

BACTERIAS HALÓFILAS MODERADAS AISLADAS DE LAS MINAS SALINAS DE ATACUCHA - AYACUCHO

Moderately halophilic bacteria isolated from Atacocha salt brine in Ayacucho

Yadira Fernández-Jerí¹, Amparo I. Zavaleta¹, David R. Arahall²

RESUMEN

Las bacterias halófilas producen una gran variedad de metabolitos y enzimas con interesantes aplicaciones biotecnológicas. Con la finalidad de aislar bacterias halófilas moderadas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho, se recolectaron muestras de sal y se pre-enriquecieron en medio agua de sales al 5% suplementado con extracto de levadura al 0.5% durante una semana y luego se sembraron en medio sólido. De 40 aislados se seleccionaron 10 por presentar características morfológicas y culturales muy diferenciadas. A los aislados seleccionados se les determinó el rango de tolerancia al NaCl, temperatura, pH y sus características bioquímicas y nutricionales. Se encontró que los aislados toleraban cantidades de sal diferentes entre 0.1 y 4.0 M de NaCl, pero sus óptimos de NaCl se situaron entre 1.5 y 2.0 M, los rangos de temperaturas estuvieron entre 4 y 37 °C y los de pH entre 5 y 9. Las bacterias halófilas moderadas aisladas presentaron características fenotípicas propias de las especies de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*.

Palabras clave: Halófilos, halófilos moderados, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, Minas Salinas de Atacocha

SUMMARY

Halophilic bacteria produce a great variety of substances and enzymes with interesting biotechnological applications. In order to isolate moderately halophilic bacteria from saline environments in Atacocha (Ayacucho), salt samples were collected and inoculated in saline medium (5% total salts) with 0.5% yeast extract. After one week incubation they were streaked onto agar plates prepared with the same saline medium as before but solidified with 2% agar. Ten, out of 40 isolates, were selected based on their differential cultural and morphological features. Further characterization of the selected isolated included tolerance to NaCl, temperature and pH ranges for growth and some biochemical and nutritional tests. The strains tolerated 0.1 to 4.0 M NaCl and had their optima between 1.5 and 2.0 M, the temperatures and pH values enabling growth were 4 to 37 °C and 5 to 9, respectively. The moderately halophilic bacteria isolated showed phenotypic features similar to those of the species of the genera *Halomonas* and *Chromohalobacter*.

Key words: Halophiles, moderate halophiles, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, Atacocha Salt Brine.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos halófilos habitan en un amplio rango de ambientes salinos, presentan mecanismos de adaptación a las altas concentraciones salinas que consisten generalmente en la síntesis de compuestos orgánicos intracelulares que le son compatibles con los procesos metabólicos celulares^{1,2}.

Las bacterias halófilas moderadas, se caracterizan por crecer óptimamente a concentraciones de NaCl entre el 3 y 15%, se distribuyen en ambientes

salinos e hipersalinos y están constituidas por especies muy heterogéneas de diferentes géneros^{1,3}. Estos microorganismos producen compuestos de interés industrial como: solutos compatibles, enzimas, exopolisacáridos y presentan propiedades fisiológicas peculiares que facilitan su producción a escala industrial como el crecimiento a elevadas concentraciones salinas minimizan los riesgos de contaminación, los requerimientos nutricionales simples, el uso de un amplio rango de compuestos de carbono como única fuente de carbono y energía; y fácil manipulación genética^{1,2}.

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y Dpto. de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, España

La posición geográfica y la diversidad climática de las minas salinas de Atacocha ubicadas en el departamento de Ayacucho motivaron este estudio sobre el aislamiento y la caracterización de bacterias halófilas moderadas de interés biotecnológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

En octubre del 2003, se recolectaron muestras de sal provenientes de las minas salinas de Atacocha ubicadas a 41 km al noreste de la ciudad de Ayacucho a 3200 metros sobre el nivel del mar con latitud 13° 03' sur; longitud 74° 23' oeste. Las muestras se tomaron en recipientes estériles y se transportaron en frío al laboratorio para ser analizadas dentro de las 48 horas.

Aislamiento de bacterias halófilas. Las muestras de sal fueron sembradas en el medio agua de sales (SW) descrito por Rodríguez-Valera, 1981⁴ a concentraciones de sales de 5, 10, 15 y 20%, el pH se ajustó a 7.2 y las muestras se pre-enriquecieron a 37 °C por 72 horas. Después de este periodo de pre-enriquecimiento se realizaron diluciones seriadas al décimo utilizando como diluyente agua de sal esterilizada y se sembraron alícuotas de 50 µl, sobre agar SW a las mismas concentraciones de sales y condiciones de cultivo antes descritas. Las colonias que presentaron diferentes características fenotípicas de forma, tamaño, color y apariencia se seleccionaron y purificaron por tres pasajes sucesivos.

Características morfológicas. Las características culturales de los aislados fueron observadas sobre agar SW, después de 72 horas de incubación a 37 °C. La tinción Gram y la prueba de motilidad se determinaron en cultivos frescos de 24 horas.

Pruebas fisiológicas. La tolerancia a diferentes concentraciones de sal se determinó en el medio SW líquido suplementado con extracto de levadura al 0.5%. Las concentraciones salinas utilizadas fueron de: 0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 y 30.0 %. El pH óptimo se determinó en el medio sólido MH según el procedimiento de Mata y col., 2002⁵, el pH se ajustó con HCl o NaOH 1M. La temperatura óptima se determinó empleando el medio sólido MH, los aislados se cultivaron a: 4, 20, 37 y 45 °C.

Pruebas bioquímicas. La actividad catalasa, se determinó añadiendo peróxido de hidrógeno al 3% a

cultivos frescos de 24 horas de cada aislado, la formación de burbujas fue reportada como positiva. El reactivo "Oxidasa Droper" (BD-USA) se utilizó para determinar la actividad oxidasa según las especificaciones del fabricante.

El consumo de glucosa tanto por oxidación y fermentación fue estudiada en el medio basal Oxido-Fermentación, O/F (DIFCO) suplementado con NaCl al 7.5% y glucosa al 1%. En el medio TSI suplementado con NaCl al 7.5% se determinó la producción de H₂S y de gas.

La hidrólisis de gelatina se determinó usando el agar gelatina nutritiva de DIFCO suplementada con NaCl al 7.5%, los aislados se crecieron a 37 °C por 24 horas y la licuefacción se comprobó después de colocar los cultivos a 4 °C por 15 minutos.

Para la hidrólisis del almidón se empleó el medio agar almidón de DIFCO, suplementado con NaCl al 7.5%, los aislados se crecieron a 37 °C por 48 horas y la hidrólisis se comprobó después de este tiempo añadiendo una gota de lugol sobre las colonias. Al medio MH con 7.5% de NaCl se añadió Tween 20 al 1% (v/v), los aislados se crecieron por 48 horas, la presencia de un halo alrededor de la colonia indicaba hidrólisis de este compuesto químico. Además se determinó el crecimiento en agar McConkey suplementado con NaCl al 7.5%.

Pruebas nutricionales

En la determinación del consumo de carbohidratos se utilizó el medio SW al 7.5% de sales y se añadió cada uno de los carbohidratos a ensayar a la concentración de 0.2%⁵. Los carbohidratos empleados fueron: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, galactosa y manosa.

RESULTADOS

Las bacterias halófilas que presentaron características morfológicas y culturales diferentes en el agar agua de sales fueron aisladas. De los 40 aislados se seleccionaron 10 por presentar características muy diferentes tales como: crecer en un amplio rango de cloruro de sodio, a todos se les nombro como "Ata" seguido de un número del 1 al 10 (tabla 1). Los aislados Ata5 y Ata6 crecieron únicamente por encima de 5% de NaCl, los demás lo hicieron a partir de 2.5%. Casi todos los aislados tuvieron buen crecimiento hasta el 10% de NaCl y algunos incluso al 15%. En cuanto a

la temperatura se observó que sólo Ata1 creció a 4°C, los demás presentaron crecimiento entre 20 y 45 °C con temperaturas óptimas entre 20 y 37 °C. Los aislados soportaron el pH entre 5 y 9, con óptimos entre 6 a 8 lo que demuestra un comportamiento marcadamente neutrófilo a diferencia de otras halomonadaceas que presentan algo más de tolerancia a pHs básicos que ácidos, siendo algunas incluso alcalófilas.

Los aislados seleccionados fueron aeróbicos Gram negativos, pleomórficos, no hidrolizaron Tween 20, tampoco crecieron en agar McConkey, ni produjeron H₂S. Los aislados Ata8 y Ata10 hidrolizaron almidón, la prueba de oxidasa sólo resultó positiva para el aislado Ata8. El 90% y 80% de los aislados usaron la maltosa y glucosa como única fuente de carbono respectivamente, a cambio sólo una cepa (Ata7) creció a partir de fructosa (tabla 2).

Tabla 1. Características fisiológicas de las bacterias halófilas aisladas de las minas salinas de Atacocha – Ayacucho.

Características fisiológicas	Aislados									
	Ata1	Ata2	Ata3	Ata4	Ata5	Ata6	Ata7	Ata8	Ata9	Ata10
Crecimiento en NaCl (%)										
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5	+	++	++	+	-	-	++	++	++	-
5	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+
10	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
15	++	+	+	+	++	+	+	+	+	++
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura (°C)										
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
37	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH										
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Grado de crecimiento: -, ninguno; +, tenue; ++, bueno

Tabla 2. Características fenotípicas de las bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha - Ayacucho.

Características	Ata1	Ata2	Ata3	Ata4	Ata5	Ata6	Ata7	Ata8	Ata9	Ata10
Pigmentación de las colonias	anaranjada	crema	blanca	melón	crema	crema	blanca	blanca	melón	blanca
Motilidad	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Producción de ácido de glucosa	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Óptimo de Sal	5-15	3-10	3-10	5-10	10-15	5-10	3-10	3-15	3-10	10-15
Aerobio	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Anaerobio facultativo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Hidrólisis de gelatina	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Crecimiento en McConkey	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Consumo de:										
Glucosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Galactosa	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Maltosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Manosa	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Grado de crecimiento: -, ninguno; +, bueno

DISCUSIÓN

Las minas salinas de Atacocha en Ayacucho están expuestas a fluctuaciones de temperatura y precipitaciones fluviales. Antes de los 90 fueron de gran importancia económica para los pobladores de la región, ya que su explotación les abastecía de sal, sin embargo, esta actividad minera ha sido abandonada en los últimos años.

Las sales recolectadas de este ambiente presentaron colores: rosa, blanca y azul, estas coloraciones podrían deberse a las diferentes composiciones de minerales, debido a que los ambientes hipersalinos contienen elevadas concentraciones de sales, además de iones, siendo inhóspitos para la mayoría de microorganismos^{6,7,8}. Se ha descrito que en ambientes similares existe una microbiota adaptada a la halofilia^{2,9,10}. Asimismo, diversos estudios realizados en minas salinas muestran una amplia diversidad de microorganismos halófilos cuando asocian la concentración salina, el pH y la temperatura^{1,2,7}.

En función a las características morfológicas y fisiológicas, los aislados de las salinas de Atacocha son bacilos Gram negativos, aeróbicos y pertenecen al grupo de halófilos moderados por crecer

óptimamente en el rango de 3 a 15% de NaCl¹¹, además, los aislados seleccionados son neutrófilos. Estos hallazgos corroboran lo descrito por otros investigadores quienes demostraron que los microorganismos halófilos moderados son capaces de crecer entre 0.9 y 20.0% de sales totales y con un crecimiento óptimo cercano al 10.0%, destacando la presencia de diferentes especies de los géneros *Halomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Nesterenkonia*^{2,12,13}.

En base a las características morfológicas, fisiológicas bioquímicas y nutricionales, concluimos que las bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha en Ayacucho pertenecen a los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter* si bien existen algunas características diferenciales que podrían sugerir que se trate de especies nuevas. Así, el crecimiento en McConkey, la producción de H₂S y consumo de algunos carbohidratos descritos como positivos en las especies de los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*, dieron negativo en todos nuestros aislados. No obstante, debido a la enorme heterogeneidad que alberga la familia Halomonadaceae y al elevado número de especies descritas en los últimos años consideramos que es totalmente necesario continuar el estudio incorporando el análisis de las

secuencias del gen 16S rRNA, ya que este método molecular es la herramienta más valiosa para identificar los aislados o clasificarlos si se trata de nuevas especies.

Los aislados halófilos seleccionados presentan un buen crecimiento en un amplio rango de temperatura, pH y concentraciones de cloruro de sodio, características que son ventajosas en la producción de enzimas, aminoácidos y exopolisacáridos de interés industrial y biotecnológico, y por tanto se requiere también ampliar su estudio tanto en la parte de caracterización general como en la de sus usos potenciales.

AGRADECIMIENTOS

A los pobladores de la Comunidad de Atacocha por concedernos las muestras de sal.

Estudio financiado parcialmente por el Consejo Superior de Investigaciones del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos N° 05040301 y 06040321

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ventosa A, Nieto JJ, Oren A.** *Biology of moderately halophilic aerobic bacteria.* Microbiol. Molec. Biol. Reviews 1998; 62:504-544.
2. **Margesin R, Schinner F.** *Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology.* Extremophiles, 2001; 5: 73-83.
3. **Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana, A.** *Characteristics of the heterotropic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations.* Microbiol. Ecol. 1981; 7: 235-243.
4. **Mata JA, Martínez-Canovas MJ, Quesada E, Bejar VA.** *Detailed phenotypic characterization of the type strains of Halomonas species.* Syst. Appl. Microbiol. 2002; 25: 360-375.
5. **Onishi H, Kamekura M.** *Micrococcus halobius* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1972; 22: 233-236.
6. **Dobson SJ, McMeekin TA, Franzmann PD.** *Phylogenetic relationships between some members of the genera Deleya, Halomonas, and Halovibrio.* Int. J. Syst. Bacteriol. 1993; 43: 665- 673.
7. **Oren A.** *Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria.* FEMS Microbiol Ecol. 2002; 39: 1- 7.
8. **Rodríguez-Valera F.** "Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments". In Rodríguez-Valera, F (ed.), *Halophilic bacteria*, 1988; 1: 3-30
9. **Galinski E A.** *Osmoadaptation in bacteria.* Adv. Microbial Physiol 1995; 37: 273-328.
10. **Kushner DJ, Kamekura M.** "Physiology of halophilic eubacteria". In Rodríguez-Valera, F (ed.), *Halophilic Bacteria* 1988; 1: 109-140.
11. **Marshall BJ, Ohye DF, Christian B.** *Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium common wealth scientific and industrial research organization.* Applied Microbiol. 1971; 21: 363-364.
12. **Vreeland RH.** "Taxonomy of halophilic bacteria", 105-134. In Vreeland R H and Hochstein LI (ed.). *The biology of halophilic bacteria*, 1993. CRC Press, Boca Raton, Florida.
13. **Arahal DR, Ventosa A.** "The family Halomonadaceae". In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (ed). *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria.* Edited by. Springer, New York. 2006; 6: 811- 835.