

## OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE BACTERIAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE AMBIENTES MARINOS CONTAMINADOS

Tito Sánchez R.<sup>1,3</sup>, Katherine Arauco P.<sup>3</sup>, Juan Carlos Woolcott H.<sup>2</sup>, Jorge León Q.<sup>1</sup>, Hugo Galarreta<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, <sup>2,4</sup> Facultad de Química e Ingeniería Química

<sup>3</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM

### RESUMEN

Se aislaron un total de 124 cepas de bacterias marinas. Los resultados obtenidos dieron 70 cepas (56,44%) productoras de proteasas. En cinco cepas que presentaron los mejores halos se optimizaron sus parámetros cinéticos (NaCl, pH y temperatura). La cepa del género *Pseudomonas* presentó la mejor actividad proteolítica con crudos de 72 h. La caracterización fenotípica de las 05 cepas, tres fueron consideradas como miembros del género *Aeromonas*, una *Pseudomonas* y un *Alcaligenes*.

**Palabras clave:** Bacterias marinas, enzimas extracelulares, proteasas.

### ABSTRACT

It was isolated a total of 124 strains marine bacteria. The obtained results gave 70 strains (56.44%) with proteolytic activity. Five strains that presented the best halos to determinative the optimization of kinetic parameters (NaCl, pH and temperature). The genus *Pseudomonas* presented the best proteolytic activity with extracts of 72 hours. The phenotypic characterization of five strains, were 3 of genus *Aeromonas*, one *Pseudomonas* and one *Alcaligenes*.

**Keyboard:** Marine bacteria, extracellular enzymes, Proteases

### INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se aisló y selecciono bacterias marinas de zonas contaminadas con efluentes pesqueros. Los objetivos fueron aislar y seleccionar bacterias con capacidad de producir proteasas extracelulares de interés o aplicación biotecnológica, se optimizaron parámetros cinéticos de crecimiento, para evaluar la actividad enzimática de las cepas más representativas y realizar su caracterización fenotípica.

Los microorganismos marinos psicrófilos, halotolerantes, poseen procesos metabólicos adaptados a bajas temperaturas, realizan sus actividades en condiciones adversas, como altas concentraciones de sales, presiones hidrostáticas, pH alcalinos,

y condiciones anóxicas, entre otras, produciendo sus enzimas en estas condiciones, con actividades óptimas en un rango de temperatura inferior a la de las bacterias mesófilos<sup>(4)</sup>.

Estos microorganismos marinos con estas características pueden ser utilizados en procesos donde sea necesario el trabajo a temperaturas ambientales o bajas. Las proteasas son las enzimas más utilizadas en la industria de los detergentes, de alimentos y otras bebidas, clarificación de cerveza, ablandamiento de carnes rojas, industria del cuero, entre otras<sup>(15)</sup>.

Hoy en día la tecnología enzimática ocupa un papel preponderante dentro de la

biotecnología y específicamente dentro del sector alimentario y farmacéutico. Alrededor del 65% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria, aunque es conveniente señalar que sólo las proteasas alcalinas empleadas en la industria de detergentes ocupan 25% del total, las restantes corresponden a aplicaciones en las áreas farmacéuticas, industrial y analítica. Una alternativa para mejorar la eficiencia, reducir los costos y aumentar la disponibilidad de algunas enzimas, es el de buscar y seleccionar microorganismos con estas capacidades a partir de ambientes marinos, evaluar sus actividades enzimáticas y realizar su caracterización, así mismo determinar las condiciones óptimas de crecimiento de las bacterias seleccionadas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

Las muestras empleadas para el presente estudio se tomaron del mar en zonas costeras, contaminadas con efluentes de la industria pesquera (sanguazas), provenientes de fábricas procesadoras de recursos hidrobiológicos de nuestro litoral. Las zonas de muestreo fueron: Bahía de Paracas, Terminal Pesquero de Ventanilla, Chancay y Chimbote.

### **Recolección de muestras**

Se tomaron un total de 30 muestras de agua de mar, en frascos estériles de 250 mL de capacidad a una distancia entre 5 a 50 metros de la orilla. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

### **Procesamiento de las muestras**

Las muestras recoleccionadas fueron procesadas en el laboratorio, mediante la técnica de las diluciones seriadas al décimo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$

..  $10^{-5}$ ), utilizando tubos con agua de mar filtrada y esterilizada como diluyente. Para el aislamiento y recuento de bacterias marinas se sembraron alícuotas de 0,1 mL de las diluciones, por el método de incorporación en Agar Marino (AM) 2216 (Difco), de acuerdo al Manual of Method for General and Molecular Bacteriology<sup>(6, 2)</sup>.

### **Selección de cepas proteolíticas**

Para determinar la capacidad proteolítica de las cepas se tomaron 10 mL de los cultivos de 48 h y se repicaron en Agar Marino suplementado con caseína al 1%. Los cultivos fueron incubados a 25°C hasta por 5 días. La capacidad hidrolítica de las cepas se reconocieron mediante la formación de halos transparentes alrededor de las colonias, los halos se midieron cada 24 horas por un periodo de 05 días. Las cepas seleccionadas fueron las que mantuvieron mejor estabilidad y presentaron los mayores halos en el menor tiempo.

### **Optimización de los parámetros de crecimiento**

La optimización de los parámetros cinéticos se realizó en caldo marino (CM) con 5 cepas. Se determinaron los perfiles térmicos (5, 8, 15, 25, 37 y 44°C), pH (5, 6, 8, 9 y 10) y concentraciones crecientes de NaCl (0, 3, 6, 9, y 10%).

### **Evaluación de la actividad proteolítica.**

Para estimular la actividad enzimática de las cepas se sembraron 1 mL de cultivos ( $10^6$  UFC/mL) en frascos con 100 mL de caldo marino (CM) suplementado con caseína al 1%, incubados a 25°C y agitación constante de 120 rpm por 48 horas. La actividad enzimática fue determinado con los sobrenadantes de crudos obtenidos por centrifugación a 2500 rpm, según la metodología recomendada<sup>(9, 16)</sup>. El ensayo se realizó tomando alícuotas de 0,2., 0,5 y 1 mL de los sobrenadantes. Se enfrentó a una solución de caseína (Difco) al 1%. La mezcla se incubó en baño maría por 20 minutos a 25 °C y se detuvo la reacción

con Ácido tricloroacético (ATC), luego de centrifugar a 2500 rpm se midió su D.O. a 280 nm. Se repitió el experimento con las 05 cepas utilizando los crudos enzimáticos obtenidos de los cultivos de 24, 48, 72, y 96 horas y se determinó la actividad enzimática cada 24 horas, empleando volúmenes constantes de 0,5 mL.

### Caracterización fenotípica de las cepas marinas aisladas

La caracterización fenotípica se realizó mediante métodos convencionales en tubos y placas. Como medio base para todas las pruebas se utilizó el CM o AM según se requiera. La temperatura de incubación se realizó a 25°C por 5 días. Las cepas en estudio fueron sometidas a pruebas según procedimiento descritos<sup>(1, 10, 12)</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y selección de cepas

Se aislaron un total de 124 cepas de bacterias marinas. Las evaluaciones preliminares dieron 70 cepas (56,44%) productoras de proteasas (Tabla 1). Estos resultados se asemejan a los publicados<sup>(7)</sup> al evaluar la producción de enzimas extracelulares (EEC) en bacterias aisladas de invertebrados marinos del litoral peruano, encontró que de un total de 102 (100%) cepas con actividad multienzimática, el 62,74% presentaron actividad proteolítica. Por otro lado otros investigadores<sup>(3,8)</sup>, reportan el hallazgo de bacterias proteolíticas en diversas zonas de las costas del Japón asociadas a invertebrados marinos coleccionadas en áreas infralitorales del mediterráneo respectivamente.

En la Tabla 2 se muestran nuestros resultados de las colonias que produjeron halos de actividad proteolítica, algunas cepas superaron los 20 mm de diámetro después de las 96 h de incubación. En la Figura 1 se evidencia la formación del halo de actividad de la cepa CM48.

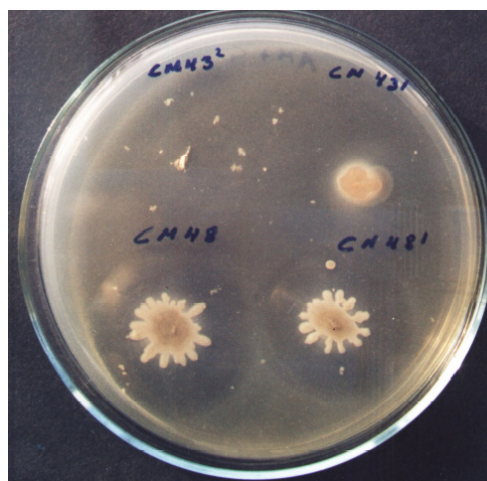
**Tabla 1:** Muestras realizadas en diferentes zonas del litoral peruano para el aislamiento de bacterias marinas productoras de proteasas

Zonas de Muestreo	Cepas aisladas	Cepas	Cepas no proteolíticas	Total
Chancay (30 - 06 - 00)		4	26	30
Chimbote (13 - 07 - 00)		30	18	48
Paracas (20 - 08 - 00)		8	6	14
Terminal Ventanilla (16 - 10 - 00)		28	4	32
		<b>70</b>	<b>54</b>	<b>124</b>

**Tabla N.º 2.** Actividad proteolítica de las cepas seleccionadas en placas de AM suplementado con caseína.

Cepas	Tamaño de los halos formados por las colonias según el tiempo de incubación					
	T. de incubación	24	(h) 48	72	96	120
CM43		±	++	+++	+++	+++
CM44		+	++	++	+++	+++
CM45		+	++	+++	+++	+++
CM46		+	++	++	++	++
CM48		+	++	+++	++++	++++

± : Halo alrededor del hoyo    +++ : Tamaño aprox. 20 mm  
 + : Tamaño aprox. 10 mm    ++++ : Tamaño aprox. 25 mm  
 ++: Tamaño aprox. 15 mm



**Figura 1:** Actividad proteolítica de la cepa CM48 en AM suplementado con caseína al 1%. Observe el halo transparente alrededor de la colonia. (cultivo de 96 h).

### Determinación de los parámetros óptimos de crecimiento

Fueron seleccionadas 5 cepas para evaluar su crecimiento. Los resultados de la evaluación frente a diferentes concentraciones de NaCl (0% a 10%) se presentan en la Tabla 3. En ella se observa que la mayoría de las cepas crecen en un amplio rango de salinidad incluyendo 0% de NaCl (cepas, CM43, CM44, CM45, y CM46). La presencia de este tipo de bacterias ha sido ampliamente estudiado por otros autores, quienes asignan como posibles cepas alóctonas que se adaptan a las condiciones marinas, lo cual es característico de bacterias de aguas continentales o de origen terrestre<sup>(14)</sup>, 3 cepas crecieron en 10% de NaCl (CM43, CM45, CM48), todas tuvieron buen crecimiento en el rango de 3 a 9% de NaCl. La cepa CM48 fue la única que no creció en ausencia de NaCl, considerada como una cepa autóctona del mar. Se realizaron estudios en ambientes marinos encontrando bacterias proteolíticas halotolerantes a altas concentraciones de NaCl (3-20%), con un crecimiento óptimo a 14% de NaCl<sup>(11)</sup>.

Siendo las bacterias dominantes del género *Pseudomonas*, *Acinetobacter* spp y un menor porcentaje *Flavobacterium* spp y *Caulobacter* spp, y Gram positivos como *Bacillus* y *Micrococcus*.

El perfil de pH (5,0 a 10,0), todas las cepas crecieron en este rango de pH, demostrando su carácter alcalino. En cuanto al perfil térmico ninguna de las cepas creció a 5°C. Cuatro cepas crecieron entre 8 a 44°C, excepto la cepa CM43 que tuvo como temperatura límite 37°C. En relación con nuestros resultados<sup>(17)</sup> aislaron 8 cepas de *Pseudomonas* de biotopos costeros antárticos, productoras de proteasas con una actividad óptima a 25°C a pesar de haber sido aisladas de temperaturas bajas. Estas temperaturas de crecimiento son características de los microorganismos considerados como psicrotróficos.

### Evaluación de la actividad proteolítica

La evaluación de la actividad proteolítica de las cepas CM43, CM44, CM45, CM46 y CM48

**Tabla N.º 3:** Evaluación de Parámetros Físicoquímicos de las Cepas con Actividad Proteolítica Seleccionadas.

Parámetros \ Cepas	CM43	CM44	CM45	CM46	CM48
<b>NaCl (%)</b>					
0	++	++	+	++	-
3	++	++	++	++	++
6	++	++	++	++	++
9	++	+	+	+	++
10	+	-	+	-	+
<b>pH:</b>					
5.0	+	+	+	+	+
6.0	++	++	++	++	++
8.0	++	++	++	++	++
9.0	++	++	++	++	++
10.0	+	+	+	+	+
<b>Temp. (°C):</b>					
5	-	-	-	-	-
8	++	+	++	+	+
15	++	++	++	+	++
25	++	++	++	++	++
37	+	++	++	++	++
44	-	+	++	+	++

- : No crecimiento  
 + : Crecimiento tenue  
 ++ : Buen crecimiento

mostró que la cepa CM48 del género *Pseudomonas* fue la que presentó mayor actividad, con los diferentes volúmenes de los crudos enzimáticos utilizados (0,2., 0,5 y 1 mL), dando actividades enzimáticas de 1.22, 2.48 y 3.0 U respectivamente por cada volumen utilizado. Asimismo en la evaluación posterior con un volumen constante (0,5 mL), tomados de cultivos de diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h), las actividades enzimáticas más altas correspondieron igualmente la cepa CM48, con valores de 4.95 U con un cultivo de 72 h, y de 5.36 U con un cultivo de 96 horas (Tabla 4 y Figura 2), También encontraron valores similares<sup>(18)</sup> de actividad proteolítica de 33,65 U/mL, aunque dichos autores emplearon una cepa de *Flavobacterium indolegenes* cultivadas en medio Horikoshi (inductor de proteasas) en agitación constante de 200 rpm y 30°C de incubación, durante 72 horas. Otros investigadores<sup>(17)</sup> reportan la actividad proteolítica de 8 cepas de *Pseudomonas* aisladas de biotopos costeros antárticos. Las proteasas mostraron actividades de 1700 U/L a 1x10<sup>5</sup> U/L en extractos de cultivos de 48 a 72 h, a 20°C.

**Tabla 4:** Actividad proteolítica de los extractos (0,5 ml) de 05 cepas, en cultivos de diferentes tiempos (h) y 1,0 ml de sustrato caseína al 1%

CEPAS	Actividad enzimática (U) a diferentes tiempos (h)			
	24	48	72	96
CM43	1.5214	2.1252	3.3656	3.4070
CM44	1.7758	1.9993	2.2467	2.2456
CM45	1.0285	1.5130	3.3256	3.3010
CM46	1.2117	1.3245	2.0801	2.0608
CM48	2.1239	3.009	4.9551	5.1850

La evaluación de la actividad proteolítica de crudos enzimáticos mediante la formación de halos en levaduras marinas pertenecientes a los géneros *Pichia* y *Debaryomyces* en medio papa dextrosa suplementado con caseína al 1% e incubados a temperatura ambiente por 4 días<sup>(13)</sup> mostraron halos de 4 a 11 mm de diámetro. Estos valores, a pesar que en nuestro caso no se trabajó con levaduras, son de alguna manera comparables a los halos presentados por nuestras cepas luego de 4 días de incubación en medio AM suplementado con caseína al 1%, siendo la cepa CM48 una *Pseudomonas* sp la que mostró mayor actividad, con un diámetro superior a 20 mm de diámetro a las 96 horas de incubación a 25°C y a un pH de 8 (Tabla 2). La actividad

proteolítica de 05 cepas marinas (CM43, CM44, CM45, CM46 Y CM48) comparadas con otros trabajos mencionados resultan ser interesantes para continuar los estudios relacionados a mejorar las condiciones de crecimiento y producción de enzimas proteolíticas extracelulares en microorganismos marinos. El mayor valor de D.O obtenido de 1.073 correspondió a la cepa CM48 con un cultivo de 96 h, equivalente a una actividad enzimática de 5.365 U.

#### Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de 11 cepas seleccionadas se muestra en la Tabla 5. De

**Tabla 5:** Caracterización fenotípica de 5 cepas proteolíticas seleccionadas.

Cepas	CM 43	CM 44	CM 45	CM 46	CM 48
Característica					
Morfología Gram	B(-)	B(-)	CB(-)	B(-)	B(-)
Motilidad	+	+	+	+	+
Disp. flagelar	Mon	Mon	Per	Mon	Pol
Indol	-	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-	+	-	-
Luminiscencia	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	-
Oxidasa	+	+	-	+	+
Enz.s Extrac:					
DNAsa	+	+	-	+	-
Celulasa	-	-	-	-	-
Amilasas	+	-	+	-	-
Caseinasa	+	+	+	+	+
Lipasas	+	+	+	+	+
O/F(glucosa):	Ks/F	Ks/F	KsO/F	Ks/F	KsO

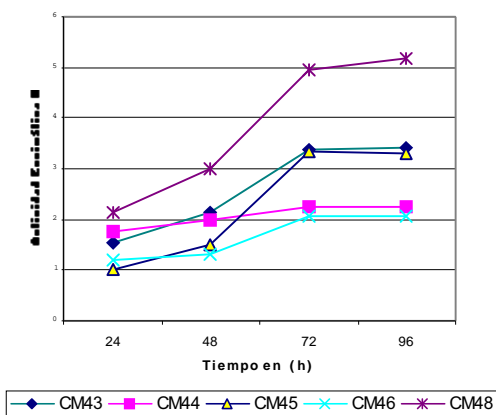
B : Bacilos                      CB : Cocobacilos              per. : Peritricos  
G(+) : Gram. Positivo              O : Oxidativo              F : Fermentativo  
+ : Positivo                      - : Negativo              K : Alcalino  
Ks : Superficie alcalina              Pol : Polar              Mon : Monotricos

acuerdo a la caracterización fenotípica, las 05 cepas fueron Gram negativas, pertenecientes a los siguientes géneros: **Aeromonas** las cepas CM43, CM44 y CM46, **Pseudomonas** la cepa CM48 y **Alcaligenes** la cepa CM45.

## CONCLUSIONES

De un total de 124 (100%) cepas marinas aisladas, las bacterias con capacidad de producir enzimas proteolíticas fueron 70 (56,44%), las cuales a su vez guardan relación directa con los substratos disponibles en las zonas contaminadas con efluentes pesqueros (sanguazas).

Las bacterias marinas productoras de proteasas y otras exoenzimas, poseen altas actividades a bajas temperaturas, ideales para ser utilizadas en la tecnología de detergentes y en la industria de alimentos también ofrecen alternativas en la prevención, control y biorremediación de ambientes marinos contaminados con efluentes orgánicos. Los resultados mostraron que la cepa con mayor actividad proteolítica es la CM48 perteneciente al género **Pseudomonas**, considerada como autóctona de ambientes marinos por crecer óptimamente en pH alcalino y necesitar para su crecimiento NaCl. La mayoría de las cepas evaluadas resultaron ser psicrótróficas, halotolerantes (3 al 9% de NaCl) y de crecimiento a pH alcalino.



**Figura N.º 2.** Actividades proteolíticas de los cruados enzimáticos (0,5 mL) de cinco cepas tomados de cultivos de diferentes tiempos de incubación en 1,0 mL de caseína al 1%.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] BAUMANN, L., Baumann, M., Mandel M. & Allen, R. Taxonomy of aerobic marine eubacteria J. Bacteriol 110: 402 - 429. 1972.
- [2] BERGEY'S Manual of determinative bacteriology 9° Edition. Baltimore Maryland. 1994.
- [3] DUONG, V. Occurrence and generic composition of protease – Producing moderately hemophilic bacteria in neritic seawater around Japan. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries-Japan. 1981.
- [4] FELLER, G., Narinx, E., Arpingny, J., Haleb, M., Baise E., Genicot S., Gerday, Ch. Enzymes from psychrophilic organisms. FEMS Microbiol. Rev. 18: 189 - 202. 1996.
- [5] KJELLEBERG, S. & Hakansson, N. Distribution of lipolític, proteolític and amilolític marine bacteria between the lipid film and the subsurface water. Mar. Bio. 39; 103 -109. 1997.
- [6] KOCH, Al. Methods for general and molecular bacteriology. Arm Society for Microbiology. Washington DC. Pp. 254 - 257. 1994.
- [7] LEÓN, J., Pellon, F., Uceda, V., David, J. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. Rev. Perbiol. 7(2) 2002-210. Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM. 2000.
- [8] MARTY, P. & Martín, Y. Bacteria hetérotrophes aerobies Isolées of invertebrés benthiques des eaux côtières méditerranéennes, Marine Life, 1(1): 1 - 8. France. 1992.
- [9] NIETO, T. y Ellis, A. Characterization of extracellular metallo and serine proteases of *Aeromona hydrophila*. Gen. Microbiol. 132: 1975 - 1979. 1986.
- [10] OLIVER, JD. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. Sup. Sea liss . 29: 795-798. 1981.

- [11] ONISHI, H., Mac Cane, M. & Gibbons, E. Can. Journal Micro. 11: 365 - 373.1965.
- [12] ORTIGOSA, M. Garay, E., & Pujalte, M-J. Numerical taxonomy of aerobic, Gram – negative bacteria associated with oysters and surrounding seawater of the Mediterranean coast. Appl. Microbiol.17: 589 - 600. 1994.
- [13] RAMÍREZ, O., Hernández, N y Ochoa, J. Aprovechamiento biotecnológico de levaduras marinas. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. P. III. 68. México. 1999.
- [14] RONALD, M., Bartha, R. Ecología microbiana y microbiología ambiental, 4ta. Edición. Edit. Pearson Educación, S.A. Madrid-España. 1998.
- [15] SCHMIDT H. Avances en ciencia y tecnología de los alimentos. Alfabetá Impresora., Santiago de Chile. 1981.
- [16] TAKAHASHI, T. And Osaka, A. Purification and characterization of a protein in venom of *Trimeresurus flavoviridis*, Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. Biochem Biophys. Acta. 198: 293. 1970.
- [17] VÁZQUEZ, S., Mac Cormack, W. y Fraile E. Caracterización de proteasas producidas por bacterias psicrotróficas Antárticas, V Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. P IV. 8. México. 1999.
- [18] VELÁZQUEZ, R., Monroy, A. y Oliart, R. Purificación y caracterización parcial de las proteasas alcalinas producidas por *Flavobacterium indolegenes*. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería P.I.49-México. 1999.