

## BACTERIAS HALOTOLERANTES PRODUCTORAS DE HIDROLASAS AISLADAS DE AGUAS TERMALES DE TARAPOTO - PERU

Halotolerant bacteria producing hydrolytic enzymes isolated from hot springs from Tarapoto - Peru

Jackelyn E Borja, Amparo I Zavaleta, Víctor Izaguirre

Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas de interés biotecnológico aisladas de aguas termales de Tarapoto. Para ello, se recolectaron muestras de agua y se sembraron en agar tripticasa de soya conteniendo cloruro de sodio 5% a 37 °C por 24 h. Se seleccionaron 14 bacterias por presentar colonias de diferente tamaño, color y consistencia, luego se determinaron sus características morfológicas, fisiológicas y capacidad hidrolítica a tween 80, almidón, gelatina, carboximetilcelulosa y lactosa. Los 14 aislados se agruparon según el perfil de hidrólisis de los sustratos antes descritos en los siguientes grupos: I (almidón), II (lactosa), III (tween 80 y gelatina), IV (tween 80 y almidón), V (almidón, gelatina y lactosa), VI (tween 80, almidón y gelatina) correspondiendo en número de bacterias a 1, 1, 1, 5, 1, 5; respectivamente. El 86% (12/14) de los aislados hidrolizó más de dos sustratos, pero ninguno carboximetilcelulosa; el 93% (13/14) fueron bacilos, crecieron optimamente entre 30 y 40 °C a pH entre 5,0 y 8,0, todos formaron colonias de consistencia gomosa. Las características culturales de los aislados y los perfiles de hidrólisis indican que al menos existen 6 especies o cepas bacterianas productoras de enzimas hidrolíticas con gran potencial industrial.

**Palabras clave:** bacterias halotolerantes, aguas termales, enzimas hidrolíticas, Tarapoto.

### SUMMARY

The aim of this study was to characterize halotolerant bacteria producing hydrolases of biotechnological interest isolated from hot springs from Tarapoto. For that, water samples were collected and plated on trypticase soy agar containing 5% sodium chloride at 37 °C for 24 h. 14 aerobic bacterial isolates were selected to show colonies of different size, colour and consistency, then morphological and physiological properties and hydrolytic capacity to tween 80, starch, gelatin, carboxymethylcellulose, lactose were determined. The 14 isolates were grouped according to substrate hydrolyzation profiles in groups: I (starch), II (lactose), III (Tween 80 and gelatin), IV (tween 80 and starch), V (starch, gelatin, lactose), VI (tween 80, starch and gelatin) corresponding in number of bacteria 1; 1; 1; 5; 1; 5; respectively. 86% (12/14) of isolates hydrolyzed more than one substrate, but none carboxymethylcellulose, 93% (13/14) were bacilli, grew optimally between 30 and 40 °C at pH between 5 and 8, all formed colonies of rubbery consistency. The cultural characteristics of the isolates and the hydrolyzed substrate profiles indicate that there are at least 6 species or bacterial strains producing hydrolytic enzymes of great industrial potential.

**Keywords:** halotolerant bacteria, hot spring, hydrolytic enzymes, Tarapoto.

### INTRODUCCIÓN

Los hábitats extremos son fuentes de microorganismos con características especiales en la producción de metabolitos y enzimas. En los últimos años, el interés por el estudio de sus enzimas se ha incrementado debido a sus propiedades catalíticas en condiciones exigentes y por su potencial aplicación en la elaboración de productos alimenticios y dietéticos, biosíntesis de nuevos productos, formulación de detergentes, así como síntesis de fármacos enantioméricamente puros, biodegradación de residuos tóxicos y contaminantes industriales, entre otros<sup>(1-4)</sup>.

Las aguas termales son ambientes extremos, ya que tienen altas temperaturas y elevadas concentraciones iónicas, condiciones desfavorables para la vida de muchos seres. Sin embargo, se ha descrito que este nicho ecológico contiene una microbiota autóctona dependiente de las propiedades fisicoquímicas del agua<sup>(5, 6)</sup>. Además, en base a sus requerimientos nutricionales predominan diversas bacterias heterótrofas y oligotróficas, tales como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* con escasa demanda de carbono y nitrógeno. La mayoría de estas bacterias son aerobias o anaerobias facultativas, de tamaño pequeño, móviles y con pigmentos. Generalmente, las bacterias

heterótrofas no suelen fermentar los azúcares pero son proteolíticas, amilolíticas y en menor número celulolíticas <sup>(7)</sup>.

Actualmente, las industrias requieren procesos tecnológicos eficientes y limpios que soporten temperaturas y pH extremos, es por ello que, el aislamiento de nuevos microorganismos de estos ambientes o sus enzimas constituye una alternativa para la obtención de bacterias con características particulares para atender la creciente demanda del mercado biotecnológico <sup>(8,9)</sup>.

Es así que el objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar bacterias productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares a partir de aguas termales de Tarapoto, ciudad tropical ubicada al nororiente del Perú aproximadamente a 300 msnm.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislamiento de microorganismos.** Se recolectaron 10 muestras de aguas termales de Tarapoto, se transportaron al laboratorio y se guardaron en refrigeración. Con las muestras se realizaron diluciones seriadas al décimo desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-12}$ , utilizando como diluyente cloruro de sodio 5%. Luego, se sembraron alícuotas de 0,1 mL de las diluciones en agar tripticasa de soya conteniendo cloruro de sodio 5% a 37°C durante 24 horas. Los aislados fueron seleccionados según tamaño, color y consistencia de las colonias. Para la determinación del tipo de pared celular y forma bacteriana se utilizaron cultivos frescos de 14 h.

**Pruebas fisiológicas.** Los aislados se inocularon en caldo tripticasa de soya conteniendo cloruro de sodio 0, 5, 10, 15 y 20%. Luego, los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C por 24 h, la densidad celular se determinó por espectrofotometría a 600 nm. Para determinar el pH óptimo de crecimiento se utilizó el caldo tripticasa de soya cuyo pH fue ajustado a 6,0; 7,0 y 8,0 con NaOH 1N o HCl 1N. Del mismo modo, se determinó la temperatura óptima cultivándolos a 20, 30, 37, 40 y 50°C.

## Actividad hidrolítica a diversos sustratos

**Almidón.** Se utilizó agar almidón (DIFCO), las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas. Luego, se añadieron 10 mL de lugol sobre cada placa, considerándose reacción positiva cuando se observó la formación de

halos claros alrededor de las colonias productoras de amilasas.

**Tween 80.** Los aislados se sembraron en agar extracto de levadura 0,2% conteniendo tween 80 al 1%. Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas, la hidrólisis se determinó según lo descrito por Sánchez-Porro y col <sup>(10)</sup>.

**Gelatina.** Los aislados se sembraron en agar gelatina 5% y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Luego, los cultivos se colocaron a 4 °C por 20 minutos. La actividad proteolítica se evidenció por licuefacción del medio a temperatura ambiente.

**Lactosa.** Se centrifugó 0,2 mL de cada cultivo bacteriano de 18 horas, las células se resuspendieron en 0,2 mL de buffer fosfato salino conteniendo orto-nitrofenil-galactopiranosido y se incubó a 37 °C durante 24 horas, la coloración amarilla indicó reacción positiva.

**Carboximetilcelulosa.** Las bacterias se cultivaron en agar tripticasa de soya conteniendo carboximetilcelulosa 1%, se incubaron a 37 °C por 72 horas. Luego se le adicionaron 4 mL de rojo de Congo 0,5%; la actividad celulolítica se evidenció por la presencia de halos claros alrededor de la colonia.

## RESULTADOS

Se aislaron 14 bacterias halotolerantes con características diferentes en la formación de colonias en lo referente a consistencia, color y tamaño. Todas las colonias presentaron consistencia gomosa (figura 1), de color crema, a excepción de los aislados TL16 y TJB que fueron de color blanco y naranja, respectivamente. Mediante tinción Gram y microscopía óptica se determinó que el 79% (11/14) de los aislados fueron

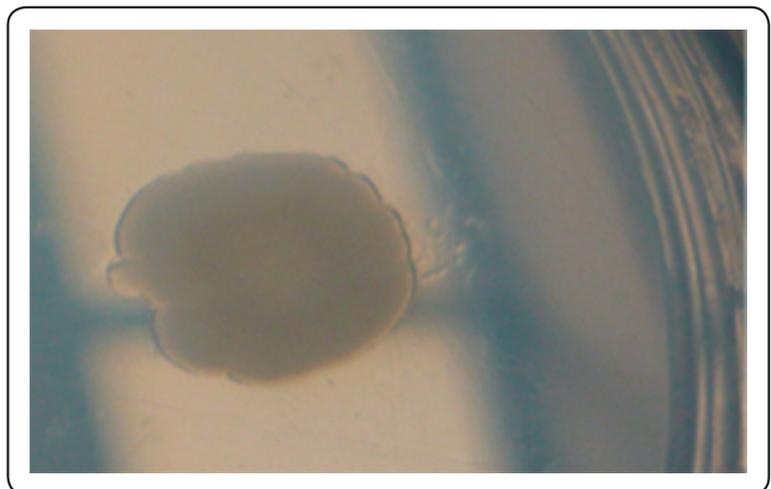


Figura 1. Colonia del aislado TL8 crecido en agar tripticasa de soya.

Tabla 1. Características fenotípicas de las bacterias aisladas de aguas termales de Tarapoto.

Aislados	TL1	TL2	TL5	TL7	TL8	TL11	TL16	TM1	TM5	TM7	TM9	TA3	TA9	TJB
Color colonia	crema	crema	crema	crema	crema	crema	blanca	crema	crema	crema	crema	crema	crema	naranja
Consistencia colonia	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa	gomosa
Tinción GRAM	bacilo -	bacilo +	bacilo -	bacilo -	bacilo -	bacilo +	bacilo -	bacilo +	bacilo -	coco -				
pH óptimo	6	6	5	7	5	6	6	7	8	7	6	7	6	6
T óptima (°C)	37	37	37	37	37	37	40	37	37	37	37	37	30	37
Tolerancia salina (NaCl %)	0,9 - 5,0	0,9 - 5,0	0,9 - 3,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9 - 3,0	0,9 - 3,0	0,9 - 3,0	0,9 - 5,0	0,9 - 3,0	0,9 - 3,0	0,9 - 10,0
Movilidad	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mac Conkey	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-
<b>HIDRÓLISIS DE :</b>														
tween 80	-	+++	+++	+	-	-	+	+++	++	+	+++	++	+++	+
almidón	++	++	++	++	-	+++	-	++	+	++	+	++	++	++
gelatina	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
lactosa	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Diámetro de halo de hidrólisis en agar (mm): +, < 3; ++, < 6; +++, > 9; CMC, carboximetilcelulosa; \*, hidrólisis de ONPG en solución.

bacilos Gram negativos, siendo los aislados TL2, TL11, TM1 bacilos Gram positivos y TJB cocos Gram negativos (tabla 1).

Los aislados bacterianos crecieron en medios de cultivo conteniendo cloruro de sodio entre 0,9 y 10,0%; el 21% (3/14) toleró hasta 5% de sal; sin embargo, el aislado TJB creció hasta 10%. El 86% (12/14) de bacterias crecieron óptimamente a 37°C, a excepción de los aislados TJ9 y TL16 que crecieron a 30 y 40 °C, respectivamente. El 50% (7/14) de las bacterias crecieron a pH 6,0; el aislado TM5 a pH 8,0; el 93% (13/14) de los microorganismos son móviles a excepción de TL1; el 79% (11/14) de las bacterias crecieron en agar Mac Conkey (tabla 1).

Con respecto a la capacidad hidrolítica de las bacterias halotolerantes, éstas degradan de uno a tres sustratos generando perfiles de hidrólisis diferentes denominados grupos. Así, los grupos y sustratos son: I (almidón), II (lactosa), III (tween 80 y gelatina), IV (tween 80 y almidón), V(almidón, gelatina y lactosa), VI (tween 80, almidón y gelatina), cada grupo contiene, en número 1, 1, 1, 5, 1 y 5 cepas bacterianas, respectivamente; el 86% (12/14) de bacterias hidrolizan de 2 a 3 sustratos; el almidón, tween 80 y gelatina son hidrolizados por el 86, 79 y 43% de las bacterias (figura 2). El almidón y la lactosa son hidrolizados por los aislados TL1 y TL8 (tabla 2).

## DISCUSIÓN

En aguas termales existen diversos microorganismos que dependen de las características fisicoquímicas del agua, suelo, clima y región geográfica (7). Los microorganismos aislados crecieron en un rango de salinidad entre 0,9 a 10,0%, de 30 a 40°C y a pH entre 5,0 a 8,0; en base a ello, y desde un punto de vista fisiológico se puede inferir que las bacterias aisladas son halotolerantes (9).

En la producción a gran escala de enzimas y metabolitos, la halotolerancia es una característica fisiológica importante en un proceso fermentativo industrial dado que permite disminuir la contaminación microbiana.

El predominio de bacterias Gram negativas en aguas termales es común, la mayoría de especies descritas son bacilos móviles (6). Así, el 93 y 79% de las bacterias aisladas de los ambientes termales de Tarapoto son móviles y bacilos Gram negativos. Esta última característica se evidenció por el crecimiento bacteriano en el medio Mac Conkey, el cual permite el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil

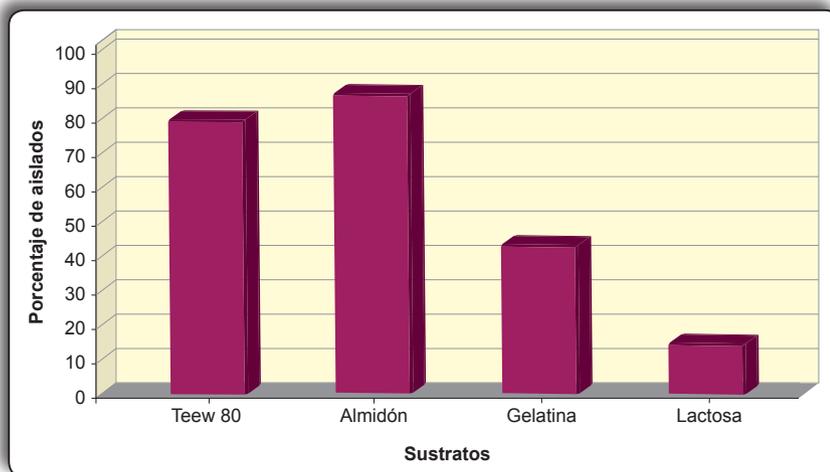


Figura 2. Porcentaje de bacterias halotolerantes que hidrolizan sustratos.

desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos <sup>(11)</sup> (tabla 1). En aguas termales de zonas geográficas diversas se han descrito bacterias halotolerantes moderadas, de forma bacilar, con actividad aminolítica en la misma proporción <sup>(7)</sup>. Así, Leveque y col. aislaron microorganismos amilolíticos termoestables que luego de estudios fenotípicos y genotípicos demostraron ser *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*; asimismo, concluyeron que las amilasas termoestables ofrecen mayores ventajas con respecto al uso de enzimas aisladas de microorganismos mesófilos debido a que el almidón, al ser transformado, es más soluble a altas temperaturas, lo cual hace preferible la implementación de procesos termófilos <sup>(12,13)</sup>.

La presencia de microorganismos con actividad amilolítica y proteolítica en ambientes termales es alta, por ello el 86 y 43% de los aislados degradaron almidón y gelatina, pero con diferentes grados de actividad valorados en el tamaño del halo de hidrólisis (tabla 1). Similares resultados fueron descritos por Lee y col.,

Tabla 2. Características fenotípicas de las bacterias aisladas de aguas termales de Tarapoto.

Código de aislado	Aislados (N)	Sustrato hidrolizado	Perfil de hidrólisis
TL1	1	Almidón	I
TL8	1	Lactosa	II
TL16	1	Gelatina, Tween 80	III
TL5, TL7, TM5, TA3, TJB	5	Almidón, Tween 80	IV
TL11	1	Almidón, gelatina, lactosa	V
TL2, TM1, TM7, TM9, TA9	5	Almidón, gelatina, Tween 80	VI

quienes aislaron de aguas tropicales 56 y 36% de microorganismos con actividad amilolítica y proteolítica, respectivamente. En su mayoría, los miembros del género *Pseudoalteromonas*, presentaron actividades de amilasa y proteasa <sup>(14,15)</sup>.

El 79% de bacterias degradan Tween 80, la hidrólisis de este sustrato indica actividad esterásica. Al respecto, las esterases producidas por bacterias halotolerantes son candidatas idóneas, por su termoestabilidad y actividad en solventes orgánicos, para la biosíntesis de nuevos compuestos en procesos industriales eficientes <sup>(16-18)</sup>.

La capacidad de hidrólisis y la frecuencia de uso de un sustrato u otro dependen de la procedencia del agua y de sus propiedades fisicoquímicas tales como temperatura, pH, sales minerales, nutrientes <sup>(4-7)</sup>. Así, sólo una bacteria degradó almidón y otra lactosa, de ello se puede inferir que la mayoría de microorganismos aislados pertenecen a especies o cepas nuevas.

Al respecto, Margesin <sup>(3)</sup> y Galinski <sup>(1)</sup> han descrito que los perfiles hidrolíticos de las bacterias halotolerantes son variados y disímiles entre sí; es por ello que existen al menos 6 perfiles hidrolíticos en los microorganismos aislados, característica de gran interés en procesos industriales, dado que se pueden utilizar diferentes fuentes de carbono para su cultivo <sup>(1,3)</sup>.

Entre las 14 bacterias halotolerantes procedentes de aguas termales de Tarapoto existen al menos seis especies o cepas según las características bacteriológicas y el análisis de los perfiles de hidrólisis de sustratos comunes. Las bacterias aisladas constituyen fuentes nativas potenciales para la degradación y la síntesis de nuevos compuestos en un contexto ambiental limpio y sostenible.

## CONCLUSIÓN

De las aguas termales de Tarapoto se aislaron 14 bacterias halotolerantes de aguas termales, la mayoría son Gram negativas, móviles, gomosas, crecen a 37 °C, pH 6,0 y producen esterasas y amilasas que hidrolizan tween 80 y almidón, respectivamente; ninguna degrada carboximetilcelulosa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Galinski EA, Tindall BJ. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. In:

- Molecular biology and biotechnology of extremophiles. Blackie. Glasgow, 1992. p 76-114.
2. Cowan ST, Steel LJ. Manual for the identification of medical bacteria. 3<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press. UK, 1993.
  3. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 2001; 5(2): 73-83.
  4. Schmidt H. Avances en ciencias y tecnología de los alimentos. Alfabet Impresora. Santiago de Chile, 1981.
  5. Miller SL, Lazcano A. The origin of life: Did it occur at high temperatures?. *J Mol Evol* 1995; 41: 689-92.
  6. Mosso MA, De La Rosa MC, Vivar MC. Microbiología del manantial Hervideros del Balneario de Cofrentes. *An Real Acad Farm* 1998; 64(Extr): 53-63.
  7. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock J. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall. Madrid, 1997.
  8. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62(2): 504-44.
  9. Hough D, Danson M. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 1999; 3(1): 39-46.
  10. Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 2003; 94(2): 295-300.
  11. Silva AS. Bacilos gramnegativos no fermentadores. En: *Procedimientos y técnicas de Laboratorio*. Lobos H, García J, eds. Universidad de Chile. Santiago de Chile, 1983. p 39-50.
  12. Lévêque E, Janeček Š, Haye B, Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 26: 3-14.
  13. Pachon L, Posada Y. Cuantificación de poblaciones anaerobias aminoacidolíticas y aminolíticas de un yacimiento termal de Palpa, Boyacá. *Microbiología Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA). Bogotá. D.C., 2003.
  14. Lee C-W, Ng A Y-F, Narayanan K, Sim E U-H, Ng C-C. Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables de aguas costeras tropicales. *Ciencias Marinas* 2009; 35(2): 153-67.
  15. ZoBell CE. *Marine Microbiology*. Chronica Botanica Company. Waltham MA. 1946.
  16. Von Riesen VL. Convenient, simplified preparation of less commonly used media. *J Clin Microbiol* 1975; 2(6): 554-5.
  17. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 1957; 23(1): 15-22.
  18. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001; 19(8): 627-62.

Manuscrito recibido el: 02/02/2013

Aceptado para su publicación el: 27/03/2013

#### Correspondencia:

Nombre: Jackelyn Borja

Dirección: Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM, Lima 1 - Perú.

e-mail: jackelyn@gmail.com