanaerobium*

praevalens y *Orenia marismortui*. También se han aislado varias cepas pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*, capaces de utilizar como fuente de carbono y energía compuestos cloroaromáticos, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, que es un herbicida tóxico y del género *Alteromonas* capaces de degradar varios compuestos tóxicos organofosforados y derivados.

En estudios anteriores se ha aislado y caracterizado un gran grupo de bacterias halófilas moderadas capaces de destoxificar o actuar como bioindicadores de ambientes hipersalinos contaminados con metales pesados (Rios *et al.*, 1998).

1.4.5.5. Otros usos potenciales

Aparte de las aplicaciones antes descritas, existe otras aplicaciones de importancia que han motivado el aislamiento e identificación de bacterias halófilas. Dentro de éstas se puede destacar la producción de carotenoides para la industria alimenticia y la recuperación de suelos áridos o semiáridos mediante la obtención de plantas transgénicas capaces de tolerar altas concentraciones de sal (Ramírez *et al.*, 2004).

1.4.6. Enzimas bacterianas extracelulares

1.4.6.1. Generalidades e importancia

Las enzimas son generalmente proteínas cuya función es la de catalizar reacciones químicas o bioquímicas con una relativamente alta especificidad sobre los reactantes o sustratos.

El estudio de las enzimas y sus aplicaciones han aumentado representativamente gracias al desarrollo de la Genética y Biología Molecular, sin embargo ya en el siglo pasado, patentaron una amilasa bacteriana capaz de eliminar el almidón de las prendas textiles. En 1979 cerca de 80% de los detergentes contenían enzimas hidrolíticas; muchas enzimas microbianas se han aislado desde entonces para utilizarlas en la industria como amilasas, proteasas, lipasas, DNAsas, celulasas isomerasas y catalasas.

Las enzimas producidas por microorganismos extremófilos se destacan por su capacidad de actuar en rangos extremos de temperatura, pH o salinidad, lo cual es beneficioso en procesos industriales y proporciona nuevas posibilidades en los procesos biocatalíticos (Eisenberg, 1995).

Al estudiar las actividades enzimáticas de las bacterias halófilas; sobretudo al relacionar la tolerancia a la sal se diferencian tres categorías enzimáticas: a) enzimas intracelulares o citoplasmáticas, que están expuestas a la baja concentración de iones y a la presencia de solutos orgánicos característicos del medio intracelular pero no están expuestas a concentraciones salinas del medio externo; b) enzimas asociadas a la membrana, en las que se incluyen las proteínas de transporte, expuestas a los dos medios extra e intracelular; c) enzimas extracelulares propiamente dichas que se encuentran con directa exposición a las concentraciones salinas externas.

1.4.6.2. Enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas

Las enzimas extracelulares provenientes de microorganismos halófilos que se han aislado y caracterizado son básicamente de los dos grupos de bacterias predominantes, las bacterias halófilas moderadas y las arqueas halófilas extremas o haloarqueas.

En el primer estudio sobre enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas se identificó una amilasa producida por *Nesterenkonia halobia*. Dos años después los mismos autores describieron una nucleasa producida por *Micrococcus varians* aislada de pasta de soja. En años subsiguientes se descubrieron amilasas y nucleasas en bacterias del género *Bacillus sp*, y se determinó su actividad óptima a una concentración de 1M de NaCl.

Otros estudios que relacionaron la salinidad con la actividad enzimática incluyeron enzimas extracelulares de la bacteria del género *Acinetobacter*, en la cual se

determinó su actividad óptima a 0,2 – 0,4 M de NaCl o KCl. Posteriormente, describieron y purificaron una haloproteasa producida por bacterias del género *Pseudomonas*.

Kamekura en 1986 realizó estudios sobre algunas enzimas producidas por varias especies halófilas moderadas y analizó el efecto de la variación de las concentraciones de sal en la producción y actividad de las mismas. Una de las proteasas mejor caracterizadas en este estudio fue la halolisina, una serina proteasa aislada de *Natrialba asiática*. También ha sido descrita la purificación de una proteasa extracelular producida por *Halobacterium salinarum* (Ryu *et al.*, 1994). En 1997 se aisló *Natronococcus occultus*, que producen una proteasa extracelular, esta proteasa fue caracterizada en el 2001 (Studdert *et al.*, 2001).

El incremento de la investigación de bacterias halófilas también se ha dado gracias a la introducción de nuevas ramas científicas como la filogenia molecular que ha permitido en recientes estudios revelar nueva información sobre la diversidad microbiana de los ambientes hipersalinos (Benlloch *et al.*, 2002).

En estudios más recientes se han aislado y caracterizado una serie de bacterias halófilas moderadas que manifiestan actividad proteolítica, provenientes de salinas de Huelva, Cádiz y Almería, en estos estudios se pudo identificar un aislado o cepa del género *Pseudoalteromonas*, productora de una haloenzima con actividad proteolítica (Sánchez – Porro *et al.*, 2003).

En muestras de efluentes pesqueros de una zona costera de Perú fueron aisladas cinco cepas de bacterias que presentaban actividad proteolítica (Sánchez *et al.*, 2004). En Tailandia fue caracterizada una cepa de *Filibacillus* sp., que es productora de una serina proteasa (Hiraga *et al.*, 2005). En un estudio más reciente, se llevó a cabo la caracterización de la proteasa halófila extracelular SptA de *Natrinema* sp., (Shi *et al.*, 2006).

En la Tabla 1.1 se enumeran las principales enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas moderadas, así como también los requerimientos de salinidad para la actividad óptima.

Tabla 1.1. Principales enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas (Sánchez – Porro *et al.*, 2003).

Enzima	Microorganismo	Concentración óptima de NaCl (%)
Amilasa	<i>Nesterenkonia halobia</i>	3-11
Nucleasa H	<i>Micrococcus varians</i>	16
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	3
Amilasa	<i>Acinetobacter</i> sp.	1-3
Proteasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	18
Nucleasa	<i>Bacillus halophilus</i>	11-17
5'-nucleotidasa	<i>Micrococcus varians</i>	12
Amilasa	<i>Micrococcus varians</i>	4,5-6
Amilasa	<i>Micrococcus</i> sp.	6
Amilasa H	<i>Halomonas meridiana</i>	10
Amilasa A	<i>Halothermothrix orenii</i>	5
Amilasa	<i>Halobacillus karajensis</i>	5
Proteasa	<i>Fillobacillus</i> sp. RF2-5	10

1.4.7. Haloenzimas proteolíticas bacterianas y su aplicación industrial

1.4.7.1. Generalidades e importancia de las enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas o proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis específica de uno o varios enlaces peptídicos dentro de una proteína, por lo que son también llamadas peptidasas.

Las proteasas intervienen en las funciones orgánicas de todos los seres vivos, desde virus, bacterias y arqueas, protozoos, metazoos, hongos, plantas y animales.

En el metabolismo las enzimas proteolíticas intervienen en procesos como el crecimiento, diferenciación celular, recambio de proteínas, maduración de enzimas y hormonas, coagulación de la sangre, lisis de coágulos de fibrina, también poseen un importante papel en la secreción de compuestos a través de las membranas celulares, entre otros más (Supuran *et al.*, 2002).

1.4.7.2. Clasificación de las enzimas proteolíticas

De acuerdo con la *Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), las proteasas pertenecen al grupo 3 (hidrolasas) y dentro de éste al subgrupo 4 (peptidasas). De acuerdo a la nomenclatura propuesta por la IUBMB, la clasificación más apropiada de las enzimas proteolíticas está basada en su acción catalítica. Según este criterio, las proteasas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas.

Se denominan **exopeptidasas** cuando hidrolizan un enlace peptídico no sustituido próximo al extremo amino o carboxi terminal del sustrato (aminopeptidasas o carboxipeptidasas). Las carboxipeptidasas a su vez se clasifican según la naturaleza de su centro activo en: serina (EC.3.4.16.-), metal (EC.3.4.17.-) y cisteína (EC.3.4.18.-) carboxipeptidasas; y un pequeño grupo que hidrolizan extremos sustituidos: omega peptidasas (EC.3.4.19.-).

Las **endopeptidasas** hidrolizan las cadenas peptídicas en las regiones internas alejadas de los extremos carboxi y amino terminal, y según la naturaleza de su centro activo se clasifican en: serina endopeptidasas (EC.3.4.21.), cisteína endopeptidasas (EC.3.4.22), aspartato endopeptidasas (EC.3.4.23.) y metalo endopeptidasas (EC.3.4.24.), y un quinto grupo de endopeptidasas de mecanismo de acción no conocido.

1.4.7.3. Aplicaciones de las proteasas extracelulares bacterianas

Además de su importancia fisiológica, este grupo de enzimas tiene un enorme interés industrial siendo ampliamente utilizado en la industria de detergentes, alimentos, bebidas, textil o papelería (Gupta *et al.*, 2002). Por otro lado, a pesar de que las proteasas

poseen una acción muy específica, es un grupo de enzimas muy diverso, por lo que resulta muy atractivo para su explotación biotecnológica.

Las estimaciones de ventas mundiales de enzimas industriales son muy elevadas, de las cuales el 75% presentan actividades hidrolíticas. Las proteasas representan uno de los tres grandes grupos de enzimas industriales y constituyen alrededor del 60% del total de las ventas mundiales. Este dominio de las proteasas en el mercado industrial se espera que continúe en aumento (Godfrey *et al.*, 1996).

En la industria farmacéutica las proteasas producidas por distintos microorganismos se usan por vía oral para la corrección de ciertos síndromes de deficiencias enzimáticas, Colagenasas y subrilisinasas son usadas junto con antibióticos de amplio espectro para tratar heridas y quemaduras; y una asparraginasas de origen bacteriano se utiliza para tratar algunas formas de leucemia linfocítica ya que elimina la asparragina del torrente sanguíneo (Rao *et al.*, 1998; Margesin *et al.*, 2001).

En la de obtención industrial de seda, la aplicación de las proteasas es muy prometedor ya que la sericina que es un componente proteico que constituye cerca de 25% del peso total de la seda salvaje cubre la periferia de las fibras de seda y se debe eliminar, sin embargo este proceso es altamente costoso, costo que disminuye radicalmente con el uso de enzimas proteolíticas.

En la industria del cuero, se emplean compuestos químicos para desprender el pelo y la piel del cuero, lo que generan residuos contaminantes para el medio ambiente, las proteasas hidrolizan selectivamente los componentes no colagenosos de la piel y eliminan las proteínas no fibrilares como globulinas y albúminas, el uso de las proteasas es una alternativa que ayuda a la eliminación de residuos y no representa contaminación (Rao *et al.*, 1998).

En la producción de alimentos fermentados las proteasas más usadas en la actualidad pertenecen a la familia de las aspartato proteasas, estas enzimas tienen diversas aplicaciones como por ejemplo en la elaboración de la salsa de soya donde se utilizan especies del género *Tetragenococcus*. Por ejemplo, *T. halophila* se emplea como indicador de la fermentación (Röling, 1996).

Rutinariamente se ha usado proteasas en la elaboración de quesos, aunque actualmente en países industrializados se producen proteínas recombinantes que son mejor adaptadas a las necesidades específicas de la fabricación de quesos, también son ampliamente usadas en la elaboración de pan ya que las proteasas hidrolizan el gluten del trigo lo que producen una masa más esponjosa y amasable (Rao *et al.*, 1998).

Otra aplicación en la industria alimenticia es la fabricación de hidrolizados proteicos, que son utilizados en la elaboración de alimentos para bebés, productos dietéticos y de hospitalización (Neklyudov *et al.*, 2000).

También se utilizan enzimas proteasas en la síntesis enzimática de péptidos como el aspartamo ya que representa ventajas respecto a la síntesis química, dado que el costo de producción química es muy elevado.

Otro uso potencial de las proteasas es en el reciclado de la plata y poliéster que se encuentra presente en productos derivados de películas fotográficas o placas de rayos X. De forma convencional se recuperaba la plata mediante quemado de las películas causando gran contaminación ambiental, y dado que la plata está unida a capas de gelatina es posible recuperarla por tratamientos enzimáticos, a más de también recuperar el poliéster. Son varias las proteasas que se están usando con este fin, ya que también ofrecen un proceso de reciclado más rentable y menos perjudicial para el medio ambiente (Gupta *et al.*, 2002).

Una de las aplicaciones más prometedoras de las haloproteasas se encuentra en el tratamiento de las bioincrustaciones. Las bioincrustaciones son formaciones de estructuras biológicas bastante rígidas y resistentes, generalmente producto de la fijación de ciertos moluscos que se adhieren a materiales metálicos que se encuentran formando parte de embarcaciones, tuberías o equipos que se encuentran en contacto con el mar. Las bioincrustaciones provocan un serio problema por ser los principales adyuvantes para la corrosión metálica. Este problema causa anualmente billones de dólares en pérdidas económicas debido en parte a las altas restricciones para el uso de potentes biocidas contaminantes del ecosistema marino. Este proceso de remoción de las bioincrustaciones es denominado “antifouling”.

Actualmente se está realizando un proyecto en Chile con el fin de generar un producto “antifouling” biocida natural de origen bacteriano, que tiene aplicación en el mantenimiento de tuberías y estructuras de los barcos y de instalaciones aledañas al mar. En dicho proyecto se propone usar proteasas halófilas para remplazar al producto actual de tal forma que se podrá disponer de productos no tóxicos para el ecosistema marino y se espera que sus resultados sean más efectivos y rápidos (Qian *et al.*, 2005).

1.5. Hipótesis

Los géneros de las bacterias halófilas con mayor actividad proteasa que se aislaron e identificaron en las muestras de las piscinas de sal son: *Pseudomonas*, *Halomonas*, y *Bacillus*.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes del proyecto

Para el desarrollo del presente proyecto se contó con la participación de las siguientes empresas: ECUASAL S.A, donde fueron recolectadas todas las muestras; CENTROCESAL CIA. LTA., donde se realizaron los ensayos microbiológicos para el aislamiento de bacterias halófilas; y el Hospital de la Policía Nacional, donde se realizaron los ensayos de identificación.

2.2 Zona de estudio

Las muestras utilizadas para el desarrollo del presente proyecto fueron obtenidas de las piscinas de sal de la industria ECUASAL localizadas en la provincia de Santa Elena (ver ANEXO C).

2.3 Periodo de experimentación

El desarrollo de la parte experimental del proyecto fue iniciado el 27 de Junio del 2007 y fue finalizado el 11 de Septiembre del 2007.

2.4 Muestreo, tratamiento y conservación de muestras.

El primer paso para el proceso experimental es el planteamiento del diseño de muestreo con el fin de determinar el tamaño de muestra requerida para que los resultados sean estadísticamente significativos.

2.4.1 Diseño:

Las fórmulas utilizadas para determinar el tamaño de muestra se detallan a continuación:

$$n = s^2/b^2 \quad \text{y} \quad s^2 = P(1-p)$$

Donde:

n = número de muestra

s^2 = variancia de la muestra esperada

b^2 = variancia de la población

$b^2 = se^2$

se^2 = Error estándar

P = probabilidad

p = complemento

En fórmulas:

$$P = (1-p)$$

$$se = 0,05$$

$$p = 0,867$$

$$P = (1 - 0,867)$$

$$P = 0,133$$

$$n = s^2/b^2$$

$$n = 0,867 * 0,133 / (0,05)^2$$

$$n = 46,1$$

Los datos referencias para los cálculos realizados fueron obtenidos del trabajo de Sánchez *et al.*, 2004, en el que se obtuvieron 26 aislados bacterianos con actividad proteolítica de 30 aislados de bacterias halófilas encontradas lo que representa un porcentaje de probabilidad del 86,6%.

El número de muestra determinado estadísticamente es 46, pero se aproximó a 48 para destinar tres salidas y en cada una se obtendrán 16 muestras.

2.4.2 Muestreo

Se realizaron tres muestreos en Junio, Julio y Agosto de 2007 en las piscinas de sal de la industria ECUASAL. Se obtuvieron 48 muestras en total, en cada salida o fase como se las llamará en adelante, se obtuvieron 16 muestras de agua provenientes de 2 piscinas correspondientes al proceso de evaporación (Fig. 2.1a); y 14 muestras de las piscinas del proceso de cristalización (Fig. 2.1b).

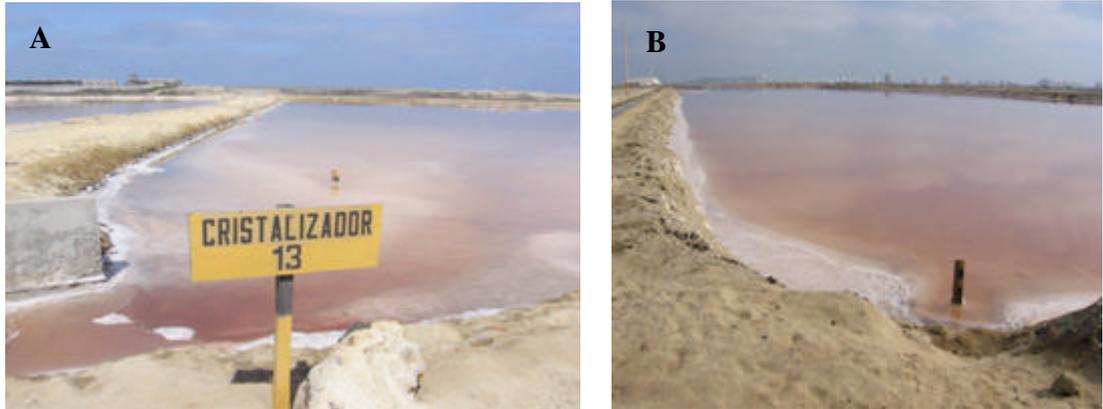


Figura 2.1. Piscinas de la Industria ECUASAL. **A)** Piscina del proceso de cristalización. **B)** Piscina del proceso de evaporación.

2.4.3 Toma de muestras para la FASE 1, 2 y 3:

Las muestras fueron recolectadas a 1m de la orilla en fundas plásticas de polietileno estériles con sello hermético y de 300ml de capacidad (Fig. 2.3).



Figura. 2.3. Toma de muestras de agua de las piscinas de sal.

2.4.4 Preservación de las muestras y almacenamiento

Las muestras de agua se preservaron con hielo durante su transporte al laboratorio del CENTROCESAL localizado en la ciudad de Quito y se las almacenó en refrigeración hasta su uso que no excedió las 24 horas.



Figura 2.4. Almacenamiento de las muestras de agua.

2.4.5 Medición de Salinidad del agua de las piscinas de sal.

La salinidad es una medida de la cantidad de sales disueltas en agua. Una de las características del agua de mar es su alto contenido de sales, el cual es muy constante pues solo varía entre 33 y 37g/kg de agua. Las sales principales disueltas son los cloruros, sulfatos y carbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio, de los cuales el sodio es el que influye con mayor intensidad sobre la densidad de la mezcla (Rol de Lama *et al.*, 2004).

Para la medición de la salinidad en las piscinas de sal se utilizó un hidrómetro que permite medir la densidad total del agua. Debido a que la densidad aumenta proporcionalmente a la concentración de solutos disueltos (principalmente de sodio), el valor entregado por el hidrómetro es un parámetro convertible a valores de salinidad del agua. La salinidad se midió utilizando un Hidrómetro Fisherbrand Cat N 11-583D y se realizó directamente en las piscinas de sal.

2.5 Aislamiento de bacterias halófilas.

Para el cumplimiento del primer objetivo del proyecto se realizó un proceso de aislamiento utilizando medios de cultivo selectivos para garantizar el crecimiento de bacterias halófilas moderadas. En el ANEXO B se presenta un esquema general del proceso de aislamiento e identificación que se realizó en este proyecto.

2.5.1 Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias halófilas.

Para mantener las condiciones químicas propias de los medios marinos, los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias halófilas fueron complementados con una solución de sales denominada SW. Las sales que componen esta solución mantienen las concentraciones relativas al agua de mar, pero con una disminución de CaCl_2 y NaHCO_3 . Para la adición de esta mezcla de sales a los medios de aislamiento se preparó un stock de SW concentrado al 30%, denominado SW30 (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Composición detallada para la preparación de la solución SW30, (Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

Compuesto	Cantidad
Cloruro de Sodio	234,0 g
Cloruro de Magnesio hexahidratado	39,0 g
Sulfato de Magnesio heptahidratado	61,0 g
Cloruro de Potasio	6,0 g
Bromuro de Sodio	0,7 g
Carbonato Ácido de Sodio	0,2 g
Cloruro de Calcio dihidratado	1,0 g
Agua Destilada	1000 ml
pH final	8,0

Para la preparación de los medios de cultivo que se utilizaron en el aislamiento de bacterias halófilas la solución SW fue llevada a una concentración del 5% a partir de la solución stock SW30. A los medios realizados se los identificó denotándolos como SW5 (Modificado de Sánchez *et al.*, 2004).

El pH de los medios de cultivo se mantuvo a 8.0, y la esterilización se realizó en un autoclave a 121° C de temperatura durante 20 minutos.

2.5.2 Método de aislamiento

Para el aislamiento de bacterias halófilas a partir de las muestras obtenidas se sembró 1 ml de muestra en caldo de cultivo nutritivo TSB complementado con SW5. Los medios inoculados se incubaron a 35°C por 48 horas.

En la segunda fase de aislamiento, de cada muestra con crecimiento en el caldo de cultivo se realizaron tres diluciones seriadas al décimo (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) utilizando como diluyente solución salina estéril (Fig. 2.5). Para la siembra se utilizó el método de estriado en medio TSA complementado con SW5 y se incubó a 35°C por 48 horas (Modificado de Sánchez *et al.*, 2004).

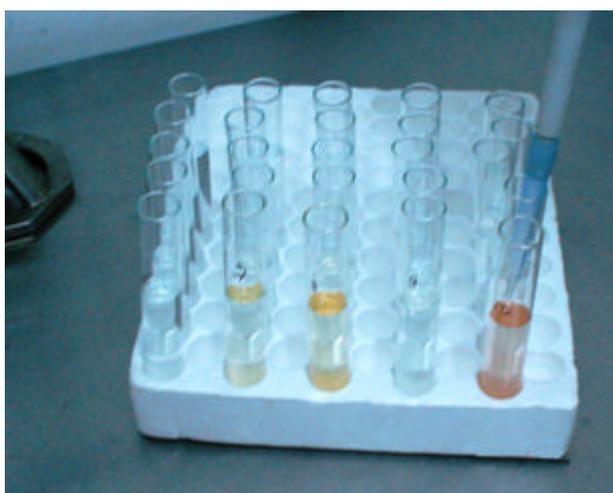


Figura 2.5. Preparación de las diluciones a partir de las muestras con crecimiento en caldo de cultivo complementado con SW5.

El grado de crecimiento de las bacterias en los diferentes medios de cultivo se definió de la siguiente manera: No crecimiento (-); Crecimiento tenue (+); y Buen crecimiento (++) (Sánchez *et al.*, 2004).

2.6 Caracterización de los aislados de bacterias halófilas

El primer paso para la identificación bacteriana fue la determinación del tipo de metabolismo que presentaron los aislados según la utilización del oxígeno como aceptor de electrones; para determinar esto se realizó la prueba de la reacción citocromo oxidasa. Como segundo paso se determinó la composición de la pared celular bacteriana mediante tinción Gram.

2.6.1 Prueba de reacción citocromo oxidasa en microorganismos

La prueba de reacción de citocromo oxidasa permitió identificar aislados con un metabolismo oxidativo de tipo aerobio estricto o aerobio facultativo. Se realizó la prueba de citocromo oxidasa utilizando varillas indicadoras Bactident[®] Oxidasa (Merck). La zona reactiva de la tira contiene dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1 µmol y 1-naftol 1,0 µmol, los cuales permiten una evaluación colorimétrica de la actividad enzimática.

Para la realización de la prueba se tomó una colonia aislada del medio TSA+SW5 con el asa de inoculación, se aplicó la colonia sobre la zona reactiva frotando el asa de inoculación. Al cabo de 20 a 60 segundos se comparó la coloración de la tira con la escala colorimétrica. En el caso de los microorganismos citocromo oxidasa-positivos la zona cambio de color a azul o violeta azulado.

2.6.2 Tinción de Gram

Es la tinción diferencial más comúnmente empleada en bacteriología. Esta técnica permitió la diferenciación de las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

2.7 Determinación de la actividad proteolítica

Para determinar la actividad proteolítica de los aislados halófilos, se procedió a la siembra en medio agar caseína complementado con la solución SW5 y enriquecido con extracto de levadura y proteasa peptona. Se determinó la actividad proteolítica midiendo los diámetros de los halos formados producto de la hidrólisis del medio con caseína.

2.7.1 Medio de cultivo para determinar la actividad proteolítica.

El medio de cultivo utilizado fue Agar caseína complementado con la solución SW5, que contiene leche desnatada en polvo (Nestlé Svelty), 0,5% de extracto de levadura, y 1% de proteasa peptona (Difco).

La leche desnatada en polvo se preparó por separado al 10%, se esterilizó a 112°C durante 15-30 minutos para evitar la caramelización, tras previo enfriamiento a 55-60° C, se mezclaron homogéneamente ambas soluciones y se procedió a distribuir el medio en cajas petri plásticas, posterior a la siembra se incubaron a 35°C durante 96 horas (modificado de Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

2.7.2 Selección de bacterias halófilas con actividad proteolítica.

El comportamiento proteolítico de los aislados se analizaron para su selección según el tamaño de los halos de actividad (mm de diámetro) según lo propuesto por Sánchez *et al.*, 2004 (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Tamaños de halo de actividad (Sánchez *et al.*, 2004).

-	No evidencia halo
+	tamaño del halo menor a 2mm
++	Aproximado 10 mm
+++	Aproximado 15 mm
+++ +	Aproximado 20 mm
+++ +	Aproximado 25 mm

2.8 Identificación de los géneros predominantes de bacterias halófilas con actividad proteolítica.

La identificación de los géneros predominantes se realizó mediante la aplicación de las pruebas API20 NE, específicas para bacterias aerobias Gram negativas no enterobacterias.

2.8.1 Prueba API 20 NE

El API 20 NE BioMérieux es un sistema para la identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias. El sistema está estandarizado, y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El kit consta de una galería con 20 microtubos que contienen medios y/o sustratos en forma deshidratada (fig. 2.5).



Figura 2.5. Pruebas API 20 NE usadas para la identificación de los géneros de bacterias halófilas que presentaron mayor actividad proteolítica.

Las pruebas convencionales, se inocularon con una suspensión bacteriana del aislado a analizar en solución salina. Tras un periodo de incubación de 24-48 horas a 30°C se pudo observar virajes de color en el medio, bien directamente o tras adición de reactivos como se detalla más adelante. Las pruebas convencionales presentes en el sistema API 20 NE se describen a continuación:

- **NO₃**: Reducción de NO₃; producción de N₂. Se añaden los reactivos NIT 1 (0.8g ácido sulfanílico + 100ml ácido acético 5N) y NIT 2 (0,6 g N-N-dimetil-1-naftilamina + 100ml ácido acético 5N). Tras 5 minutos de reacción un color rojo indica reacción positiva. Una reacción negativa (ausencia de color) puede deberse a la producción de nitrógeno; para comprobarlo se añaden 2-3mg de Zn (metal). Si tras otros 5 minutos no se aprecia cambio de color la reacción es positiva; si vira al rojo la reacción es negativa.
- **TRP**: Degradación de triptófano hasta indol. Añadir una gota del reactivo INDOL (5 p-dimetil aminobenzaldehído + 75ml alcohol isoamílico + 25ml HCl 37%). La aparición de un color rosa es indicativa de resultado positivo.
- **GLU**: Fermentación de glucosa. Cubrir la ventana del microtubo tras su inoculación con aceite de parafina para proporcionar un ambiente anaeróbico. El medio es azul-verdoso; un viraje al amarillo supone reacción positiva.
- **ADH**: Producción de arginina dihidrolasa. Cubrir la ventana del microtubo tras su inoculación con aceite de parafina para proporcionar un ambiente anaeróbico. El medio es amarillo; un viraje hacia el naranja-rosa-rojo indica test positivo.
- **URE**: Hidrólisis de urea (producción de ureasa). Cubrir la ventana del microtubo tras su inoculación con aceite de parafina para proporcionar un ambiente anaeróbico. El medio es amarillo; un viraje hacia el naranja-rosa-rojo indica prueba positiva.
- **ESC**: Hidrólisis de esculina (producción de β -glucosidasa). El medio es amarillo; el viraje hacia el gris-marrón-negro es indicativo de reacción positiva.
- **GEL**: proteasas. El medio contiene gelatina y tinta china. Si la bacteria a analizar produce proteasas capaces de hidrolizar el sustrato, la tinta china difunde, obteniéndose una prueba positiva. En caso contrario la reacción es negativa.
- **PNPG**: β -galactosidasa. El medio contiene p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido. En caso de existir producción de β -galactosidasa el medio vira de incoloro a amarillo.

Las pruebas de asimilación se inocularon con un medio mínimo, y se observó crecimiento bacteriano cuando el aislado a analizar era susceptible de utilizar el sustrato correspondiente. La reacción positiva en estas pruebas se manifestó presentando turbidez en sus celdas.

Las pruebas de asimilación presentes en el sistema API 20 NE son básicamente:

- **GLU:** Asimilación de glucosa.
- **ARA:** Asimilación de arabinosa.
- **MNE:** Asimilación de manosa.
- **MAN:** Asimilación de manitol.
- **NAG:** Asimilación de N-acetil-glucosamina.
- **GNT:** Asimilación de gluconato.
- **CAP:** Asimilación de caprato.
- **ADI:** Asimilación de adipato.
- **MLT:** Asimilación de malato.
- **CIT:** Asimilación de citrato.
- **PAC:** Asimilación de fenil-acetato.
- **OX:** Presencia de oxidasas

La lectura del API fue realizada sumando las pruebas positivas por tríos y se obtuvo un número clave que sirvió para identificar el género de los aislados analizados, el código fue encontrado en un catálogo que contiene todos los posibles códigos que se pudieran obtener y que responden a un determinado género bacteriano.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Medición de Salinidad del agua de las piscinas de Sal

Los valores de salinidad que se obtuvieron en el primer muestreo se presentan en la tabla 3.1. Cada muestra y su respectivo valor de salinidad en las cuales posteriormente se identificaron los géneros de interés, se encuentran resaltadas con diferente color. Se pudo observar que el rango de salinidad de estas muestras de interés se encuentra entre los 232 y 242 g/L (23,2 – 24,2 % de sales disueltas).

Tabla 3.1. Valores de salinidad obtenidos en el primer muestreo realizado en las piscinas de ECUASAL

MUESTREO	MUESTRA	SALINIDAD (g/L)	MUESTREO	MUESTRA	SALINIDAD (g/L)	MUESTREO	MUESTRA	SALINIDAD (g/L)
1	1	200	2	1	200	3	1	200
	2	206		2	200		2	206
	3	224		3	226		3	230
	4	226		4	228		4	228
	5	228		5	228		5	236
	6	242		6	230		6	240
	7	234		7	244		7	232
	8	232		8	236		8	232
	9	236		9	236		9	228
	10	234		10	230		10	234
	11	230		11	232		11	228
	12	240		12	238		12	238
	13	236		13	236		13	240
	14	238		14	232		14	238
	15	238		15	224		15	224
	16	238		16	234		16	232

3.2 Aislamiento de bacterias halófilas.

Después de las 48 horas de incubación de las muestras en caldo nutritivo (TSB+SW5) se determinó el crecimiento bacteriano por observación directa del aumento en la turbidez del medio (Fig. 3.1).



Figura 3.1. Crecimiento bacteriano en caldo de cultivo TSB+SW5 luego de 48 horas de incubación.

Las características del caldo de cultivo se evaluaron como se indicó en la sección 2.6.2 obteniendo como resultado crecimiento bacteriano en 29 muestras que representa el 60,42% del total de muestras tomadas (Fig. 3.1).

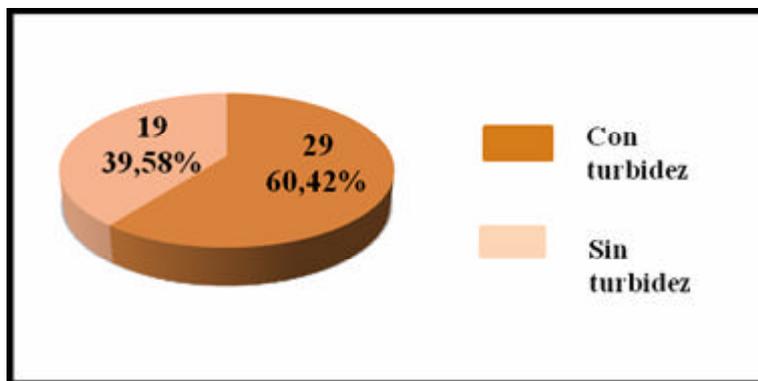


Figura 3.2. Porcentaje de muestras que presentaron turbidez a las 48 de incubación a 35°C en caldo de cultivo complementado con la solución SW5.

Otra característica observada en las muestras incubadas en caldo de nutritivo TSB+SW5 fue la presencia de un sobrenadante viscoso que se encontró en el 39,58% del muestreo total (Fig. 3.2).

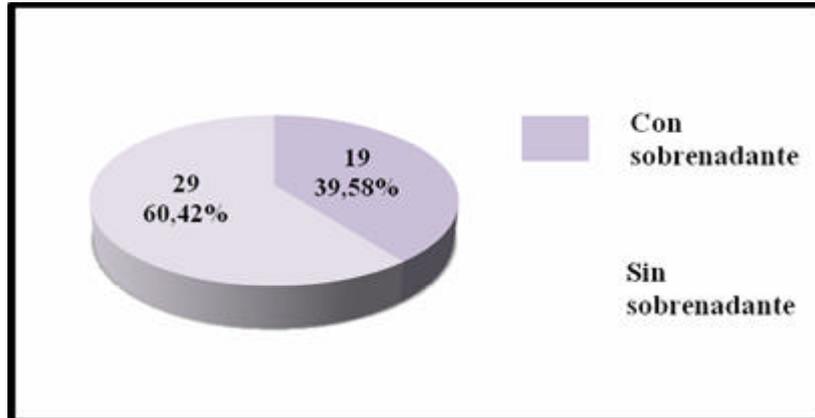


Figura 3.2. Porcentaje de muestras que presentaron sobrenadante en las muestras incubadas a las 48 horas a 35°C en caldo de cultivo TSB complementado con la solución SW5.

La formación de precipitado es otra característica que se presentó a las 48 horas de incubación a 35°C. El 20,83% de todas las muestras obtenidas presentaron precipitado purulento en el caldo nutritivo TSB+SW5 (Fig 3.3).

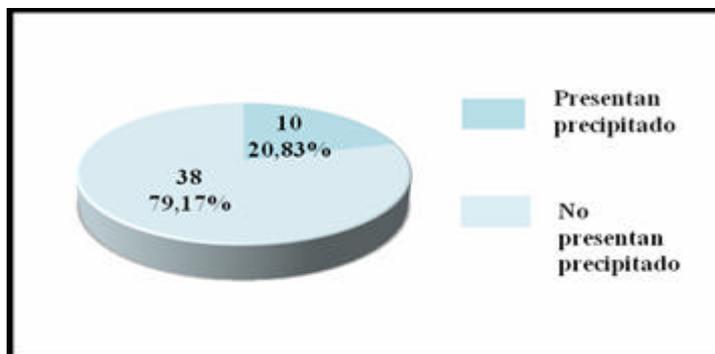


Figura 3.3. Porcentaje de muestras que presentaron precipitado a las 48 de incubación a 35°C en caldo de cultivo complementado con la solución SW5.

Cada una de las características que se presentó en el caldo nutritivo TSB+SW5 a las 48 horas de incubación a 35°C se detalla en la figura 3.4; donde se indica los porcentajes de ausencia y presencia escasa o abundante de cada característica presentes en relación al total de muestras realizadas.

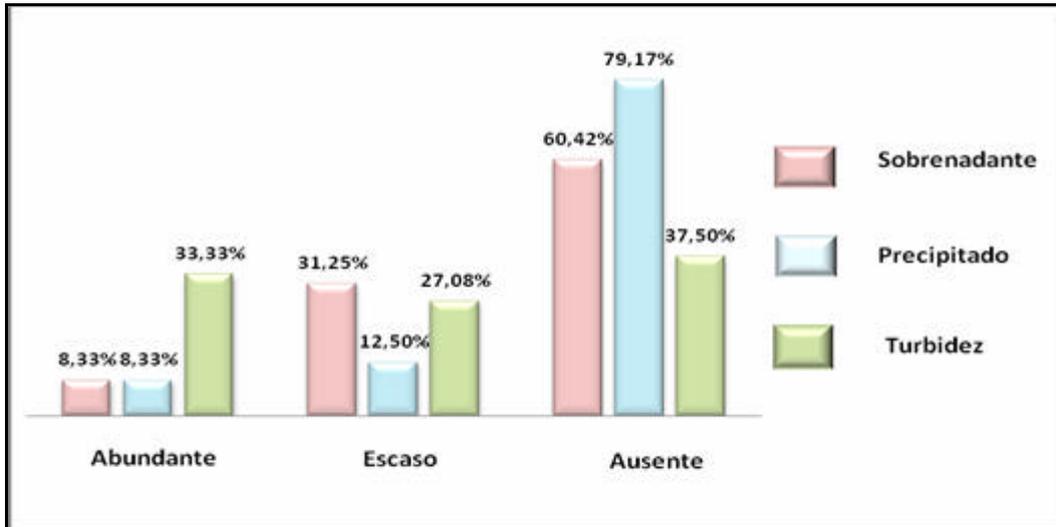


Figura 3.4. Porcentaje de muestras que presentaron precipitado a las 48 de incubación a 35°C en caldo de cultivo complementado con la solución SW5.

En la segunda fase de aislamiento en donde se realizó la siembra de las diluciones seriadas en medio TSA+SW5 el mayor porcentaje de crecimiento (60,41%) en relación con el total de muestras tomadas, fue observado en la dilución 10^{-1} . En la figura 3.5 se detalla los porcentajes de crecimiento bacteriano en las tres diluciones realizadas.

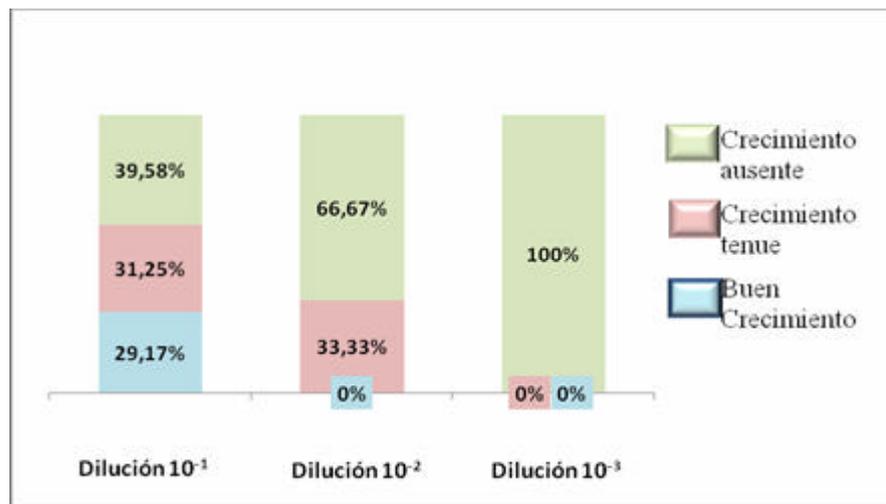


Figura 3.5. Porcentaje de crecimiento bacteriano que presentaron a las 48 de incubación a 35°C en medio TSA +SW5 las muestras en las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

3.3 Caracterización de los aislados halófilos

3.3.1 Prueba de citocromo oxidasa en microorganismos

Luego de realizar la prueba de citocromo oxidasa en las muestras aisladas se observó un resultado colorimétrico positivo (coloración azul) en las varillas indicadoras en 19 muestras (65,5%) de los aislados bacterianos (29 aislados). Los 10 aislados restantes (34,5 %) no presentaron ningún cambio en la coloración de la zona de reacción de las bandas (citocromo oxidasa negativas).

Los resultados de este ensayo se representan en la figura 3.6.

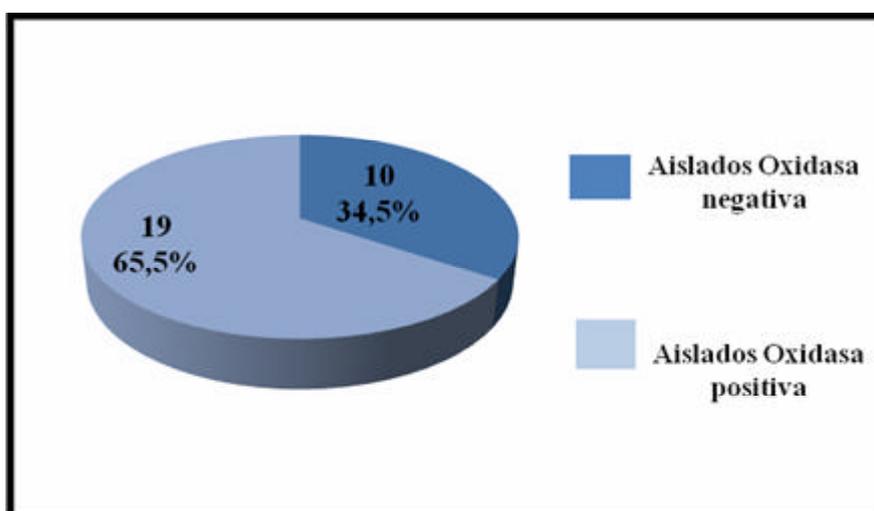


Figura 3.6. Porcentaje de halófilos aislados de reacción citocromo oxidasa positiva y negativa.

3.3.2 Tinción de Gram

El 63,2% de las bacterias halófilas con reacción oxidasa positiva correspondió a bacilos con tinción de Gram negativa (12 aislados), y el 36,8% restante correspondió a bacilos con tinción de Gram positiva (7 aislados) (Fig. 3.7).

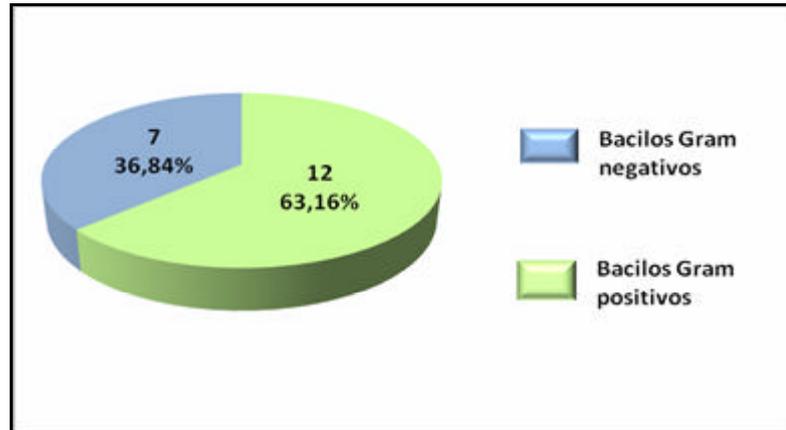


Figura 3.7. Porcentaje de bacterias halófilas Gram negativas y Gram positivas.

3.4 Selección de bacterias halófilas con actividad proteolítica.

El 55,17% (16 aislados) de las bacterias que presentaron crecimiento bacteriano en el caldo de cultivo mostraron actividad proteolítica. Esto se evidenció por la formación de halos de degradación alrededor de los aislados bacterianos. Se valoraron los seis patrones cuantitativos de degradación propuestos por Sánchez *et al.* (2004). Estos seis patrones cuantitativos correspondieron a lo descrito en la tabla 2.2.

Se encontró cuatro aislados con actividad proteolítica con un crecimiento sostenido en el halo de degradación durante todo el periodo de incubación, y cuatro aislados cuya actividad proteolítica se manifestó a las 48 horas de incubación.

De los ocho aislados que manifestaron actividad proteolítica seis presentaron halos menores a 2 mm, dos aislados correspondieron a bacilos Gram positivos, los cuatro restantes fueron bacilos Gram negativos.

Se encontraron dos aislados bacterianos correspondientes a bacilos Gram positivos que formaron halos con diámetros aproximados a los 10 mm (Fig. 3.8).



Figura. 3.8. Halo de diámetro menor a 10 mm.

Tres aislados presentaron halos aproximados a 15 mm. En la Figura. 3.9 se observa el halo de un aislado que presentó un diámetro aproximado a 15 mm.

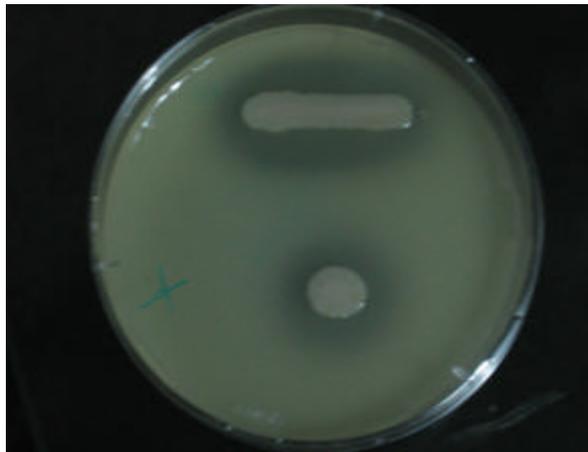


Figura. 3.9. Halo de diámetro aproximado a 15 mm.

Dos aislados bacterianos presentaron halos aproximados a los 20 mm. En la fig. 3.10 se observa el halo de un aislado que presentó un diámetro de formación aproximadamente de 20 mm.

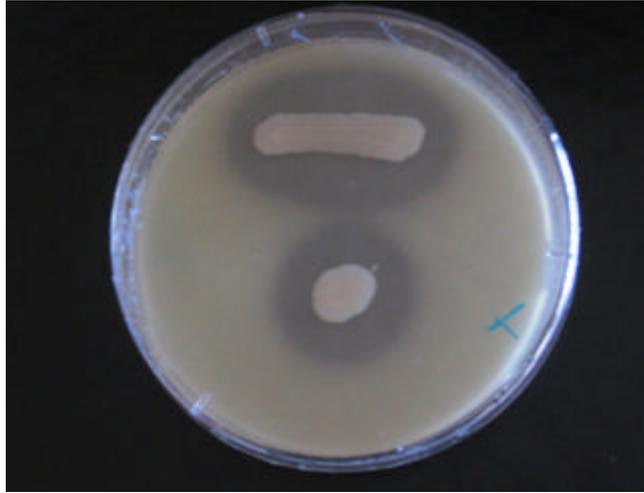


Figura. 3.10. Halo de diámetro aproximado a 20 mm.

Tres aislados presentaron halos superiores a los 25 mm. En la figura. 3.11 se observa el halo de un aislado que presentó un diámetro de halo superior a los 25 mm.



Figura. 3.11. Halo de diámetro aproximado a 25 mm.

El 50% (8 aislados) del total de bacterias que presentaron actividad proteolítica manifestó halos superiores a los 15 mm. Todos estos aislados correspondieron a bacilos

Gram negativos. Debido a su superior actividad proteolítica en relación al restante de aislados evaluados, los ocho fueron seleccionados para su posterior identificación

3.5 Identificación de bacterias halófilas con actividad proteolítica

Los ocho aislados seleccionados por su mayor actividad proteolítica (halos mayores a 15 mm) fueron identificadas por medio del sistema API 20NE.

Se determinaron tres códigos de identificación correspondientes a los géneros bacterianos: *Pseudomonas* sp., (0410004), *Aeromonas* sp., (3010044), *Agrobacterium* sp., (1777745). A continuación se describen las pruebas positivas para cada uno de los géneros identificados:

- Para el género *Aeromonas*, las pruebas positivas fueron: Reducción de NO₃, Degradación de triptófano hasta indol, producción de proteasas, asimilación de malato, presencia de oxidasas.

- Para el género *Agrobacterium*, las pruebas positivas fueron: Reducción de NO₃, Producción de arginina dihidrolasa, Hidrólisis de urea (producción de ureasa), Hidrólisis de esculina (producción de β -glucosidasa), producción de β -galactosidasa, asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil- glucosamina, gluconato, malato, citrato, y presencia de oxidasas.

- Para el género *Pseudomonas*, las pruebas positivas fueron: Reducción de NO₃, hidrólisis de esculina (producción de β -glucosidasa), producción de β -galactosidasa, producción de proteasas, y presencia de oxidasas.

En la tabla 3.2 se resume el perfil de identificación para cada género encontrado.

Tabla 3.2. Pruebas de Identificación API 20 NE

PRUEBA	Género		
	<i>Aeromonas</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
NO3	+	+	+
TRP	+	-	-
GLU	-	-	-
ADH	-	+	-
URE	-	+	-
ESC	-	+	+
GEL	+	+	+
PNG	-	+	+
GLU	-	+	-
ARA	-	+	-
MNE	-	+	-
MAN	-	+	-
NAG	-	+	-
MAL	-	+	-
GNT	-	+	-
CAP	-	-	-
ADI	-	-	-
MLT	+	+	-
CIT	-	+	-
PAC	-	-	-
OX	+	+	+

A continuación se detalla los resultados de cada género analizados en función del crecimiento del diámetro de sus halos.

3.5.1 Género *Pseudomonas*

Se encontraron cuatro aislados del género *Pseudomonas*: uno del primer muestreo (AP1M1), uno del segundo muestreo (AP2M2) y dos del tercer muestreo (AP3M3 y AP4M3).¹ Los aislados AP1M1, AP2M2 y AP3M3, manifestaron crecimiento del halo con

¹ En la nomenclatura adjunta para la diferenciación de los cuatro aislados del género *Pseudomonas*, AP indica el número de aislado y M indica el número de muestreo del cual fue aislada.

una tendencia lineal. Esto significa que el tamaño del halo se incrementó de forma continua en función del tiempo, siendo los incrementos de crecimiento de halo: 0,254, 0,300 y 0,304 por hora, respectivamente. El coeficiente de determinación fue de 0,98 para los tres aislados.

El cuarto aislado bacteriano del género *Pseudomonas* encontrado en el tercer muestreo (AP4M3) presentó una tendencia cuadrática cuya ecuación fue $y = -0,002x^2 + 0,382x + 0,914$ y cuyo coeficiente de determinación es de 0,969. Se pudo observar que luego de las 48 horas de incubación el crecimiento tuvo una tendencia a estabilizarse. Este aislado fue el que menor diámetro de halo produjo en comparación con los tres aislados anteriores analizados (Fig. 3.12).

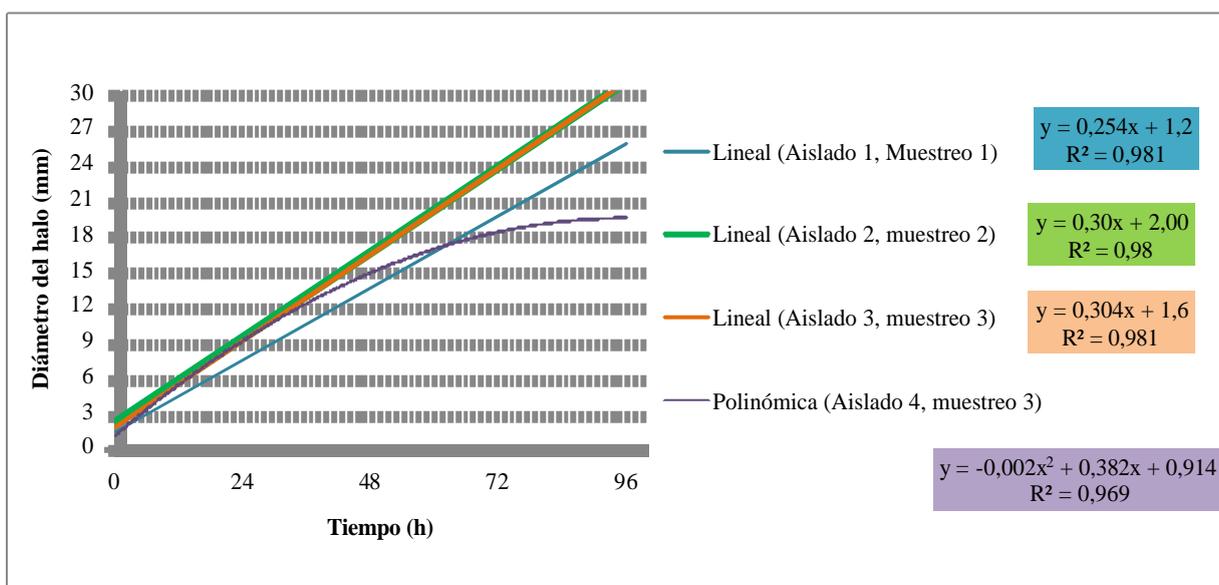


Figura 3.12. Crecimiento del diámetro del halo en función del tiempo, para los aislados del género *Pseudomonas* (AP1M1, AP2M2, AP3M3 y AP4M3), identificados en los tres muestreos realizados.

3.5.2 Género *Agrobacterium*

Se encontraron dos aislados del género *Agrobacterium*: uno se aisló del primer muestreo (AAg1M1) y otro aislado que fue encontrado en el segundo muestreo

(AAg2M2). Ambos aislados de este género presentaron en su crecimiento líneas de tendencia cuadráticas. Sus ecuaciones se representan en la figura 3.13. En el aislado AAg1M1 se pudo observar que a partir de las 24 horas de incubación muestra un incremento mayor de halo por cada hora, en relación al aislado AAg2M2. Los coeficientes de correlación de los aislados fueron de 0,973 y 0,986 respectivamente.

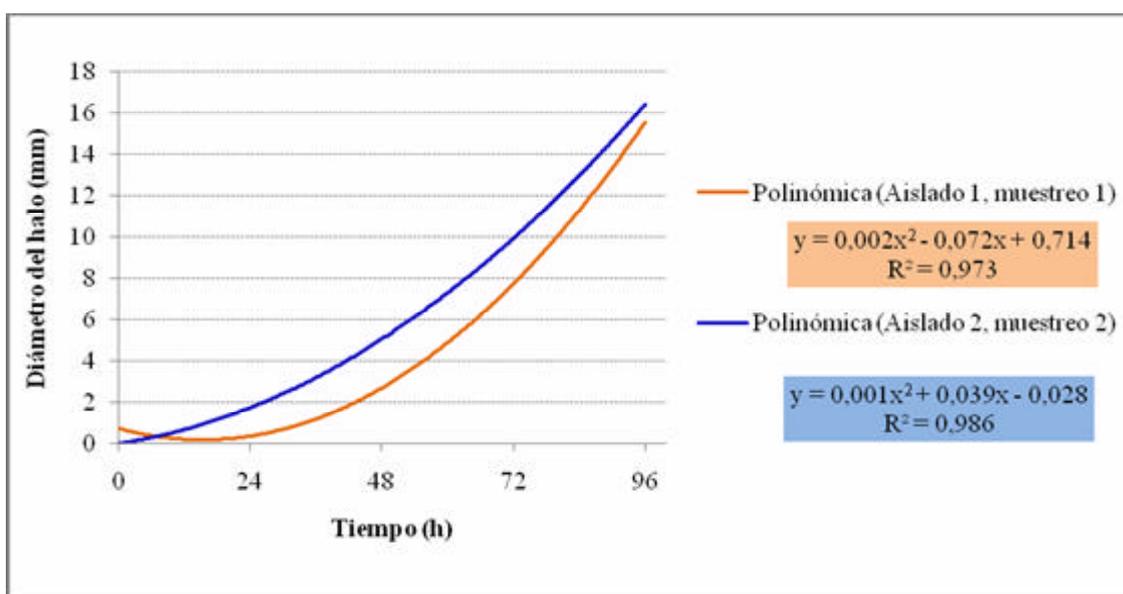


Figura 3.13. Crecimiento del diámetro del halo en función del tiempo, para los aislados del género *Agrobacterium* (AAg1M1 y AAg2M2) identificados en los dos primeros muestreos realizados.

3.5.3 Género *Aeromonas*

Se encontraron dos aislados del género *Aeromonas*, un aislado perteneciente al primer muestreo (AA1M1) y el otro aislado perteneciente al tercer muestreo (AA2M3). Ambos aislados presentaron una tendencia lineal, lo que representa que el incremento en el diámetro del halo en función del tiempo fue continuo.

Los incrementos en el diámetro del halo fueron de 0,204 y 0,187 respectivamente. Los coeficientes de determinación que presentaron fueron de 0,972 para el aislado AA1M1 y 0,951 para el aislado AA2M3 (Fig. 3.14).

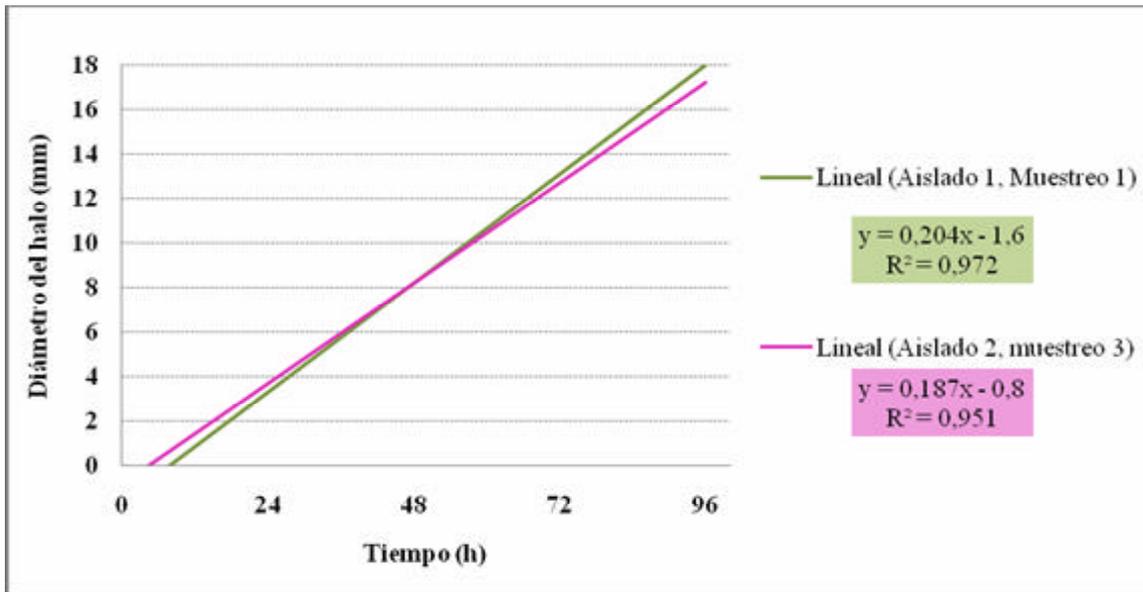


Figura 3.11. Crecimiento del diámetro del halo en función del tiempo, para los géneros *Aeromonas* (AA1M1 y AA2M3) identificados en el primer y tercer muestreo.

3.6 Relación de los resultados obtenidos

Se relacionaron los géneros identificados en cada muestreo según las condiciones de salinidad y el tamaño de sus halos de degradación, tal como se presentan en la figura 3.12.

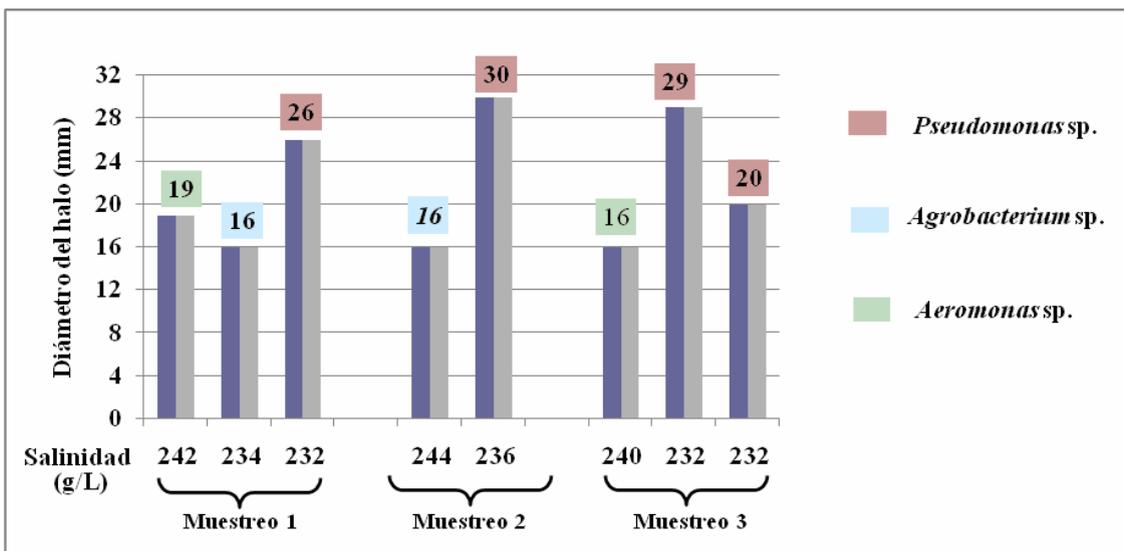


Figura 3.12. Representación de los tres muestreos realizados y la salinidad del agua en la que se encuentran los géneros predominantes vs el diámetro del halo formado.

Como se aprecia en la figura, el género identificado que produjo los mayores halos de degradación fue el género *Pseudomonas*, el cual estuvo representado por cuatro aislados en los tres muestreos y provenientes únicamente de piscinas del proceso de cristalización. Tres aislados de este género (AP1M1, AP2M2 y AP3M3) presentaron diámetros de degradación superiores a los 25 mm, y éstos fueron aislados del cristalizador 6 de forma independiente en los tres muestreos. El aislado AP4M3 proveniente del tercer muestreo presentó un halo de degradación aproximado de 20 mm. Solo un aislado de éste género (AP2M2) fue aislado de una muestra con un valor de salinidad de 236 g/L; los tres aislados restantes fueron provenientes de muestras con un valor de salinidad de 232 g/L.

Los dos aislados del género *Aeromonas* identificadas (AA1M1 y AA2M3) fueron originarios del cristalizador 4. El aislado AA1M1 presentó un halo de degradación aproximado a 20 mm; la salinidad de la muestra del que fue aislado fue de 242 g/L. Por otro lado, el aislado AA2M3 presentó un halo de degradación aproximado a 15 mm; la salinidad de la muestra de la que provino este aislado fue de 240 g/L.

Los dos aislados del género *Agrobacterium* identificados (AAg1M1 y AAg2M2) fueron provenientes del cristalizador 5. Ambos aislados presentaron un halo de degradación aproximado a los 15 mm; sin embargo las salinidades de las muestras de las que fueron provenientes estos aislados fueron de 234 g/L (para AAg1M1) y 244 g/L (para AAg2M2).

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Toma de muestras de las piscinas de sal

Para la toma de muestras se utilizaron fundas de polietileno dado que ocupan menos espacio para trasportarlas y que actualmente son utilizadas para recolección de muestras de fluidos (Eaton *et al.*, 1995).

4.2 Medición de Salinidad del agua de las piscinas de Sal.

Gracias a los resultados obtenidos en la medición de salinidad se pudo demostrar que las muestras analizadas tuvieron un rango de concentración de sales de 20 a 24% (3.4 – 4.1 M). No se han reportado estudios en los que se utilicen muestras con este rango de concentraciones de sales disueltas, utilizándose por lo general rangos que van desde 3% hasta 19% (Sánchez – Porro *et al.*, 2003). El aislamiento a partir de muestras con un rango de salinidad elevado y más homogéneo puede predecir un limitado espectro de aislamiento, pero también implica un proceso menos laborioso y libre de contaminación.

Como se observó en los ensayos posteriores, las muestras de las cuales se pudo aislar bacterias halófilas provinieron únicamente de cristalizadores (rango de salinidad 232-244 g/L) y no de evaporadores (salinidad < 200 g/L). Esto podría implicar que el tiempo necesario para el proceso de cristalización es crucial para el aumento de biomasa de bacterias halófilas moderadas.

4.3 Aislamiento de bacterias halófilas.

La primera fase de aislamiento consistió en una bioestimulación de las muestras en caldo TSB+SW5 (NaCl 5%). La bioestimulación fue muy necesaria ya que la concentración de biomasa en la microflora de los ambientes hipersalinos es generalmente baja debido a las condiciones extremas del medio. En este ensayo se realizaron valoraciones cualitativas del caldo de cultivo con el fin de determinar el aumento de biomasa. Estas valoraciones fueron necesarias ya que los análisis espectrofotométricos

fueron muy poco homogéneos dadas las modificaciones de coloración paulatina provocadas por la composición de la muestra. Según los resultados observados, el indicador más adecuado para determinar crecimiento microbiano fue el cambio en la turbidez del medio de cultivo. Otras manifestaciones del medio como la presencia de precipitado o sobrenadante fueron características particulares de los microorganismos presentes o producto de la inestabilidad de la muestra inoculada. Debido a la presencia de diferentes tipos de sales en la muestra es común observar reacciones que pueden resultar en la presencia de precipitados luego de un periodo prolongado de incubación.

Es necesario tomar en cuenta que debido a la salinidad propia de la muestra, descrita en la sección 4.2, la concentración de sales del medio de cultivo pudo sufrir una elevación en dos unidades sobre lo establecido para el caldo de cultivo. Es decir que la concentración final de sales disueltas para el proceso de bioestimulación fue de aproximadamente 7%. Esta concentración se encuentra dentro del rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de bacterias halófilas moderadas (Sánchez – Porro *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2004), por lo cual no se lo consideró como una variable de importancia para los pasos subsiguientes.

Los resultados observados en la segunda fase de aislamiento en medio sólido mostraron una concentración óptima del 5% de sales disueltas, corroborando el rango óptimo de salinidad propuesto por Sánchez *et al.* (2004). Además se estableció a ésta concentración de sales como la más adecuada para lo fines prácticos respecto a la estabilidad del medio de cultivo. Esta concentración se utilizó en todos los medios de cultivo que se requirieron para los procesos subsiguientes.

Durante la segunda fase de aislamiento, se pudo observar que a pesar de las evidentes manifestaciones de crecimiento microbiano observadas en la fase de bioestimulación, no se obtuvo crecimiento en medio sólido si la muestra era diluida más allá de 10^{-2} . Esto permite comprobar que el aumento de biomasa en halófilos moderados es bastante lento, de manera que la presencia de sobrenadantes viscosos en el caldo de cultivo

de algunas muestras no fue un indicativo de crecimiento masivo. Una explicación posible a este fenómeno puede ser la alta expresión génica de rutas metabólicas para la síntesis de exopolisacáridos de baja densidad o biofilms, cruciales para mantener a las bacterias en mayor contacto con el oxígeno de la superficie del medio.

Concluida la segunda fase de aislamiento por medio de diluciones seriadas se pudieron obtener 29 aislados de bacterias halófilas moderadas a partir de 48 muestras analizadas. El número de aislados encontrados es relativamente menor a lo obtenido en proyectos relacionados (Sánchez *et al.*, 2004). Dicha condición puede considerarse producto del elevado rango de salinidad de las muestras de estudio lo cual es un limitante para la presencia de una amplia diversidad microbiana en un ambiente hipersalino.

4.4 Caracterización de los aislados de bacterias halófilas

4.4.1 Prueba de citocromo oxidasa en microorganismos

Se conoce que la gran cantidad de microorganismos halófilos moderados de los ambientes marinos corresponden a bacterias con un metabolismo preferentemente oxidativo, con el fin de hacer más eficiente la generación de energía bajo condiciones extremas (Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

De acuerdo con los resultados de la prueba citocromo oxidasa, se pudo ver que la mayor parte de bacterias aisladas son de tipo oxidasa positivo. El trabajar únicamente con aislados de tipo oxidasa positivo permitió una discriminación más acertada de bacterias halófilas moderadas. Además, la discriminación de bacterias por la presencia o no de la enzima citocromo oxidasa permitió excluir enterobacterias y bacterias halotolerantes propias de ambientes ricos en materia orgánica o producto de una posible contaminación en el proceso de aislamiento.

4.4.2 Tinción de Gram

De acuerdo con los resultados del proceso de tinción, los aislados correspondieron a bacterias con morfología principalmente bacilar, sin embargo, en los aislados de tipo Gram-negativos se hallaron indicios de pleomorfismo.

El pleomorfismo es un fenómeno común en bacterias halófilas y se manifiesta como efecto de los cambios fisiológicos debido a condiciones extremas y la baja concentración de nutrientes de sus hábitats naturales. Debido a que los aislados fueron mantenidos en un medio rico en nutrientes y con una salinidad del 5%, el pleomorfismo no fue tan notable.

A pesar de que en los ambientes hipersalinos es mucho más común hallar bacterias de tipo Gram negativas, en el presente proyecto se pudieron obtener siete aislados de bacterias de tipo Gram positivas con morfología bacilar. Como se señala en la sección 1.4.6, las bacterias Gram positivas con estructura bacilar halladas en ambientes hipersalinos corresponden únicamente a los géneros *Salibacillus* sp., *Gracibacillus* sp., y *Halobacillus* sp., así como también algunas especies del género *Bacillus* sp., que ha sido aisladas de ambientes hipersalinos por otros autores. Algunos miembros de estos géneros han sido caracterizados como productores de enzimas hidrolíticas extracelulares (Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

4.5 Selección de bacterias halófilas con actividad proteolítica.

Como se pudo verificar en el proceso de selección por medio de agar caseína, y según lo descrito en la sección 3.3, la mayor actividad proteolítica se presentó en los aislados de bacterias Gram negativas. Algunos aislados de bacterias Gram positivas mostraron una ligera actividad proteolítica luego de 48 o 72 horas de incubación, sin embargo esta actividad no fue significativa y quizás pudo estar relacionada a la liberación de proteasas intracelulares producto de la autólisis por envejecimiento celular (Lewis, 2000).

Como se indicó en la sección 3.3 se identificaron cuatro aislados con actividad proteolítica con un crecimiento sostenido en el halo de degradación durante todo el periodo de incubación (género *Pseudomonas*), y cuatro aislados cuya actividad proteolítica se manifestó a las 48 horas de incubación (género *Aeromonas* y género *Agrobacterium*). De acuerdo con la actividad proteolítica mostrada sea a las 24 o 48 horas, se podría deducir un proceso de secreción de proteasas de tipo constitutivo o inducible, respectivamente (Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

Otra posible razón de la diferencia en la velocidad de crecimiento del halo de degradación puede estar relacionada con la actividad enzimática bajo las condiciones mantenidas en el medio de cultivo. Sin embargo, el 5% de salinidad ofrece una fuerza iónica aceptable para la actividad de la mayoría de haloenzimas de bacterias halófilas moderadas (Sánchez-Porro *et al.*, 2003).

Debido a que el mecanismo de adaptación a los ambientes hipersalinos de las bacterias halófilas moderadas depende de la acumulación de solutos compatibles y no de la tolerancia molecular de sus proteínas a la alta salinidad intracelular (como sucede en los halófilos extremos), todas las enzimas secretadas por bacterias halófilas moderadas tendrán una buena adaptación a rangos muy amplios de fuerza iónica.

Por otro lado, las enzimas de las bacterias halófilas extremas poseen modificaciones estructurales irreversibles que las hacen altamente afines a condiciones de alta salinidad. Las enzimas de estos microorganismos halófilos extremos requieren de forma obligatoria una fuerza iónica elevada para mantenerse estables, siendo necesaria una concentración de NaCl superior al 15% (Anton *et al.*, 2002).

Bajo las condiciones mantenidas en el presente estudio se puede asegurar la ausencia de bacterias halófilas extremas y haloarqueas, por lo tanto la actividad enzimática

observada corresponderá a enzimas con un rango más flexible de fuerza iónica para su actividad óptima.

4.6 Bacterias halófilas identificadas y su actividad proteolítica

La hipótesis planteada presenta a los géneros *Pseudomonas*, *Halomonas* y *Bacillus* como los predominantes por su actividad proteolítica en las muestras del ambiente hipersalino en estudio. Según los resultados obtenidos se determinó que únicamente el género *Pseudomonas* validó la hipótesis planteada. Los otros géneros no fueron identificados en las muestras obtenidas, sin embargo dentro de los bacilos Gram positivos aislados, el género *Bacillus* pudo estar presente. Igualmente, otros bacilos Gram negativos, entre los cuales pudieron presentarse bacterias del género *Halomonas*, no fueron finalmente identificados debido a la baja manifestación de su actividad proteolítica.

4.6.1 Género *Pseudomonas*

La identificación del género *Pseudomonas* en los ambientes hipersalinos es bastante frecuente, habiéndose determinado en estudios anteriores que ciertos representantes de éste género crecen óptimamente en pH alcalino y requieren de condiciones halófilas y psicrófilas moderadas (Sánchez *et al.*, 2004). La alta prevalencia del género *Pseudomonas* se comprobó en el presente estudio, identificándose bacterias de este género en los tres muestreos realizados. En el presente trabajo se obtuvieron cuatro aislados del género *Pseudomonas* de los ocho aislados bacterianos identificados.

El género *Pseudomonas* fue el que más aislados con actividad proteolítica significativa reportó en el presente trabajo, coincidiendo con un ensayo realizado en Perú sobre la identificación de bacterias halófilas con actividad proteolítica aisladas de efluentes pesqueros (Sánchez *et al.*, 2004). La salinidad de las muestras de las que fueron aisladas de cristalizadores con una salinidad promedio de 233 g/L (23.3% de sales disueltas)

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontraron tres aislados del género *Pseudomonas* con una actividad proteolítica bastante significativa: el aislado AP1M1 con un diámetro del halo de degradación de 26 mm y un incremento del halo respecto al tiempo de 0,254 mm/hora; el aislado AP2M2 con un diámetro de halo de degradación de 30 mm y un incremento del halo respecto al tiempo de 0,300 mm/hora; y el aislado AP3M3 con un halo de degradación de 29 mm y un incremento del halo respecto al tiempo de 0.304 mm/hora.

El cuarto aislado del género *Pseudomonas* (AP4M3) presentó una tendencia cuadrática, y el incremento del halo fue menor a las 48 horas aproximadamente, lo que implicó que paulatinamente el incremento del halo llegó a un punto de saturación después del cual el crecimiento del halo de degradación fue nulo. De tal manera, el aislado AP4M3 presentó menor diámetro de halo en comparación con los otros aislados del mismo género. Este comportamiento en el crecimiento del halo puede sugerir que podría tratarse de otra especie o subespecie del género *Pseudomonas*.

Es necesario anotar que según lo expuesto en la sección anterior en relación al inicio del proceso de degradación, sea a las 24 o 48 horas de incubación, se puede presumir que los cuatro aislados del género *Pseudomonas*, a diferencia de los otros géneros identificados, poseen un sistema secretor enzimático constitutivo. Los aislados del género *Pseudomonas* podrían tener una mejor adaptación en procesos de producción enzimática a nivel industrial, ya que no requieren de un periodo de inducción por sustrato.

4.6.2 Género *Agrobacterium*

El género *Agrobacterium* es descrito como uno de los géneros con mayor adaptabilidad a los ambientes terrestres y marinos como es el caso de *A. radiobacter*. En esta especie se han realizado estudios donde se ha verificado la producción de enzimas extracelulares y principalmente se ha destacado la producción de biopolímeros (Cadmus, 1993).

En el caldo de cultivo de las muestras correspondiente a este género se observó la formación de biopolímeros, corroborando las características del género y sugiriendo a la especie *radiobacter* como la posible especie encontrada, sin embargo no se tiene amplia documentación sobre el perfil de enzimas extracelulares producidas por *A. radiobacter*. De todas maneras, la alta adaptabilidad de *A. radiobacter* permite pensar que estos aislados deben poseer un arsenal génico para producir enzimas extracelulares como enzimas proteolíticas necesarias para obtener nutrientes esenciales del medio.

En relación a la actividad proteolítica presentada por los aislados bacterianos del género *Agrobacterium* identificados, se puede observar que las curvas de tendencia halladas indican que la actividad enzimática requiere de un periodo de activación para posteriormente incrementarse de forma continua. El halo producido al final de las 96 horas no fue tan significativo como lo observado en el género *Pseudomonas*, lo cual sugiere que las enzimas proteolíticas no son de prioridad en el metabolismo del género *Agrobacterium*.

4.6.3 Género Aeromonas

El género *Aeromonas* ha sido ampliamente estudiado dado que los miembros de este género producen exoenzimas de diversa actividad específica. La especie *A. salmonicida* es comúnmente aislada de ambientes marinos y se han identificado algunas exoenzimas de tipo leucocitolíticas producidas como antígenos de infección en peces y otros organismos marinos (Larenas *et al.*, 2005). La identificación de enzimas proteolíticas en los aislados del género *Aeromonas* encontrados en el presente estudio puede implicar que dichos aislados correspondan a la especie *A. salmonicida* (Larenas *et al.*, 2005).

En el presente estudio se observó que el crecimiento del diámetro del halo de degradación en las dos aislados identificados fue similar con una tendencia lineal, al igual que en los aislados con mayor actividad proteolítica del género *Pseudomonas*. Sin embargo, la actividad proteolítica mostrada por el género *Aeromonas* es relativamente baja en comparación con la actividad proteolítica observada en el género *Pseudomonas*.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- En el presente proyecto se aislaron e identificaron bacterias aerobias halófilas moderadas que manifestaron actividad proteolítica.
- El 55,17% (16 aislados) de las bacterias que presentaron crecimiento bacteriano en el caldo de cultivo mostraron actividad proteolítica
- De los aislados bacterianos que presentaron actividad proteolítica relevante, el 50% (8 aislados) fueron identificadas como pertenecientes a los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Agrobacterium*.
- La actividad proteolítica más representativa se manifestó en los aislados de bacterias Gram negativas, tal como se ha reportado en otros estudios afines.
- El género que presentó mayor comportamiento proteolítico fue el género *Pseudomonas*, y el aislado bacteriano más representativo presentó un halo superior a 25mm.
- Según la hipótesis planteada, se pudo identificar al género *Pseudomonas* como uno de los predominantes en ambientes hipersalinos y que mostraron actividad proteolítica. Sin embargo, no se identificaron los géneros *Halomonas* ni *Bacillus*.
- La salinidad promedio del ambiente hipersalino del que fueron hallados los géneros identificados fue de 236 g/L, lo cual garantizó la presencia de bacterias halófilas moderadas.

- Los aislados identificados son mantenidos en condiciones adecuadas para permitir investigaciones posteriores como la caracterización tanto de los aislados bacterianos identificados como de las enzimas proteolíticas extracelulares producidas por éstos.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de curvas de crecimiento y parámetros óptimos con el fin de determinar condiciones óptimas para el aprovechamiento industrial de los géneros identificados en este proyecto.
- Sería recomendable realizar estudios de caracterización molecular específicamente en los aislados del género *Pseudomonas* identificados, ya que presentan las mejores características deseables para los fines del presente proyecto.
- Dentro del protocolo de aislamiento de bacterias halófilas moderadas se sugiere realizar una bioestimulación previa para el aumento de biomasa de las muestras de ambientes hipersalinos ya que las bacterias halófilas tienen un crecimiento relativamente lento.
- Dentro del protocolo de preparación del medio de cultivo para la selección de bacterias con actividad proteolítica se recomienda realizar un periodo de esterilización de 15 minutos a una temperatura de 121°C, con el fin de evitar el oscurecimiento del medio Agar caseína.
- Sería recomendable realizar estudios alternativos sobre los aislados del género *Agrobacterium* debido a su posible aplicación en la producción industrial de exopolisacáridos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. y Roselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. Nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer pond. *Int J Syst Evol Microbiol*; 52:485-491.
- Altwegg, M. (1999). *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM press. Pag.: 507-516.
- Arahal, D.R., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Ventosa, A. y Volcani, B.E. (1997). Phylogenetic análisis of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequence. *Appl Environ Microbiol*; 62: 3779-3786.
- Benlloch, S., Acinas, S.G., López, A., Luz, SP. y Rodríguez-Varela, F. (2002). Archaeal Biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb Ecol*; 41: 12-19.
- Borrell N, Figueras MJ, Guarro J. (1998). Phenotypic identification of *Aeromonas* genomoespecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol*; 44:7-12.
- Cadmus, M.C. (1993) Salt-tolerant microbial xanthanase and method of producing same. Patente: US 4410625. <http://www.freepatentsonline.com/6509176.htm>

- Cánovas, D., Vargas, C., Csonkja, L.N., Ventosa, A. y Nieto, J.J. (1996). Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol*; 178: 7221-7226.
- Comerio R.M., Tarapow M., Vazquez S.C. y Mc Cormak W.P. (2007). *Bacterias Adaptadas al Frío*. Revista Ciencia Hoy en Línea 17(99). <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy99/bacterias.htm>.
- Eaton A, Clesceri L., Greenberg A. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Eisenberg, H. (1995). Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzyme from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys*; 318: 1-5.
- Frerichs, G.N., Millar, S.D. y McManus, C. (1993). Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from healthy wrasse (*Ctenolabrus rupestris*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*; 12:48–49.
- Godfrey, T. y West, S. (1996). *Industrial enzymology*. Londres: Macmillan Press.
- Gupta, R., Beg, Q.K. y Lorenz, P. (2002). Bacteruak alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*; 59: 15-32.
- Hiraga, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, K. y Oda, K. (2005). Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Biosci Biotechnol Biochem*; 69:38-44.

- Kamekura, M. (1986). Production and function of enzymes of eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol Rev*; 39:145-150.
- Kaye, J.Z. y Baross, J.A. (2000). High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiol Ecol*; 32: 249-260.
- Kushner, D.J. (1978). Vida Microbiana en Ambientes Extremos. Londres: Academic Press. Pags.: 317-368.
- Kushner, D.J. y Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. En F. Rodríguez-Valera (ed.). Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press. Pags.: 109-138.
- Larenas, J., Galleguillos, M., Adarmes, H., Gatica, C. y Smith, P. (2005). Diferenciación electroforética entre cepas virulentas y avirulentas de *P. salmonis*. XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Pag.: 157-158.
- Lewis, K. (2000). Programmed Death in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Rev*; 64(3): 503-514.
- Louis, P., Truper, H.G. y Galinski, E.A. (1994). Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 648-688.
- Madigan, M. y Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion Microbiology*; 2: 365 – 269.

- Margesin, R. y Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*; 5: 73-83.
- Martínez-Checa F, Toledo FL, Vílchez R, Quesada E, Calvo C, (2002). Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurialina* strain H-28 in media containing hydrocarbons. *Appl Microb Biotechnol*; 58: 358-63.
- Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., Béjar, V. (2004). A taxonomica study to establish the relationship between exopolysaccharide-producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *Curr Microbiol*; 48: 348-353.
- Mata G.J. (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis Doctoral; ISBN: 84-338-3861-x. Universidad de Granada.
- Neklyudov, A.D., Invankin, A.N. y Berdutina, A.V. (2000). Properties and uses of protein hydrolases. *Appl Biochem Microbiol*; 36: 452-459.
- Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., García, M.T., Mellado, E. y Ventosa, A. (1993). Survey of antimicrobial susceptibility of moderately halophilic eubacteria and extremely halophilic aerobi archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol*; 16: 352-360.

- Oren A, Guverich P y Henis Y. (1993). Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. *Appl Environ Microbiol*; 57: 3367-70.
- Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 28: 58-63.
- Pemberton J.M., Kidd S.P. y Schmidt R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett*; 152: 1-10.
- Qian, P., Xiong, H. y Dobrestov, S.V. (2005). Halophilic Protease Utilization in Antifouling Coatings. Patente: US60/723,765.
http://www.ttc.ust.hk/new_selected/doc/patent%20269S.pdf
- Quesada E., Béjar V. y Calvo C. (1993). Exopolysaccharide production of *Volcaniella eurihalina*. *Experientia*; 49: 1037-41.
- Ramírez N., Sandoval H., Marquez M.C., Arahal D. y Ramírez H. (2004). Isolation and characterization of halophile actinomycetes from Mexico. International Symposium on Microbial Ecology, ISME-10. Cancun México.
- Rao, B.L., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. y Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiology Mol Biology Rev*; 62: 597-635.

- Rios M., Nieto J.J. y Ventosa A. (1998). Numerical taxonomy of heavy metal-tolerant nonhalophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Int Microbiol*; 1: 38-44.
- Rodríguez –Valera, F. (1993). Introduction to saline environments. En R.H. Vreeland y L. Hochstein (Eds.). The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press. Pags. 1-23.
- Rol de Lama M.A. y Vivas M. (2004). Salinidad regulación de Volumen. Murcia: Universidad de Murcia.
- Röling WFM, Van Verseveld H. (1996). Characterization of Tetragenococcus halophila populations in Indonesian soy másh (kecap) fermentation. *Appl Environ Microbiol*; 62: 1203-7.
- Ryu, K., Kim, J. y Dordick, J.S. (1994). Catalytic properties and potencial o fan extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microbiol Technol*; 16: 266-275.
- Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. y Ventosa, A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*; 94: 295-300.
- Sánchez T, Leon J, Woolcott J y Arauco K. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Rev Perú biol*; 11(2): 179-186.

- Shi W.L., Zhong C.Q., Tang B. y Shen P. (2006). An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization. Extremophiles; 10(6): 599-606.
- Simon, R.D., Abeliovich, A. y Belkin, S. (1994). A novel terrestrial halophilic environment: the phylloplane of *Atriplex halimus*, a salt-excreting plant. FEMS Microbiology Ecology, 14: 99-110.
- Studdert C., Herrera S.M., Plasencia G.M., Sanchez JJ, de Castro R. (2001) Purification and biochemical characterization of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus* extracellular serine protease. Journal Basic Microbiology; 41.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. y Clare, B.W. (2002). Bacterial protease inhibitors. Med Res Rev; 22: 329-372.
- Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Laigret, F., Kaghad, M., Patel, B.K., Guezennec, J., Matheron, R. y Caumette, P. (1996). *Desulfovibrio gabonensis* sp. nov., a new moderately halophilic sulphate-reducing bacterium isolated from an oil pipeline. Int Journal Systems Bacteriology; 46: 710-715.
- Ugalde, J.E. (2003). Estudio genético, bioquímico y estructural del metabolismo del glucógeno en *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis doctoral: Universidad de San Martín, Argentina.

- Ventosa, A., Márquez, M.C., Garabito, M.J. y Arahál, D.R. (1998). Moderately halophilic Gram positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*; 2: 297-304.
- Ventosa, A. y Nieto, J.J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:85-94.
- Ventosa A. y Nieto J.J. (1999). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microb Biotechnol*; 11: 85–94.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aerobio: Organismo capaz de utilizar el oxígeno como aceptor terminal de electrones, puede tolerar niveles de oxígeno iguales o superiores a los niveles presentes en la atmósfera (21%), y tiene un metabolismo estrictamente respiratorio.

Aislado: cultivo bacteriano puro obtenido a partir de una muestra.

Anaerobio: Organismo que es incapaz de crecer en presencia de oxígeno. Pueden tener un metabolismo fermentativo o respiratorio con aceptores terminales distintos del oxígeno.

Anaerobio facultativo: Organismo capaz de crecer en presencia y ausencia de niveles de oxígeno atmosférico (21%).

API20NE: Versión miniaturizada de pruebas bioquímicas para la identificación de no-enterobacterias.

Archaea: Dominio que reúne un grupo de procariotas filogenéticamente relacionados y diferentes del grupo Bacteria

Atalasoalinos, Ecosistema que tiene proporciones de las diferentes sales presentes marcadamente diferentes a las que se encuentran en el agua de mar.

Autótrofo: Organismo que utiliza compuestos inorgánicos como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono.

Bacteria: Dominio que reúne un grupo de procariotas filogenéticamente relacionado y diferente del grupo Archaea.

Biopolímeros: Polisacáridos producidos por microorganismos.

Biorremediación: La biorremediación es el proceso en el que se emplean organismos biológicos para resolver problemas específicos medioambientales, como la contaminación.

Dominio: En la clasificación biológica, el nivel superior de la jerarquía taxonómica de reciente proposición.

Especie: En microbiología, colección de cepas que comparten las mismas propiedades principales, se diferencian de otras en una o más propiedades significativas. 2 especies procariotas tienen un 3% o más de diferencias en el rRNA 16S.

Extremófilos: Organismos adaptados para vivir bajo condiciones ambientales extremas.

Género: Colección de especies que comparten una o más (usualmente varias) propiedades principales. De acuerdo al sistema binomial de nomenclatura, a los organismos se les asigna un nombre de género y uno de especie. El nombre del género suele abreviarse e indicarse con una letra mayúscula, el de especie no se abrevia nunca.

Haloenzima: enzimas sintetizadas por organismos halófilos y por ende se mantienen estables bajo condiciones de fuerza iónica elevada.

Halófilo: Organismo que requiere NaCl para su crecimiento.

Halotolerante: Organismo capaz de multiplicarse en presencia de NaCl, aunque no lo requiere para su crecimiento.

Hidrolítica: Actividad enzimática caracterizada por el rompimiento de enlaces bajo la presencia de agua para la transferencia de protones a uno de sus productos resultantes.

Metabolitos: Productos moleculares de los procesos metabólicos.

Microbiota: Diversidad microbiana en un ambiente determinado.

Mutagénicos: Capacidad de una molécula o sustancia para inducir procesos de mutagénesis.

Osmoadaptación: Modificaciones fisiológicas y moleculares de los organismos con el fin de adaptarse a las variaciones de fuerza iónica presente en el medio.

Pleomorfismo: Fenómeno característico de ciertos microorganismos para cambiar su forma original debido a condiciones de estrés, modificaciones en la composición de la pared celular o debido al envejecimiento del cultivo.

Talasohalino: Ecosistema que tiene cantidades relativas de las diferentes sales inorgánicas similares a las encontradas en el agua de mar.

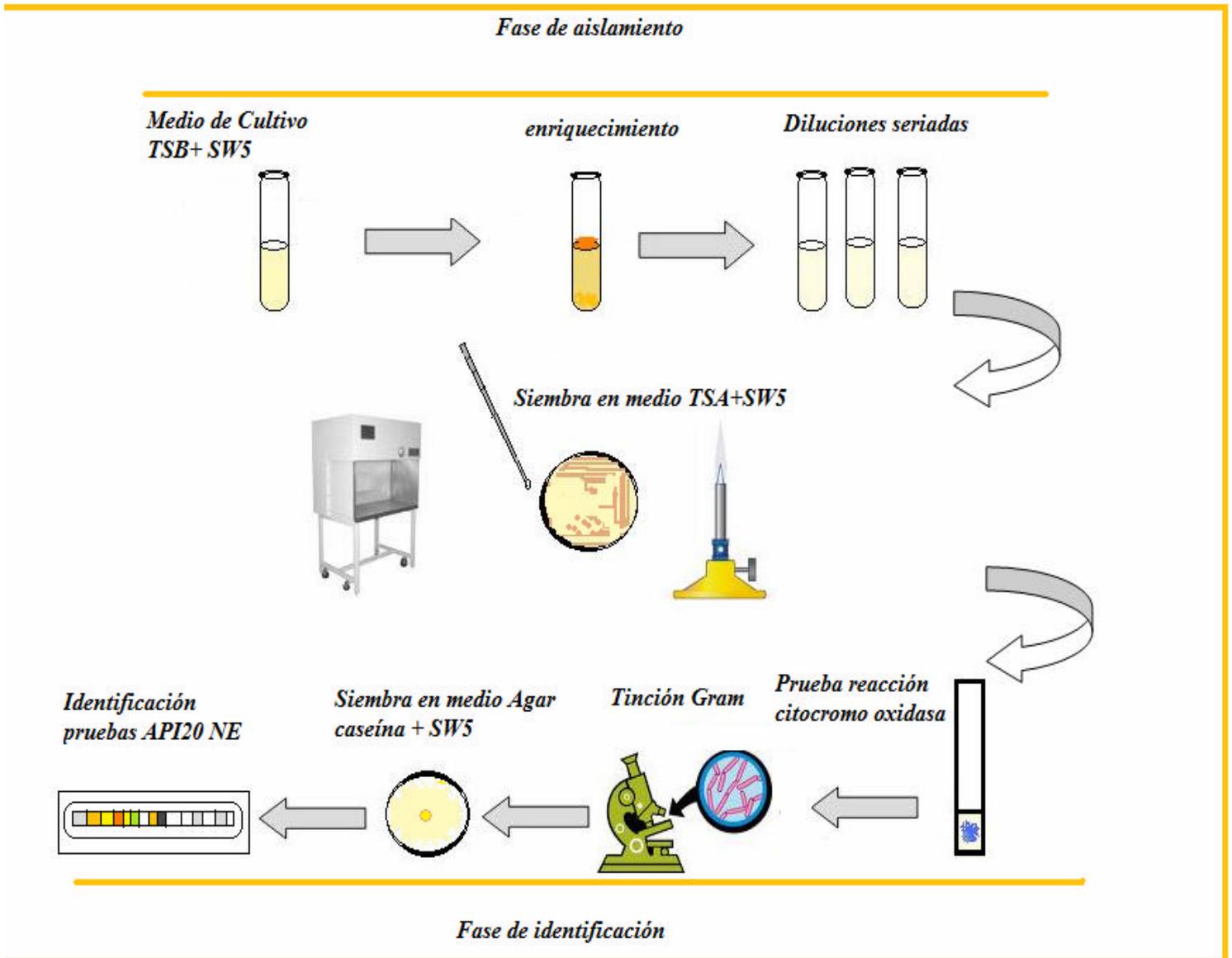
ANEXO A

Tabla completa de resultados

MUESTRO	SALINIDAD		Características en el Caldo de Cultivo complementado (con SW5, 48 h)				Crecimiento a diferentes diluciones en AGAR SW5 (48h)			PRUEBA OXIDASA	TINGIÓ GRAM	ACTIVIDAD PROTEOLITICA				GENERO IDENTIF.
	MUESTRA	SALINIDAD	TURBIDEZ	SOBRENADANTE	PRECIPITADO	10 ¹	10 ²	10 ³	24h			48h	72h	96h		
	1	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	242	++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	234	++	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	232	++	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	236	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	234	++	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	230	++	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	240	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	236	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	238	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	238	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	238	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	228	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	228	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	230	++	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	244	++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	236	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26	230	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	238	++	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	224	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	234	+	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	34	206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	236	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	240	++	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	232	++	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	232	++	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	41	228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	42	234	++	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	43	228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	44	238	++	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	45	240	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	46	238	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	47	224	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	232	++	++	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ANEXO B

Esquema del proceso de aislamiento e identificación de bacterias halófilas con actividad proteolítica.



ANEXO C

Mapa de las piscinas de ECUASAL



