

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



## **“OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) CON ACTIVIDAD EMULSIFICANTE DE BACTERIAS HALÓFILAS AISLADAS DE LA LAGUNA DE SALINAS AGUADA BLANCA, AREQUIPA”**

Trabajo de Investigación presentado por la bachiller:

CARLA CYNTHIA INES PALOMINO DURAND

Para obtener el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Francisco Javier Roque Rodríguez

AREQUIPA-PERÚ

2014

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	VI
<b>RESUMEN</b> .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	XI
<b>CAPÍTULO I</b> .....	- 1 -
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	- 1 -
<b>HIPÓTESIS</b> .....	- 3 -
<b>OBJETIVOS</b> .....	- 4 -
<b>VARIABLES DE ESTUDIO</b> .....	- 5 -
<b>CAPÍTULO II</b> .....	- 6 -
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	- 6 -
2.1.    Ambientes hipersalinos.....	- 6 -
2.1.1.    Laguna de Salinas.....	- 7 -
2.2.    Microorganismos halófilos.....	- 8 -
2.2.1.    Clasificación de los microorganismos halófilos según sus requerimientos Salinos.....	- 8 -
2.2.2.    Adaptación de los microorganismos a los ambientes salinos.....	- 9 -
2.2.3.    Bacterias halófilas.....	- 11 -
2.2.3.1.    Bacterias halófilas extremas.....	- 11 -
2.2.3.2.    Bacterias halófilas moderadas.....	- 11 -
2.2.3.3.    Bacterias halófilas débiles.....	- 12 -
2.3.    Exopolisacáridos microbianos.....	- 13 -
2.3.1.    Definición.....	- 13 -
2.3.2.    Papel Fisiológico.....	- 15 -
2.3.3.    Composición.....	- 16 -
2.1.1.    Estructura.....	- 17 -

2.1.1.1.	Homopolisacáridos.....	- 18 -
2.1.1.2.	Heteropolisacáridos.....	- 19 -
2.1.1.	Producción de EPS.....	- 21 -
2.1.2.	Extracción y Purificación de EPS.....	- 22 -
2.1.3.	Aplicaciones de los EPS bacterianos.....	- 23 -
2.2.	Perspectivas futuras.....	- 24 -
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>- 25 -</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>- 25 -</b>
<b>3.1. MATERIALES.....</b>		<b>- 25 -</b>
3.1.1.	Lugar de Ejecución.....	- 25 -
3.1.2.	Material Biológico.....	- 25 -
3.1.3.	Material de vidrio.....	- 25 -
3.1.4.	Reactivos.....	- 25 -
3.1.5.	Equipos.....	- 27 -
3.1.6.	Otros.....	- 27 -
<b>3.2. MÉTODOS.....</b>		<b>- 28 -</b>
3.2.1.	Recolección de muestras.....	- 28 -
3.2.2.	Aislamiento de bacterias halófilas nativas de la Laguna de Salinas.....	- 29 -
3.2.3.	Caracterización morfológica de las cepas nativas encontradas.....	- 30 -
3.2.4.	Obtención de exopolisacáridos (EPS) de las cepas nativas seleccionadas.....	- 31 -
3.2.5.	Caracterización bioquímica de las bacterias nativas aisladas.....	- 32 -
3.2.6.	Caracterización molecular de las bacterias halófilas nativas.....	- 33 -
3.2.7.	Determinación la actividad emulsificante de los EPS extraídos.....	- 34 -
3.2.8.	Determinación del efecto de la temperatura en la producción de EPS.....	- 34 -
3.2.9.	Análisis Estadístico.....	- 36 -
<b>3.3. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.....</b>		<b>- 37 -</b>
<b>CAPITULO IV.....</b>		<b>- 38 -</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>- 38 -</b>
4.1.	Recolección de muestras.....	- 38 -

4.2.	Aislamiento de bacterias halófilas nativas de la Laguna de Salinas.....	- 39 -
4.3.	Caracterización microscópica de las cepas nativas encontradas. ....	- 40 -
4.4.	Obtención de exopolisacáridos (EPS) de las cepas nativas seleccionadas-	45 -
4.5.	Caracterización bioquímica de las bacterias nativas aisladas.....	- 48 -
4.6.	Caracterización molecular de las bacterias nativas aisladas.....	- 54 -
4.7.	Determinación la actividad emulsificante de los EPS extraídos.....	- 58 -
4.8.	Determinación del efecto de la temperatura en la producción de EPS.....	- 62 -
<b>CAPITULO V</b>	.....	- 65 -
<b>CONCLUSIONES</b>	.....	- 65 -
<b>RECOMENDACIONES</b>	.....	- 67 -
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	.....	- 68 -
<b>ANEXOS</b>	.....	- 73 -
Anexo 1.	Puntos de muestreo en la Laguna de Salinas.....	- 73 -
Anexo 2.	Medio de cultivo TSI.....	- 74 -
Anexo 3.	.....	- 76 -
Hidrólisis de	gelatina.....	- 76 -
Hidrólisis de	almidón.....	- 77 -
Anexo 4.	Medio SIM.....	- 78 -
Anexo 5.	Caldo Tioglicolato.....	- 80 -
Anexo 6.	Caldo nitrato.....	- 82 -
Anexo 7.	Agar Manitol Salado.....	- 84 -
Anexo 8.	Prueba de oxidasa.....	- 86 -
Anexo 9.	Protocolo del Kit Wizard Genomic Dna Purification (Promega).....	- 87 -
Anexo 10.	Medida de la salinidad de las muestras recolectadas.....	- 89 -
Anexo 11.	Análisis estadístico.....	- 90 -
Anexo 12.	Electroferograma de la región 16S de rRNA de la cepa M2R1-B.....	- 93 -
Anexo 13.	Electroferograma de la región 16S de rRNA de la cepa M3R1-A.....	- 95 -
Anexo 14.	Análisis estadístico de la optimización.....	- 97 -

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Laguna de Salinas en la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca. ....	- 7 -
Figura 2. Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y haloterantes. (González-Hernández & Peña, 2002) (13) .....	- 10 -
Figura 3. Aspecto de las colonias de <i>Halomonas maura</i> B100 tras 48 horas de la siembra en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales (Mata-Gómez, 2006) (6).....	- 15 -
Figura 4. Estructura de los azúcares que conforman un EPS (Murray, 2007) (30) ....	- 17 -
Figura 5. Diseño del sistema de agitación constante para la optimización de la producción de EPS. A. Diseño de la paleta de agitación. B. Vista lateral del frasco a usar. C. Vista tridimensional de la conformación final del sistema.....	- 35 -
Figura 6. Muestra de agua de la Laguna de Salinas.....	- 38 -
Figura 7. Dilución a partir de muestras con crecimiento. A. Medio líquido con crecimiento bacteriano. B. Medio líquido con dilución 1:10.....	- 39 -
Figura 8. Cultivo inicial de bacterias halófilas nativas. ....	- 40 -
Figura 9. Fotografías de las 8 cepas halófilas nativas seleccionadas cultivadas en medio MY suplementado con 7,5% de sales a 37°C por 72 horas. (A) M1R3-B. (B) M2R1*A (C) M2R1*B (D) M2R1-B (E) M3R1-A (F) M3R1*A (G) M3R2 (H) M3R2*A.....	- 41 -
Figura 10. Observación microscópica a100x de la coloración de Gram de las 8 cepas Nativas seleccionadas. (A) M1R3-B. (B) M2R1*A (C) M2R1*B (D) M2R1-B (E) M3R1-A (F) M3R1*A (G) M3R2 (H) M3R2*A.....	- 43 -
Figura 11. Exopolisacárido final liofilizado.....	- 45 -
Figura 12. Fotografía de la Prueba en Agar TSI. (1) Fermentador de glucosa. (2) Fermentador de glucosa y lactosa. ....	- 50 -
Figura 13. Fotografías de las pruebas de Hidrólisis. A. Hidrólisis de Almidón. B. Hidrólisis de Gelatina.....	- 51 -
Figura 14. Fotografía de la prueba de Tioglicolato. A. Cepa anaerobia facultativa. B. Cepa aerobia estricta .....	- 52 -
Figura 15. Fotografía de la prueba de reducción de nitratos.....	- 52 -
Figura 16. Fotografía del cultivo en Agar Manitol Salado .....	- 53 -
Figura 17. Emulsiones con fase acuosa de EPS extraídos después de 24 horas. A. Fase oleosa de vaselina líquida. B. Fase oleosa de aceite de soya. ....	- 59 -
Figura 18. Sistema con agitación constante para la determinación del efecto de la temperatura en la producción de EPS. ....	- 62 -
Figura 19. Crecimiento bacteriano dentro del sistema. (A) Cultivo en tiempo inicial. (B) Cultivo después de 5 días de incubación. ....	- 63 -
Figura 20. Localización de la Laguna de Salinas, Google Earth ® .....	- 73 -

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de halófilos en función de la salinidad <sup>1</sup> .....	- 9 -
Tabla 2. Microorganismos en la Laguna de Salinas .....	- 13 -
Tabla 3. Composición general de los EPS bacterianos <sup>1</sup> .....	- 18 -
Tabla 4. Heteropolisacáridos más conocidos .....	- 20 -
Tabla 5. Codificación de las muestras recolectadas .....	- 28 -
Tabla 6. Composición del medio MY <sup>1</sup> suplementado al 7,5% de sales .....	- 29 -
Tabla 7. Solución de Sales 30% <sup>1</sup> .....	- 30 -
Tabla 8. Origen de las muestras de agua de la Laguna Salinas .....	- 38 -
Tabla 9. Características macroscópicas de las bacterias halófilas nativas aisladas de la Laguna Salinas .....	- 42 -
Tabla 10. Características microscópicas de las bacterias aisladas .....	- 44 -
Tabla 11. Eficacia de la producción de EPS de cada cepa halófila nativa. <sup>1</sup> .....	- 46 -
Tabla 12. Principales características bioquímicas de las Bacterias Halófilas Aisladas .....	- 49 -
Tabla 13. Microorganismos que presentan homología con la secuencia de la cepa M2R1-B .....	- 57 -
Tabla 14. Microorganismos que presentan homología con la secuencia de la cepa M2R1-B .....	- 57 -
Tabla 15. Porcentaje de emulsificación de los EPS extraídos .....	- 59 -
Tabla 16. Producción de EPS de la cepa M3R1-A a diferentes temperaturas .....	- 63 -
Tabla 17. Datos de Salinidad para las muestras de agua obtenidas .....	- 89 -
Tabla 18. Resumen Estadístico de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 90 -
Tabla 19. ANOVA de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 90 -
Tabla 20. Resumen Estadístico de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 91 -
Tabla 21. ANOVA de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 91 -
Tabla 22. Resumen Estadístico de la Productividad de mgEPS/mg Biomasa .....	- 92 -
Tabla 23. ANOVA Productividad de mgEPS/mg Biomasa .....	- 92 -
Tabla 24. Resumen Estadístico de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 97 -
Tabla 25. ANOVA de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 97 -
Tabla 26. Resumen Estadístico de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 98 -
Tabla 27. ANOVA de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo .....	- 98 -
Tabla 28. Resumen Estadístico de la Productividad de mgEPS/mg Biomasa .....	- 98 -
Tabla 29. ANOVA de la Productividad de mgEPS/mg Biomasa .....	- 99 -

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparación de la producción de EPS de las 8 cepas aisladas.....	- 47 -
Gráfico 2. Comparación del rendimiento de EPS de las 8 cepas aisladas. ....	- 48 -



## DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a Dios quién supo darme fuerzas para seguir adelante, no desmayar en los problemas que se presentaron y por haberme permitido llegar hasta este punto.

A mis abuelos Humberta y Enrique, por el amor y el apoyo incondicional que siempre me brindaron desde que vine a este mundo y me siguen brindando a lo largo de este camino, les dedico este trabajo con mucho cariño.

A mis padres Ana María y Ladislao, por todo el amor, apoyo, consejos, comprensión, y ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y mi coraje para conseguir mis objetivos y este trabajo es una pequeña retribución hacia ellos.

A mi hermana Ana Cecilia por ser parte importante en mi vida, por su apoyo y porque siempre confió en mí.

*"El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad."*

**Víctor Hugo**



## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Católica de Santa María, al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica, de forma especial a todos los docentes que durante los cinco años de carrera me brindaron las enseñanzas y conocimientos necesarios para mi formación profesional.

A mi asesor el Ing. Javier Roque por brindarme su apoyo y tiempo para desarrollar satisfactoriamente la presente tesis.

Al Dr. Roberto Castellanos por su ayuda para el desarrollo de la parte experimental mi tesis.

A mis jurados, por su amabilidad, buena disposición, paciencia y por el tiempo que me dedicaron para que este trabajo culminara exitosamente.

A mi familia por el apoyo brindado tanto en mi formación académica, como en el desarrollo de este trabajo.

A mis tios Betty, Norma, Carlos y Freddy por todo su apoyo y confianza.

A Keny por su apoyo moral y por su paciencia.

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la cantidad de exopolisacáridos (EPS) sintetizados por bacterias halófilas nativas aisladas de la Laguna de Salinas de Arequipa y su actividad emulsificante. Se realizó la toma de muestras de la Laguna de Salinas ( $16^{\circ}22'14.36''$  S  $71^{\circ}06'17.12''$  O) de la cual se obtuvieron 9 muestras. A partir de estas muestras se aislaron bacterias en el medio MY suplementado con sales al 7,5% y se seleccionó 8 bacterias, cuyas colonias presentaban un aspecto viscoso o cremoso, características deseadas para la producción de EPS. Todas las bacterias fueron bacilos, 3 gram positivos y 5 gram negativos y fueron nombradas según la muestra de donde procedían. El método de extracción de EPS se realizó a cada una de las bacterias seleccionadas después de 5 días de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio líquido MY suplementado con sales al 7,5% y fue de la siguiente manera: el cultivo fue centrifugado y a partir del sobrenadante los polisacáridos precipitaron con tres volúmenes de alcohol 96% frío toda la noche, después fueron centrifugados, redisolto en agua destilada, centrifugados a máxima velocidad, dializados contra agua destilada y finalmente liofilizados. Como resultado se obtuvo que fueron 3 cepas, M2R1\*B, M2R1-B y M3R1-A, las que produjeron más EPS. El máximo valor de EPS fue de 48,45 mg/ 100 mL (0,184 mg EPS/ mg Biomasa) para la cepa M3R1-A. Se caracterizó bioquímicamente las 8 cepas, encontrando semejanza con los géneros *Halomonas*, *Salinivibrio* y *Bacillus*.

También se realizó la caracterización molecular con el gen 16s rRNA de dos cepas: una gram negativa (M2R1-B) y otra gram positiva (M3R1-A), siendo éstas de los géneros *Halomonas sp.* y *Bacillus licheniformis*, respectivamente. A los EPS extraídos se les hizo un ensayo de emulsificación con dos compuestos oleosos, donde la cepa de M2R1-B dio un porcentaje de emulsificación de 29,90% para vaselina líquida, siendo el mayor valor encontrado; sin embargo para el aceite de soya el resultado para todas las cepas no pudo ser cuantificado debido a que la cantidad de emulsión fue muy ínfima. Finalmente se determinó el efecto de la temperatura en la obtención de EPS en la cepa que produjo mayor cantidad de EPS, en este caso la cepa M3R1-A, con lo que se ensayó el crecimiento a 2 temperaturas: 30 y 42°C. Sin embargo, la cantidad de EPS extraídos de estas dos condiciones fueron menores a la cantidad de EPS con las condiciones iniciales, concluyendo así que la temperatura es un parámetro determinante en la producción de EPS y donde la temperatura óptima de dicha bacteria es de 37°C.

*Palabras clave:* exopolisacáridos, EPS, bacterias halófilas, medio MY



## ABSTRACT

This study aimed to determine the amount of exopolysaccharides (EPS) synthesized by native halophilic bacteria isolated from Laguna de Salinas in Arequipa and their emulsifying activity. Sampling of Laguna de Salinas (16°22'14.36" S 71°06'17.12" W) was performed where 9 samples were obtained. From these samples, bacteria was isolated in MY medium supplemented with 7,5% salts and 8 bacteria were selected whose colonies had a viscous or creamy aspect, desired characteristics to produce EPS. All bacteria were bacilli, three gram-positive and 5 gram-negative, they were named according to the sample from which they came. The extraction method of EPS was performed at each of the selected bacteria after 5 days incubation at 37°C in liquid MY medium supplemented with 7,5% salts and was as follows : the culture was centrifuged and from supernatant polysaccharides precipitated with three volumes of cold 96% alcohol overnight , then were centrifuged, redissolved in distilled water, centrifuged at high speed, dialyzed against distilled water and finally lyophilized . It was observed that were 3 strains M2R1\*B, M2R1-B and M3R1-A, which produced more EPS. The maximum value of EPS was 48,45 mg/100 mL (0,184 mg EPS/mg biomass ) for M3R1-A strain. The 8 strains were biochemically characterized, finding similarity with the genres *Halomonas*, *Bacillus* and *Salinivibrio*. Molecular characterization was also

performed with the 16s rRNA gene of two strains: gram-negative M2R1-B and gram-positive M3R1-A, these being of the genera *Halomonas sp.* and *Bacillus licheniformis*, respectively. For the EPS extracted we made a emulsification assay with two oily compounds, where the M2R-B strain gave a percentage of 29,9% for emulsification of liquid vaseline, the highest value found, but for soybean oil the result for all the strains could not be quantified due to the amount of emulsion was very minimal. Finally, the effect of temperature on the production of EPS was performed in the strain produced larger amount of EPS, in this case the M3R1-A strain with which the growth was tested at two temperatures: 30 and 42°C. However, the amount of EPS isolated from those two conditions were less than the amount of EPS with the initial conditions, thereby ending the temperature is a critical parameter in the production of EPS and where the optimum temperature for the bacterium is 37°C.

*Keywords:* exopolysaccharides, EPS, halophiles bacteria, medium MY



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la biotecnología en el mundo ha ido en crecimiento hasta en un 17% al año (1). El Perú se encuentra entre los países que menos invierten en I+D (Investigación y Desarrollo) en América Latina, aportando solo el 0,14% del PBI (RICYT, 2004). La inversión en biotecnología en el país es muy limitada en comparación con otros países de la región (2). Por lo tanto, el desarrollo de la biotecnología en nuestro país, no aprovecha totalmente la biodiversidad de los organismos vivos, dentro de estos se encuentran los microorganismos, sobre todo los extremófilos, los que pueden ser usados para la biorremediación o la producción de nuevos metabolitos de interés para la industria.

Un elemento importante para la innovación en biotecnología es la biodiversidad; donde la biotecnología microbiana es una herramienta importante, ya que ésta aprovecha la biodiversidad microbiana nativa para la producción de metabolitos de interés. El Perú tiene una ventaja comparativa por ser uno de los países del mundo con mayor biodiversidad, incluidos los ambientes hipersalinos. Sin embargo, se trata de una ventaja de tipo estático, que hasta ahora no ha sido del todo aprovechada. La aplicación de la biotecnología tiene un impacto directo sobre muchas de las actividades centrales del Perú (p. ej. agricultura, ganadería, piscicultura, explotación forestal, minería, industria alimenticia, farmacéutica) que se hará sentir, de forma positiva o negativa, tanto en materia productiva como en la integración del Perú en la economía mundial (3). Existe a su vez una demanda apremiante para la industria de recurrir a sustancias no-tóxicas, biodegradables y amigables con el medio ambiente, como por ejemplo los polisacáridos bacterianos.

Numerosas bacterias producen componentes extracelulares llamados exopolisacáridos, polisacáridos extracelulares o EPS. Estos términos son utilizados para describir aquellos polisacáridos localizados en el exterior de la superficie de las células microbianas. Su composición química y estructura puede ser muy variada por lo que son moléculas

versátiles con aplicaciones muy diversas en distintos campos biotecnológicos (4). Los EPS también son producidos extracelularmente por bacterias halófilas, teniendo aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y en procesos de biodegradación (5). Otras de las ventajas que le conceden los exopolisacáridos a las bacterias halófilas es la capacidad de captar metales pesados, su actividad viscozante y emulsificante, adicionalmente algunos exopolisacáridos pueden ser fuentes de oligosacáridos ricos en fucosa, presentando potenciales aplicaciones en cosmética y medicina (6).

Para aprovechar la biodiversidad en nuestro país, el presente trabajo de investigación tiene por finalidad la búsqueda de bacterias halófilas nativas que produzcan exopolisacáridos con actividad emulsificante, cuyo potencial biotecnológico no ha sido totalmente estudiado en nuestro país, determinado así la cepa bacteriana que tenga una mejor producción de EPS y actividad emulsificante.





## HIPÓTESIS

Debido a que se ha reportado que las bacterias halófilas, que habitan en condiciones extremas, en otras partes del mundo producen exopolisacáridos, es posible aislar bacterias halófilas nativas de la Laguna de Salinas de Arequipa con capacidad productora de exopolisacáridos para su respectivo estudio.



## OBJETIVOS

### General:

Obtener exopolisacáridos (EPS) con actividad emulsificante de bacterias halófilas aisladas de la Laguna de Salinas Aguada Blanca, Arequipa

### Específicos

- Aislar y caracterizar morfológicamente bacterias halófilas nativas a partir de muestras recolectadas de la Laguna de Salinas, capaces de producir exopolisacáridos.
- Extraer el exopolisacárido secretado de cada una de las bacterias y comparar la cantidad de EPS extraído.
- Caracterizar bioquímica y molecularmente las bacterias halófilas nativas aisladas.
- Determinar la capacidad emulsificante de los exopolisacáridos extraídos.
- Determinar el efecto de la temperatura en la obtención de exopolisacáridos de la bacteria halófila nativa con mayor producción de exopolisacárido.

## VARIABLES DE ESTUDIO

### Variables Independientes

Variable	Abreviatura	Indicador
Temperatura	T°	30, 37, 42
Muestras de Agua	M, R	M1R1, M1R2, M1R3, M2R1, M2R2, M2R3, M3R1, M3R2, M3R3

### Variables Dependientes

Variable	Abreviatura	Indicador
Cepas bacterianas	-	M1R3-B, M2R1*A, M2R1*B, M2R1-B, M3R1- A, M3R1*A, M3R2, M3R2*A
Exopolisacáridos	196 EPS	mg/100mL

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Ambientes hipersalinos

Aunque los océanos son, de lejos, el mayor cuerpo de agua salina, los ambientes hipersalinos se definen generalmente como los que contienen concentraciones de sal en exceso a la del agua de mar (3,5% sales disueltas totales). Muchos ambientes hipersalinos tienen un origen marino si tienen una composición salina muy parecida a la del agua de mar y se llaman Talasosalinos, un ejemplo típico son las salinas solares, utilizados para la evaporación natural del agua de mar para la producción de sal. Una gran diversidad de vida microbiana se observa en la salinidad marina hasta aproximadamente 3-3,5M NaCl, momento en el que sólo unos pocos halófilos extremos pueden crecer, por ejemplo, *Halobacterium*, *Dunaliella*, y algunas especies de bacterias. En cambio las aguas Atalasalinas son aquellas cuya concentración salina no se asemeja a la del agua de mar, y están formadas por disoluciones de depósitos minerales de origen continental, por lo que la composición de estas aguas es muy variable, por ejemplo, algunas tienen una alta concentración de sales de magnesio y de potasio. Dentro de estas se encuentran los lagos salados naturales, como por ejemplo la Laguna de Salinas en Arequipa, donde la composición iónica de estas aguas puede variar en función de las características topográficas, geológicas o climatológicas a las que estén sometidas (7) (8).

Muchas piscinas hipersalinas más pequeñas representan ambientes muy dinámicos, que experimentan variaciones estacionales significativas en el tamaño, la salinidad y la temperatura. Además de lagos hipersalinos naturales, numerosas salinas solares artificiales se han construido para la producción de sales marinas. Estos por lo general consisten en una serie de estanques de evaporación superficial conectados por tuberías y canales. Como se produce la evaporación, salmuera se dirige en los estanques con

salinidades progresivamente mayores hasta que se produce la precipitación secuencial de carbonato de calcio, sulfato de calcio (yeso) y NaCl (halita) (7).

### 2.1.1. Laguna de Salinas

Es un salar del Perú de aguas someras, que se localiza en el departamento de Arequipa, dentro de los límites de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca. Se encuentra en una depresión que forma la parte final de una cuenca endorreica ( $16^{\circ}22'14.36''$  S  $71^{\circ}06'17.12''$  O), posee como máximo una extensión de unas 6 182 hectáreas, si bien su área disminuye durante la estación seca, hasta quedar reducido a una costra de sal. Se eleva a una altura de 4 300 m sobre el nivel del mar. El salar está rodeado de bofedales que son alimentados por agua de lluvia y deshielos.



**Figura 1.** Laguna de Salinas en la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca.

La laguna de Salinas está conformada por varias capas de sal que varían en espesor de centímetros a metros; la costra de la superficie tiene un gran grosor y la cantidad de sal que existe en la laguna es estimada en toneladas. Esta salmuera se compone de grandes cantidades de boro, cloro, magnesio, sulfatos de sodio, potasio, estroncio y litio. Este

cuerpo de agua ha variado según las distintas fases lacustres, alcanzando salinidad de hasta 40 g/L. Al evaporarse toda el agua se forman los salares (9).

## **2.2. 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” (10).

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 (11).

Los halófilos se encuentran distribuidos por todo el mundo en ambientes hipersalinos, muchos en salmueras hipersalinas naturales en zonas áridas, costeras, e incluso aguas profundas, así como en salinas artificiales utilizados para extraer las sales del mar. Sus características innovadoras y la capacidad para el cultivo a gran escala hacen halófilos potencialmente valiosos para la biotecnología.

En comparación con otros grupos de extremófilos, y especialmente los procariotas termófilos y alcalófilos que se utilizan ampliamente para la producción de enzimas valiosas, los microorganismos halófilos extremos y moderados son en cierta medida un grupo descuidado cuando se considera el número de sus aplicaciones biotecnológicas (7).

### **2.2.1. Clasificación de los microorganismos halófilos según sus requerimientos Salinos**

Aunque las sales se requieren para todas las formas de vida, los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento. Kushner y Kamekura (12), proponen las siguientes categorías de microorganismos de acuerdo a sus requerimientos de NaCl descritas en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Clasificación de halófilos en función de la salinidad<sup>1</sup>

	Concentración de NaCl	
	Molaridad, M	Porcentaje, %
<b>Halófilos ligeros o débiles</b>	0,2 – 0,5	1-3
<b>Halófilos moderados</b>	0,5 – 2,4	3-15
<b>Halófilos extremos</b>	2,5 – 5,2	15-32

<sup>1</sup> Kushner y Kamekura (12)

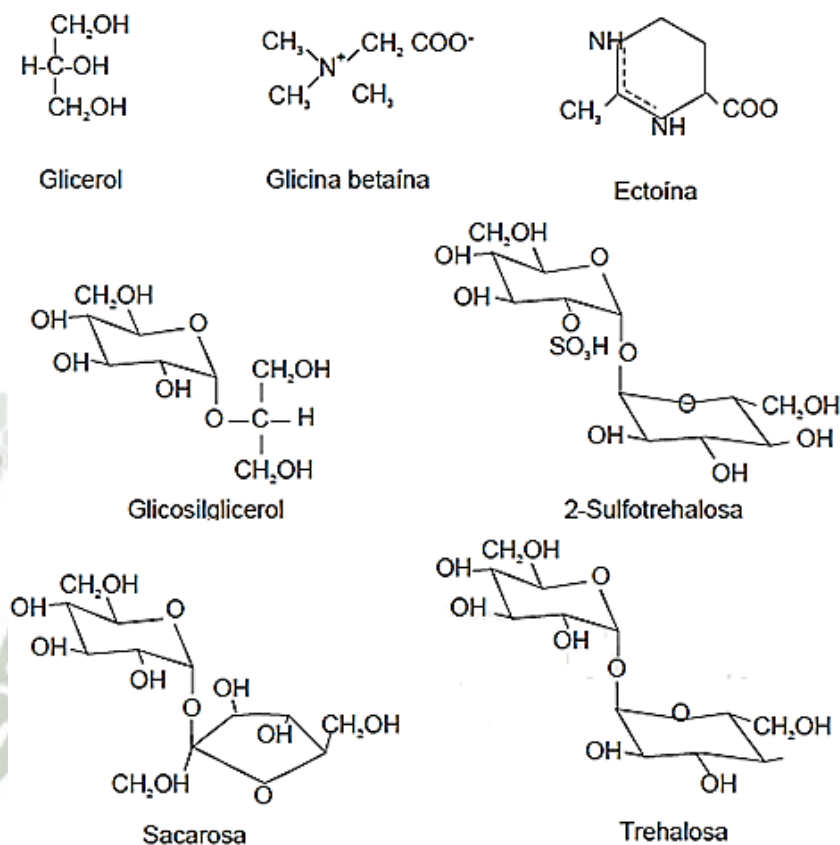
En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0,2 M (1%) de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (13).

### 2.2.2. Adaptación de los microorganismos a los ambientes salinos

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos.

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación. El primero de ellos, denominado mecanismo '*salt-in*' es típico de Arqueas y Haloanaerobiales (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma

iones inorgánicos, principalmente  $K^+$  y  $Cl^-$ . El aumento en la concentración de  $KCl$  en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas (14).



**Figura 2.** Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y haloterantes. (González-Hernández & Peña) (13)

El segundo mecanismo conocido como ‘*salt-out*’, es el que utilizan las bacterias tanto halófilas como no halófilas, además de las arqueas metanógenas halófilas moderadas. Estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan ‘solutos compatibles’. Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su

transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede al cultivar las bacterias en un medio mínimo (15). Los principales solutos compatibles descritos a la fecha son: aminoácidos, azúcares, glicina, betaina, ectoína e hidroxiectoína (Figura 2).

### 2.2.3. Bacterias halófilas

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 (14). Dichas bacterias pueden ser clasificadas según su resistencia a la sal como se explica a continuación.

#### 2.2.3.1. Bacterias halófilas extremas

Estos halófilos extremos, más conocidos como Halobacterias, al crecer forman floraciones densas (hasta  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), y que resulta en el color rojo de muchas salmueras. Las especies comunes de halobacterias son bacilos o cocos en forma de disco, aunque existen especies de forma cuadrada e incluso triangulares. Muchos son pleomórficos, sobre todo cuando se alteran las condiciones iónicas de los medios de comunicación. Estas se clasifican como archaea (llamados también arqueas halófilas o haloarchaea) y pertenecen a la familia Halobacteriaceae. Diez géneros han sido reportados: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natrialba* y *Natromonas* y un undécimo género, *Haloterrigena*, se ha propuesto recientemente (7).

#### 2.2.3.2. Bacterias halófilas moderadas

Se han descrito muchas bacterias heterótrofas moderadamente halófilas, Gram-negativas, aerobios o anaerobios facultativos, que pertenecen a géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*. Otros géneros con representantes halófilas incluyen *Salinovibrio*, *Arhodomonas*, *Dichotomicrobium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Acinetobacter* y *Spirochaeta* (7). Estas suelen ser mucho más frecuentes en los ambientes hipersalinos.



Tres organismos se han utilizado ampliamente en estudios fisiológicos y bioquímicos que se ocupan de los mecanismos de haloadaptation y adaptabilidad: *Salinivibrio costicola*, *Halomonas elongata*, y *Halomonas israelensis* (16). Otros incluyen *H. eurihalina*, aislado de suelos salinos, que produce un polisacárido extracelular (EPS); y *H. halodurans*, de las aguas de estuario, que es capaz de degradar compuestos aromáticos.

En relación a los microorganismos aerobios, hay bacterias halófilas moderadas que se encuadran en géneros que agrupan únicamente especies halófilas moderadas, aunque la mayoría de especies forman parte de géneros que incluyen también halófilas débiles y en algunos casos bacterias no halófilas (16).

Por otro lado, en las bacterias gram positivas se incluye especies moderadamente halófilas de los géneros *Halobacillus*, *Bacillus*, *Marinococcus*, *Salinococcus*, *Nesterenkonia* y *Tetragenococcus*. Ellos incluyen, a su vez, cocos tales como *Nesterenkonia halobia*, aislado a partir de salinas, que producen pigmentos carotenoides de color amarillo-rojo (7).

#### 2.2.3.3. Bacterias halófilas débiles

Se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes marinos, denominándose generalmente bacterias marinas. Desde el punto de vista taxonómico, se distinguen géneros de bacterias anaerobias facultativas fermentadoras como *Vibrio*, *Photobacterium*, *Moritella* y *Colwellia*, no fermentadoras o débilmente fermentadoras como *Shewanella* y *Ferrimonas*; y anaerobios estrictos, distribuidos en géneros que incluyen microorganismos halófilos y halotolerantes como *Alcanivorax*, *Alteromonas*, *Cycloclasticus*, *Fundibacter*, *Gelidibacter*, *Glaciecola*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Marinospirillum*, *Neptunomonas*, *Oceanospirillum*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* y *Thalassomonas* (7).

Según la concentración salina de la Laguna de Salinas reportada por el INRENA (9) las bacterias que pueden ser encontradas dentro de este ecosistema se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Microorganismos en la Laguna de Salinas**

<b>Bacterias Halófilas moderadas</b>	
<b>Posibles microorganismos en la Laguna de Salinas</b>	<i>Halomonas, Delega, Volcaniella, Flovobacterium, Paracoccus, Pseudomonas, Halovibrio, Chromobacterium, Alteromonas, Halobacillus, Bacillus, Marinococcus,</i>

### 2.3. Exopolisacáridos microbianos

Las células bacterianas están a menudo rodeadas por una capa de polisacáridos, la cual constituye la interfaz con el medio ambiente y a su vez contribuyen a su forma y rigidez. Los exopolisacáridos (EPS) bacterianos se clasifican en dos tipos diferentes: los polisacáridos capsulares (CPS), que se definen como polímeros con enlaces covalentes a la superficie de la célula a través de un fosfolípido, y los polisacáridos mucilaginosos, que parecen ser liberados en la superficie celular sin unión a la célula y que a menudo se desprenden para formar una especie de ‘baba’ o una matriz amorfa (17) (18). Normalmente el CPS se produce principalmente durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano, mientras que el EPS mucilaginoso es producido durante la fase estacionaria (19).

#### 2.3.1. Definición

Los exopolisacáridos microbianos son polímeros biosintéticos (biopolímeros) y se definen como polisacáridos extracelulares de origen biológico que participan en la formación de agregados microbianos. La abreviatura de EPS se ha utilizado para "polisacáridos extracelulares", "exopolisacáridos", "exopolímeros" y "sustancias poliméricas extracelulares" (20).

Los EPS, muestran una gran diversidad en su composición y estructura. Algunos de estos polímeros pueden llevar una gran similitud química con los componentes de la pared celular, pero la mayoría son estructuras químicas diferentes sin relación alguna con los constituyentes celulares, por lo que los demás componentes de la superficie celular no se alteran si los EPS están ausentes. Sin embargo, forman estructuras que pueden ser reconocidos ya sea por microscopía óptica o electrónica (21).

La mayoría de los polímeros son lineales en general y de diferentes longitudes, generalmente con un peso molecular comprendido entre de  $1 \times 10^4$  hasta  $3 \times 10^5$  daltons (22) (23).

La presencia de EPS asociados con las células microbianas cultivadas en superficies sólidas con frecuencia es reconocible a partir de la morfología de las colonias con superficie mucosa o acuosa que tiene aspecto brillante y viscoso en la placa de agar (23). Esto puede estar relacionado, en algunas cepas bacterianas, de aspecto inusual (Figura 3).

En medio líquido, los cultivos productoras de EPS pueden llegar a ser muy viscosas o, excepcionalmente, pueden solidificarse en forma de gel. El EPS se puede observar como limo suelto secretado por los microorganismos, pero no está unido directamente a la célula. En las superficies sólidas expuestas a ambientes acuosos, ya sea dentro del cuerpo humano o animal, en agua dulce o en los océanos, el crecimiento bacteriano se ve como biopelículas, en el que las células microbianas están asociadas con grandes cantidades de EPS. Los cambios en las condiciones de crecimiento pueden alterar drásticamente la composición, propiedades físicas y la organización de los polisacáridos en la superficie bacteriana (21).

El crecimiento de bacterias es a menudo acompañado por la producción de exopolisacáridos (EPS), que tienen funciones ecológicas y fisiológicas importantes (24). Los EPS han sido aislados de diferentes géneros de archaea, bacterias, hongos y algas pertenecientes principalmente a grupos mesófilas, termófilas y halófilas (23).



**Figura 3.** Aspecto de las colonias de *Halomonas maura* B100 tras 48 horas de la siembra en medio MY sólido al 7,5% (p/v) de sales (Mata-Gómez) (6)

### 2.3.2. Papel Fisiológico

Se puede formar una capa protectora para las células contra la dura condición ambiental externa, y también sirven como reservas de carbono y energía durante la inanición. Se ha demostrado que los EPS desempeñan una amplia variedad de funciones biológicas, incluyendo la prevención de la desecación, la protección contra las tensiones ambientales, como la protección contra las toxinas y antibióticos, la adhesión a superficies, patogénesis y la simbiosis. Los EPS pueden secuestrar los materiales nutrientes del ambiente circundante, proporcionando una estrategia general para la supervivencia microbiana en condiciones oligotróficas (25).

Los EPS también tienen el potencial de prevenir físicamente el acceso de ciertos agentes antimicrobianos, actuando como un intercambiador de iones, no mediante la restricción de la difusión de los compuestos en la biopelícula. Durante el proceso de colonización en una superficie en particular, una bacteria produce en exceso sustancias poliméricas extracelulares que ayudan en la formación de biopelículas. Estos polímeros, especialmente EPS son los materiales que construyen la matriz de una biopelícula, que sirve como un elemento funcional de usos múltiples para la adhesión, la inmovilización de las células sobre la superficie colonizada, la protección, el reconocimiento y facilitar la disposición espacial de las diferentes especies dentro de la biopelícula (23) (26).

Nichols y col. (27) y Junge y col. (28) sugieren funciones que incluyen la crioprotección para el crecimiento a bajas temperaturas y alta salinidad, con referencia a la comunidad microbiana del hielo marino y las bacterias de otros ambientes marinos (Antártida y los lagos de soda, entre otros).

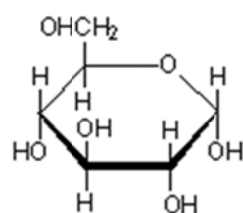
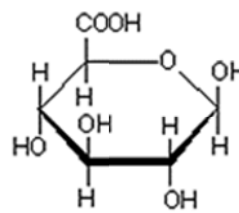
### 2.3.3. Composición

Los EPS se componen principalmente de hidratos de carbono, pero además de los diversos azúcares, pueden existir sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Los carbohidratos que se encuentran en los EPS microbianos son muy diversos. D-glucosa, D-galactosa y D-manosa son los monómeros más comunes en muchos EPS. Las 6-deoxihexosas (azúcares neutros) como L-fucosa y L-ramnosa, también se presentan con frecuencia (29).

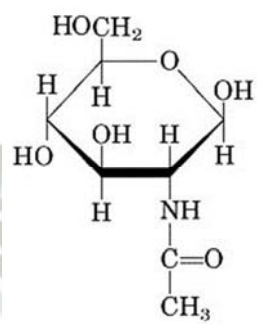
Muchos o quizás incluso más exopolisacáridos microbianos son polianiónicos en la naturaleza. Esto resulta de la presencia en muchos de ellos de los ácidos urónicos, como el ácido D-glucurónico que es el más común. Aunque la mayoría de los polisacáridos contienen sólo un único ácido urónico, ácido D-manurónico esta por lo general presente en alginatos bacterianos junto con ácido L-glucurónico (21).

Además de los monosacáridos más comunes, algunos polisacáridos pueden contener uno o más azúcares raros. También hay varios aminoazúcares (azúcares N-acetilamino), que todavía no se han encontrado en polisacáridos microbianos de importancia industrial. Los aminoazúcares más comunes son N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina. Inevitablemente, a medida que se examina una gama más amplia de fuentes microbianas de exopolisacáridos, se descubrirán nuevos monosacáridos (21). Las estructuras de los azúcares mencionados se muestran en la Figura 4.

Dada la diversidad de componentes de azúcar, existe una amplia gama de posibles estructuras moleculares. Las propiedades de los EPS bacterianas están determinados por su composición química, estructura molecular, peso molecular promedio, y su distribución (29).

 $\alpha$  - D-glucosa

Ácido D-glucurónico



N-acetilglucosamina

**Figura 4.** Estructura de los azúcares que conforman un EPS (Murray) (30)

Dentro de los constituyentes orgánicos se encuentran las proteínas, las cuales pueden estar glicosiladas con oligosacáridos para formar glicoproteínas o puede estar sustituido con ácidos grasos formando lipoproteínas (20).

Por otro lado unos de los sustituyentes inorgánicos son los grupos fosfato y el grupo sulfato. Los exopolisacáridos sulfatados son poco frecuentes entre los exopolisacáridos de origen microbiano (5). La composición general esta descrita en la Tabla 3.

### 2.1.1. Estructura

Las causas de la enorme variedad de exopolisacáridos son la diversidad de las unidades básicas que los constituyen, la cantidad en que están presentes y los distintos tipos de enlaces que determinan la configuración final (6).

**Tabla 3.** Composición general de los EPS bacterianos<sup>1</sup>

<b>EPS</b>	<b>Componentes Principales (subunidades, precursores)</b>	<b>Tipos de enlaces entre las subunidades</b>	<b>Estructura de la cadena principal del polímero</b>
<b>Polisacáridos</b>	Monosacáridos Ácidos Urónicos Amino-azucares	Enlaces glicosílicos	Linear, ramificado
<b>Sustituyentes Orgánicos</b>	Ácidos orgánicos: Acetatos Gliceratos Hidroxibutanoato Propionato Piruvato Succinato	Ester Ester Ester Ester Cetal Ester	-
<b>Sustituyentes inorgánicos</b>	Fosfatos Sulfatos	-	-
<b>Proteínas (polipéptidos)</b>	Aminoácidos: L-glutamato Serina	Enlace peptídicos	Linear
<b>Ácidos nucleicos</b>	Nucleótidos	Enlaces fosfodiéster	Linear
<b>(Fosfo)Lípidos</b>	Ácidos grasos Glicerol	Ester	Cadenas laterales

<sup>1</sup> Sutherland (21); Wingender (20)

Al igual que con todos los polisacáridos, los productos microbianos se pueden dividir en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. La mayoría de los primeros son glucanos neutros, mientras que la mayoría de heteropolisacáridos parecen ser polianiónicos (21).

#### 2.1.1.1. Homopolisacáridos

Muchos exopolisacáridos microbianos de potencial industrial importante, son homopolímeros. Estos incluyen un número de glucanos, que, debido a sus diferentes estructuras, poseen propiedades significativamente diferentes a pesar de que el único

componente monosacárido es D-glucosa. Aunque la mayoría de homopolisacáridos se componen de azúcares neutros, un pequeño número son polianiónicos (21).

Se encontraron tres tipos de estructura homopolisacárido. Varios de ellos son moléculas neutras lineales compuestos por un solo tipo de enlace. Un tipo de estructuras un poco más compleja se basa en el enlace  $\beta$ -D-glucano, donde se encuentran productos como la Celulosa (microcristalina e insoluble) y el Curdlano (producto de varias especies bacterianas y forma geles), ambos con un único tipo de enlace. También se encuentra el escleroglucano, que posee dos tipos de enlace, por la cual posee unidades de tetrasacáridos repetidas, debido a las cadenas laterales de 1,6- $\alpha$ -D-glucosilo. Por último, las estructuras de homopolisacárido ramificados se encuentran en dextranos, que es más complejo y contiene tres tipos diferentes de vinculación, incluyendo el  $\alpha$ -D-glucano (21).

#### 2.1.1.2.Heteropolisacáridos

La mayoría de los polisacáridos microbianos son probablemente heteropolisacáridos, los cuales están casi todos compuestos de unidades repetitivas que varían en tamaño desde disacáridos a octasacáridos. La posible gama de estructuras y las diferencias resultantes en las propiedades es realmente muy grande debido al número de posibles enlaces y configuraciones. En las unidades repetidas, cada hexosa puede tener el enlace  $\alpha$  o  $\beta$ ; en forma de piranosa o furanosa, y unido a través de la posición 2, 3, 4 o 6. También es probable que la mayoría de los polímeros con potencial industrial contengan ciertos tipos de enlace, por lo menos en la cadena principal, ya que estos conferirán las propiedades físicas deseadas (21).

Con frecuencia, estos heteropolímeros contienen un mol de un ácido urónico, que es por lo general ácido D-glucurónico. Existen varios tipos de heteropolímeros desarrollados y se pueden observar en la Tabla 4.



**Tabla 4.** Heteropolisacáridos más conocidos

<b>EPS</b>	<b>Microorganismo</b>
<b>Alginatos bacterianos<sup>1</sup></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>A. Chroococcum</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>
<b>Emulsano y polisacáridos relacionados<sup>2</sup></b>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Cepa RAG-1 Cepa BD413 Cepa BD4
<b>Succinoglicano<sup>1</sup></b>	Cepas <i>Rhizobium</i>
<b>XM6<sup>1</sup></b>	Cepa de <i>Enterobacter</i>
<b>Xantano<sup>1</sup></b>	<i>Xantomonas campestris</i>
<b>Gelano y polímeros relacionados<sup>1</sup></b>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (antes <i>Pseudomonas elodea</i> )
<b>EPS V2-7<sup>3</sup></b>	Cepas F2-7 de <i>Halomonas eurihalina</i>
<b>Maurano<sup>4</sup></b>	<i>Halomonas maura</i>
<b>Polisacáridos capsulares<sup>2</sup></b>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<b>Polisacárido de Lactococcus<sup>2</sup></b>	<i>Lactococcus lactis subs. cremoris</i> B891
<b>Polisacáridos de Pseudomonas<sup>2</sup></b>	Diferentes especies de <i>Pseudomonas</i>
<b>Alasano<sup>2</sup></b>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53
<b>Polisacárido WN9<sup>2</sup></b>	<i>Paenicacillus sp.</i>
<b>Jamilano<sup>2</sup></b>	<i>Paenicacillus jamilae</i>
<b>Polisacáridos por Aerobasidium<sup>2</sup></b>	<i>Aerobasidium pullulans</i>
<b>Polisacáridos por Lactobacillus<sup>2</sup></b>	<i>Lactobacillus plantarum EP56</i>

<sup>1</sup> Sutherland (21) <sup>2</sup> Mata-Gómez (6) <sup>3</sup> Béjar y col. (24) <sup>4</sup> Aria y col. (31)

Actualmente han sido comercializados algunos exopolisacáridos microbianos con aplicación en múltiples sectores industriales. Estos productos incluyen la celulosa bacteriana, el curdlano, el gelano y el xantano, entre otros. De entre estos EPS producidos a nivel industrial, la legislación únicamente ha aprobado para su uso alimentario en Europa y EE. UU. al xantano y gelano; mientras que el curdlano solo se encuentra aceptado como aditivo alimentario en Japón (6).

Dadas sus interesantes propiedades, el xantano sigue siendo considerado como el polímero de referencia para el amplio grupo de EPS microbianos existentes y de nueva aparición. En 1969 fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y en 1980 recibió su aprobación por la Unión Europea, a la vez que se le asignó el número E-415 (6).

### **2.1.1. Producción de EPS**

La cantidad de exopolisacáridos producidos varía con la especie de bacteria. Sin embargo, los factores fisicoquímicos juegan un papel crucial en el rendimiento de estos compuestos, y estos incluyen pH, temperatura, tiempo de incubación (condiciones de laboratorio), y la composición del medio (fuentes de carbono, nitrógeno y cationes) (26).

La composición de EPS y las propiedades químicas y físicas de estos biopolímeros puede variar en gran medida, pero en general es independiente del sustrato de carbono. La captación de sustrato es una de las primeras limitaciones sobre la producción de EPS y la presencia de un sustrato de hidrato de carbono tal como la glucosa resulta en un rendimiento óptimo de EPS (22).

Según Nichols y col. (22) la producción de EPS de algunas bacterias marinas aisladas en cultivos de laboratorio, pueden ser mejoradas en respuesta a factores físicos tales como estrés osmótico y temperatura. Así también al cultivar una cepa de *Pseudomona* NCIB 11264, observaron que el rendimiento de su EPS fue mayor a temperaturas subóptimas, en proporciones altas de carbono y nitrógeno y durante la fase estacionaria.

Muchos arqueas halófilas se describieron como productores de EPS, tales como *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus*, y *Halobacterium*. Los productores más comunes de EPS halófilos son las bacterias que pertenecen al género *Halomonas*, entre ellas las más importantes: *H. maura*, *H. eurihalina*, *H. ventosae*, y *H. anticariensis*. Los EPS sintetizados por cepas *Halomonas* inusualmente constan de alto contenido de sulfato y una cantidad significativa de ácidos urónicos que determinan sus buenas propiedades gelificantes (23).

### 2.1.2. Extracción y Purificación de EPS

La recuperación de polisacáridos microbianos extracelulares del caldo de cultivo se logra comúnmente por procedimientos que implican:

- i. La eliminación de células, que generalmente se logra mediante centrifugación o filtración.
- ii. La precipitación de polímero a partir del sobrenadante libre de células mediante la adición de un agente de precipitación que consiste de un solvente polar orgánico miscible en agua en la que el polímero es insoluble (por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol o acetona).
- iii. El secado del polímero precipitado, a saber, mediante liofilización o freeze drying (escala de laboratorio) o secado en tambor (escala industrial).

En muchos procedimientos, el caldo se somete a tratamiento de calor (hasta el 90-95 °C) al final del proceso de fermentación, antes de la eliminación de células. Este paso de calentamiento tiene por objeto eliminar las células bacterianas y la inactivación de las enzimas que podrían causar la degradación del polímero en los pasos posteriores. Por otra parte, también se reduce suavemente la viscosidad de caldo. El retiro de la célula se ve facilitada por dilución del caldo de cultivo mediante la adición de agua desionizada antes de la centrifugación/filtración. Sin embargo, este enfoque aumenta los costos de operación, porque se generan volúmenes considerablemente más altos de sobrenadante libre de células, y por lo tanto, se requieren mayores volúmenes de agente precipitante.

Hay una gran variedad de compuestos de peso molecular bajo, co-producidos o añadidos durante los procesos de producción, que terminan como impurezas en el producto final (por ejemplo, restos de células, sales y proteínas). Para obtener un polisacárido de alto grado de pureza, el polímero se somete adicionalmente a uno o varios de los siguientes procesos: reprecipitación del polímero de la solución acuosa diluida ( $<1,0$  g/L); desproteinización química (por ejemplo, desplazamiento salino o precipitación de proteínas con ácido tricloroacético) o métodos enzimáticos (por ejemplo, proteasas), y los procesos de membrana (por ejemplo, ultrafiltración, diafiltración, diálisis). Algunos de estos procedimientos de purificación pueden disminuir la recuperación de producto o de tener un impacto negativo en las propiedades del polímero, a saber, cuando la eliminación de proteínas se lleva a cabo con la adición de productos químicos que podrían reaccionar con los componentes de EPS.

Por lo tanto, la elección del procedimiento más adecuado debe hacerse cuidadosamente como un compromiso entre la recuperación del producto, la pureza del producto, y su impacto en las propiedades del polímero (21) (29).

### **2.1.3. Aplicaciones de los EPS bacterianos**

Hay una gran cantidad de interés en los EPS producidos por los microorganismos utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, petrolera, biomédica, en biorremediación, tratamiento de aguas residuales, campos de biolixiviación y la eliminación de metales en el tratamiento de residuos mineros e industriales debido a su amplia química, la diversidad estructural, sus características físicas y otras únicas propiedades (25) (32).

Los EPS pueden funcionar como agentes viscosificantes, estabilizantes, emulsionantes, gelificantes, o fijadores de agua en los alimentos, así también tienen propiedades reológicas únicas debido a su capacidad de formar soluciones muy viscosas a bajas concentraciones (23).

Los tensioactivos y emulsionantes de fuentes bacterianas crean una atención debido a su biodegradabilidad y la posible producción a partir de recursos renovables. Los emulsionantes se caracterizan por presentar en su estructura una parte hidrofílica (aminoácidos, péptidos, cadena polisacáridica, cationes mono o divalentes) y una parte no polar hidrofóbica constituida por ácidos grasos saturados o insaturados. Los EPS pueden deber su actividad emulgente a su capacidad viscosizante o a una simple asociación de una fracción proteica al polímero (6).

Las biopelículas formadas por EPS mediadas para biorremediación se han encontrado como una alternativa más eficaz y más segura para la remediación con bacterias planctónicas, tienen mayores posibilidades de adaptación a diferentes condiciones ambientales y su posterior supervivencia. Las biopelículas mantienen las concentraciones de soluto localizadas a óptimas condiciones fisiológicas, químicas y de potencial redox (23).

A su vez, el papel potencial de los EPS en la eliminación de metales pesados del medio ambiente es debido a su participación en la floculación y la capacidad de unirse a iones metálicos a partir de soluciones. La unión de los metales con los EPS se establece mediante interacciones electrostáticas con grupos funcionales con carga negativa, para lo cual los principales responsables de estas interacciones son los grupos carboxilo de los ácidos urónicos presentes en el EPS (6).

## **2.2.Perspectivas futuras**

La producción de nuevos biopolímeros, naturales y biodegradables en los últimos años es creciente debido a la mayoría de sus aplicaciones y la demanda industrial; y se proyecta a un mayor crecimiento en el futuro. Con esta investigación se pretende, en un futuro, la producción bacteriana industrial de EPS de bacterias halófilas nativas con propiedades interesantes para diversas industrias; si es posible con uso de sustratos de bajo coste y la mejora de los procesos de *down stream* para hacerlo más sostenible.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.MATERIALES

##### 3.1.1. Lugar de Ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa

##### 3.1.2. Material Biológico

- Muestras de agua de la Laguna de Salinas

##### 3.1.3. Material de vidrio

- Bagueta
- Beaker 500 mL
- Cubreobjetos
- Fiola 5 mL, 250 mL
- Frascos de Vidrio 15 mL, 250 mL
- Frascos de Vidrio de boca ancha 500 mL
- Láminas Portaobjetos
- Matraces 250 mL, 500 mL
- Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Placas Petri 90x15 mm
- Probetas 100 mL, 250 mL
- Tubos de ensayo 13x100 mm, 16x150 mm, 20x150 mm
- Tubos de Ensayo con tapa rosca 16x150 mm

##### 3.1.4. Reactivos

- Aceite de Inmersión PANREAC

- Aceite de Soya IDEAL
- Agar Manitol Salado DIFCO
- Agar SIM DIFCO
- Agar TSI DIFCO
- Agar-agar DIFCO
- Almidón soluble G. COLEMAN Q.P.
- Base para Agar Sangre DIFCO
- Bicarbonato de Sodio FERMONT Q.P.
- Bromuro de Sodio J. T. BAKER Q.P.
- Caldo Nitrato DIFCO
- Caldo Tioglicolato DIFCO
- Cloruro de Calcio Hexa Hidratado SIGMA – ALDRICH Q.P.
- Cloruro de Hierro III Hexa Hidratado CARLO ERBA Q.P.
- Cloruro de Magnesio Hexa Hidratado J. T. BAKER Q.P.
- Cloruro de potasio FERMONT Q.P.
- Cloruro de Sodio J. T. BAKER Q.P.
- Etanol 96% DIPROQUIM
- Extracto de Carne OXOID
- Extracto de levadura DIFCO
- Gelatina HIMEDIA LAB
- Glucosa anhidra LOBA CHEMIE Q.P.
- Peptona bacteriológica DIFCO
- Reactivo de Kovacs LABSAR
- Sulfato de Magnesio Hepta Hidratado J. T. BAKER Q.P.
- Tinción de Gram
- Tritón X-100 SIGMA ALDRICH Q.P.
- Twen80 SIGMA ALDRICH P.A.
- Vaselina líquida LOBA CHEMIE Q.P.

### 3.1.5. Equipos

- Agitador orbital P. SELECTA ROTATERM
- Autoclave FRAVILL AV-30
- Balanza analítica electrónica OHAUS AR 2140
- Baño María PASSED LONDON
- Centrifuga HETTICH EBA-20
- Centrifuga refrigerada HETTICH MIKRO 200R
- Cocina eléctrica
- Estufa P.SELECTA CONTERM
- Incubadora P. SELECTA
- Liofilizador LABCONCO
- Micropipetas 20 uL, 200 uL, 1000 uL LEPPENDORF
- Microscopio binocular CARL ZEISS PRIMOSTAR
- Multiparámetro HANNA HI9828
- Refrigeradora BOSCH
- Vórtex GENIE 2

### 3.1.6. Otros

- Algodón
- Asa de siembra
- Barbijo
- Cooler
- Gasa
- Gradilla
- Guantes
- Membranas de diálisis de tamaño de poro 12-14 000 daltons
- Papel aluminio
- Papel craft



- Parafilm
- Tubos de plástico para centrifuga
- Tubos eppendorf 1,5 mL, 2 mL,

### 3.2.MÉTODOS.

#### 3.2.1. Recolección de muestras

La toma de muestras se realizó en la parte suroeste de la Laguna de Salinas en la Reserva de Salinas y Aguada Blanca, debido a su accesibilidad, en tres lugares diferentes (Anexo 1) de forma estratificada vertical en 3 diferentes zonas: superficie, intermedio (aprox. a 20 cm de profundidad) y profundidad (en el fondo de la laguna aprox. 40 cm de profundidad). Se utilizaron frascos de vidrio de boca ancha previamente esterilizados con capacidad de 500 mL para cada muestra. Las muestras fueron transportadas en un cooler para mantener la temperatura y se mantuvieron refrigerados hasta su utilización en el laboratorio. Para la determinación de la ubicación de cada zona de muestreo se utilizó el Sistema de Posicionamiento Satelital (GPS).

Las muestras obtenidas fueron codificadas de la siguiente manera de acuerdo a la localización y su profundidad. La codificación de las muestras se presenta en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Codificación de las muestras recolectadas

Zona de muestreo <sup>1</sup>	Superficial	Intermedio	Profunda
M1	R1	R2	R3
M2	R1	R2	R3
M3	R1	R2	R3

<sup>1</sup> Anexo 1

A cada muestra se le midió la salinidad usando el multiparámetro, para contrastar dicho parámetro con el reportado teóricamente. Se mostró el promedio de todas las muestras.

### 3.2.2. Aislamiento de bacterias halófilas nativas de la Laguna de Salinas

Se seleccionó el medio de cultivo MY propuesto por Moraine y Rogovin (33) para el aislamiento de las bacterias halófilas de las muestras tomadas, el cual fue modificado y cuya composición se observa en la Tabla 6. La modificación en el medio fue la cantidad de extracto de malta, que fue reemplazado aumentando la cantidad de extracto de levadura, esto debido a que el extracto de levadura es un factor de crecimiento importante en un cultivo bacteriano y proporciona vitaminas, péptidos y carbohidratos, además que el extracto de malta es más usado para el cultivo de hongos y levaduras (34). Dicho medio fue suplementado con una solución de sales cuya composición esta descrita en la Tabla 7 (35). Asimismo, el medio de cultivo fue esterilizado en un autoclave a 121°C y 1,5 Bar por 15 minutos.

**Tabla 6.** Composición del medio MY<sup>1</sup> suplementado al 7,5% de sales.

Glucosa anhidra	10 g
Peptona bacteriológica	5 g
Extracto de Levadura	6 g
Agar-Agar	20 g
Solución de Sales 30%	250 mL
Agua destilada	750 mL
pH: se ajusta a 7,5 con 3M NaOH o HCl concentrado	

<sup>1</sup> Moraine y Rogovin (33)

El aislamiento de las bacterias se realizó de la siguiente manera: se tomó 1 mL de cada muestra de agua y se sembró en 10 mL de medio MY líquido suplementado con 7,5% de sales (Tabla 6), cada medio inoculado se incubaron a 37°C por 5 días. En la segunda fase de aislamiento, cada muestra en medio MY que presentó turbidez se diluyó 1:10 de la siguiente manera: se tomó 1 mL de cada inóculo y se le añadió a un tubo con 9 mL de medio MY con 7,5% de sales estéril. Posteriormente, se preparó placas de medio MY sólido suplementado con sales al 7,5% (Tabla 6) y se sembró utilizando el método por estría, se incubaron a 37°C por 72 horas (36).

**Tabla 7.** Solución de Sales 30%<sup>1</sup>

NaCl	205,2 g
MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	36,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	52,0 g
CaCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,8 g
KCl	5,2 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,2 g
NaBr	0,6 g
Solución al 0.5 %(p/v) de FeCl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,65 mL
Agua destilada	1000 mL

<sup>1</sup> Rodríguez-Valera (35)

### 3.2.3. Caracterización morfológica de las cepas nativas encontradas.

Las cepas que crecieron en el medio MY suplementado con 7,5% de sales fueron evaluadas según sus características morfológicas. Se seleccionaron las colonias que presentaban un aspecto mucoide y cremoso (23); éstas fueron recultivadas en placas con medio MY suplementado con sales e incubadas a 37°C por 72 horas. Posteriormente las colonias fueron sometidas a un estudio microscópico que consistió en preparar un frotis delgado sobre un portaobjetos, donde se realizó la tinción de Gram. Las muestras fueron observadas al microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión.

Algunas colonias se encontraban agrupadas, por lo cual se procedió a realizar una técnica de separación de cepas de la siguiente manera: se tomó 500 uL de una solución de tritón al 0,1% (37) en un tubo eppendorf estéril, luego con un asa de siembra en punta se retiró una porción de la colonia problema y se depositó en el tubo con tritón 0,1%, posteriormente se agitó vigorosamente usando el vórtex por un tiempo de 5 a 10 minutos; finalmente con un asa de siembra ordinaria se tomó ésta mezcla y se sembró en forma de estría en placas totalmente secas de medio MY suplementado con sales al 7,5% por 48 horas a 37°C.

### 3.2.4. Obtención de exopolisacáridos (EPS) de las cepas nativas seleccionadas

#### *Fundamento*

La recuperación de EPS microbianos del caldo de cultivo se logra por procedimientos que implican: la centrifugación para la eliminación de células, la precipitación del polímero a partir del sobrenadante libre de células mediante la adición de un solvente polar orgánico miscible en agua en la que el polímero es insoluble por ejemplo etanol, la centrifugación para la recuperación del precipitado, la redisolución del precipitado en agua destilada, la diálisis para eliminar impurezas como compuestos de bajo peso molecular y finalmente la liofilización para el secado del EPS.

#### *Procedimiento*

Las cepas nativas aisladas en los métodos anteriores se cultivaron por triplicado en matraces de 250 mL con 100 mL de medio líquido MY suplementado con sales al 7,5% por 5 días a 37°C (31) (38) (24) (24) (6) y una agitación de 100rpm por 3 horas cada día, para la evaluación de la producción de exopolisacáridos. Se partió de un inóculo inicial de 5 mL de cada cepa en medio MY al 7,5% de sales, obtenido tras el crecimiento por 24 h a 37°C, con el cual se inoculó 1 mL en cada uno de los tres matraces.

Para la recuperación de los EPS se utilizó el método propuesto por Mata-Gómez (6) y Bhaskar (39), a los que se les hizo modificaciones y se desarrolló de la siguiente manera: al terminar el tiempo de crecimiento, se centrifugó cada uno de los medios de cultivo a 10 000 rpm a 4°C durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada, para separar las células bacterianas del caldo. El sobrenadante se colocó en matraces de 500 mL y se añadió una cantidad de tres veces el volumen total de sobrenadante de etanol al 96% helado, luego se dejó reposando por toda la noche a 4°C para que precipiten los EPS. Posteriormente se recuperó el precipitado existente centrifugando la solución a 6 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar los posibles restos de alcohol. El precipitado se diluyó completamente con agua destilada y se centrifugó a 15 000 rpm por 30 minutos para eliminar impurezas.

Finalmente cada muestra se dializó, usando membranas de diálisis con tamaño de poro de 12-14 000 daltons, por espacio de 3 días. Para el secado de la muestra se utilizó el método de liofilización, la cual fue realizada en la Universidad Nacional de San Agustín en el Programa Profesional de Industria Alimentaria en el laboratorio de Microbiología. Para la liofilización se congeló las muestras a una temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$ , mientras que la sublimación se realizó a una presión al vacío de 0,250 mBar, el secado se realizó desde  $-46^{\circ}\text{C}$  hasta  $35^{\circ}\text{C}$  (40). Cada muestra liofilizada se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

Se tomó el peso correspondiente de exopolisacárido por cada cepa para obtener la productividad por gravimetría.

Para la determinación de la biomasa, los pellets bacterianos de la primera centrifugación fueron secados a  $90^{\circ}\text{C}$  por 24 horas y posteriormente se pesaron.

### **3.2.5. Caracterización bioquímica de las bacterias nativas aisladas**

Las cepas aisladas fueron sometidas a una identificación de los géneros predominantes mediante la aplicación de una batería de pruebas bioquímicas para bacterias halófilas moderadas, las cuales fueron propuestas por Ventosa y col. (16) y usadas también por Flores-Fernández y col. (41).

La identificación se basó tomando en cuenta las principales características bioquímicas de las bacterias halófilas moderadas (12): para determinar la producción de ácido a partir de glucosa y lactosa, además de la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{CO}_2$  se utilizó la prueba del TSI. (Anexo 2), para determinar la actividad hidrolítica que presentan se usaron sustratos como almidón y gelatina (Anexo 3), para la determinación de la movilidad se usó la prueba del SIM (Anexo 4), para la determinación de aerobiosis se utilizó la prueba del Tioglicolato (Anexo 5), para la determinación de reducción de nitratos se usó el Caldo Nitrato (Anexo 6), para determinar la producción de ácido a partir de manitol se usó el medio Manitol Salado (Anexo 7) y finalmente se utilizó la prueba de la Oxidasa. (Anexo 8) a partir de cultivos en Agar Sangre.

Cabe señalar que todas las pruebas bioquímicas realizadas fueron suplementadas con sales en la misma concentración a las que fueron cultivadas, es decir, al 7,5% (41) con excepción del medio Manitol Salado.

### **3.2.6. Caracterización molecular de las bacterias halófilas nativas**

#### *Fundamento*

En la taxonomía de microorganismos, las regiones que codifican para el ADN ribosomal (rRNA) han sido las más empleadas para realizar estudios moleculares, debido a que contienen tanto regiones altamente variables como secuencias muy conservadas, que pueden ser empleadas para realizar análisis a todos los niveles taxonómicos. La región rRNA se encuentra en todos los seres vivos, pues participa directamente en la conformación de los ribosomas. En el caso de los organismos procariotas este gen se denomina 16s rRNA. La comparación de las secuencias de los 16s rRNA permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. La identificación molecular se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo, como lo son las bacterias halófilas nativas.

#### *Procedimiento*

Se extrajo el ADN de 2 cepas que hayan tenido la mayor producción de EPS, tomando en cuenta cultivos de 48h en medio líquido MY suplementado con sales 7,5%. El aislamiento se realizó empleando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Anexo 9) y se usó el protocolo necesario para la extracción de ADN a partir de bacterias gram positivas o gram negativas, respectivamente.

Posteriormente el ADN aislado fue enviado a la empresa privada Macrogen Inc. en Corea del Sur para la respectiva secuenciación del gen 16s rRNA e identificación molecular de las cepas nativas.

### 3.2.7. Determinación la actividad emulsificante de los EPS extraídos.

Para la determinación de la actividad emulgente de los EPS extraídos se siguió la metodología descrita por Cooper y Goldenberg (42). Se utilizaron tubos de base redonda de 11 mm de diámetro, donde se colocaron 1,5 mL de fase acuosa consistente en una solución de EPS al 0,5% (p/v) (43) (44) y 1,5 mL de fase oleosa. Luego las muestras se agitaron en el vórtex a máxima velocidad por 2 minutos. Tras la agitación las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente ( $20,8 \pm 1^\circ\text{C}$ ), se tomó en cuenta el tiempo que la emulsión se mantuvo estable hasta el momento en que empezaba a separarse para cada muestra. Posteriormente se calculó el porcentaje de la actividad emulgente, tomando la medida de altura de la fase emulsionada después de 24 horas respecto al volumen total de la muestra (*Ecuación 1*) (42).

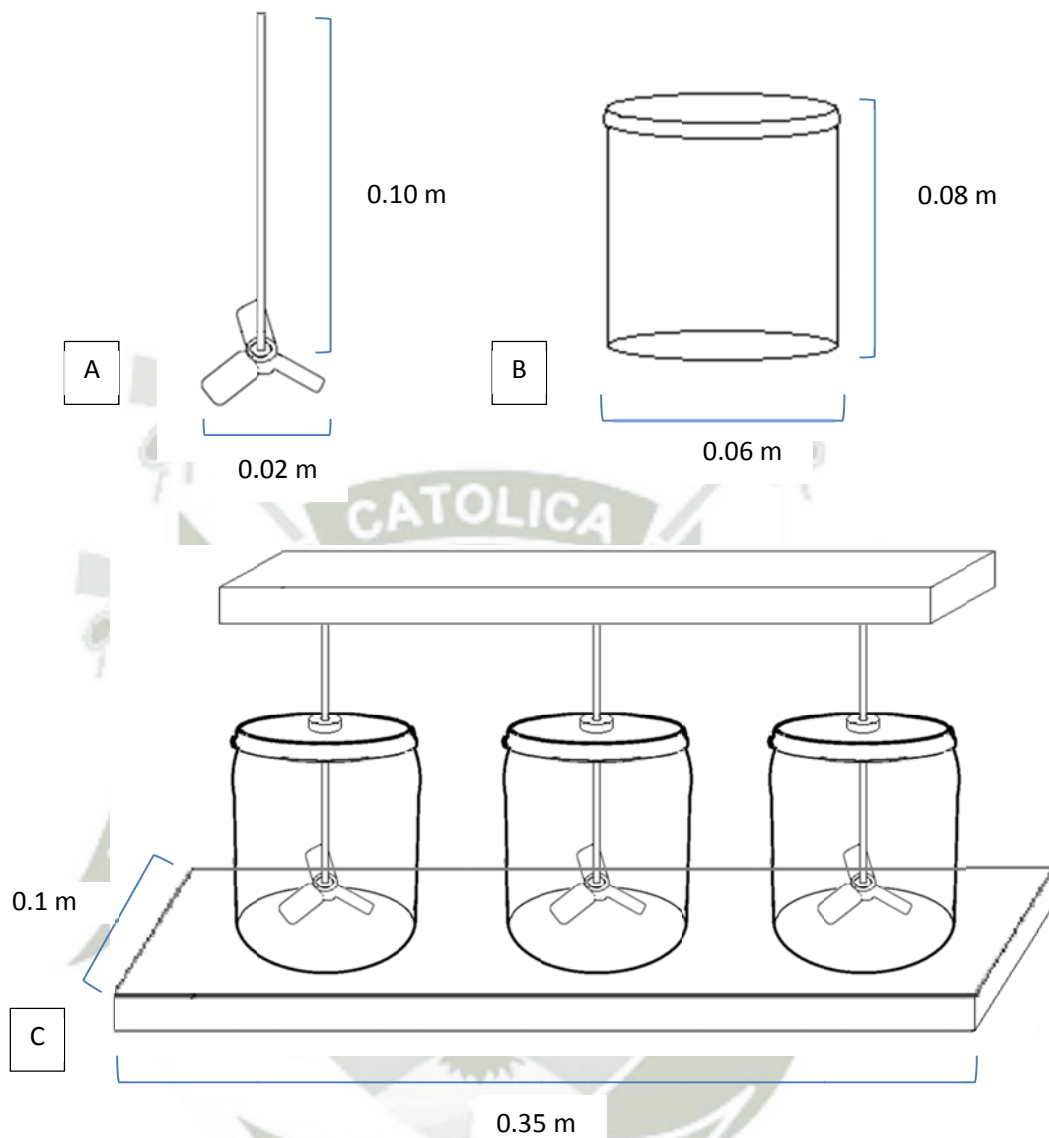
$$\% \text{ Actividad Emulgente} = \frac{\text{Altura emulsión}}{\text{Altura mezcla}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Las fases oleosas usadas fueron: aceite vegetal de soya y vaselina líquida. Como controles se usaron Tween80 y Tritón x-100.

### 3.2.8. Determinación del efecto de la temperatura en la producción de EPS

Se seleccionó la cepa que produjo más EPS con las variables iniciales, y sobre las bases de este resultado se llevó a cabo experimentos adicionales para establecer la condición ideal de temperatura y mejorar la producción de EPS. En este caso se realizó el crecimiento bacteriano en medio MY suplementado con sales al 7,5% por 5 días con una agitación constante a 2 temperaturas diferentes: 30 y 42°C, en frascos de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio y tres repeticiones por cada experimento (43).

Para la determinación del efecto de la temperatura se construyó un sistema de tres frascos con agitación constante, para lo cual se diseñó el tamaño de la paleta de agitación con un impeller tipo flat-blade (42). El diseño final de todo el sistema se observa en la Figura 5. El sistema muestra 3 frascos unidos que trabajaron al mismo tiempo y con la misma agitación. Finalmente, al terminar el tiempo de incubación, se siguió la metodología de extracción de EPS descrita en el punto 3.2.5.



**Figura 5.** Diseño del sistema de agitación constante para la optimización de la producción de EPS. A. Diseño de la paleta de agitación. B. Vista lateral del frasco a usar. C. Vista tridimensional de la conformación final del sistema.



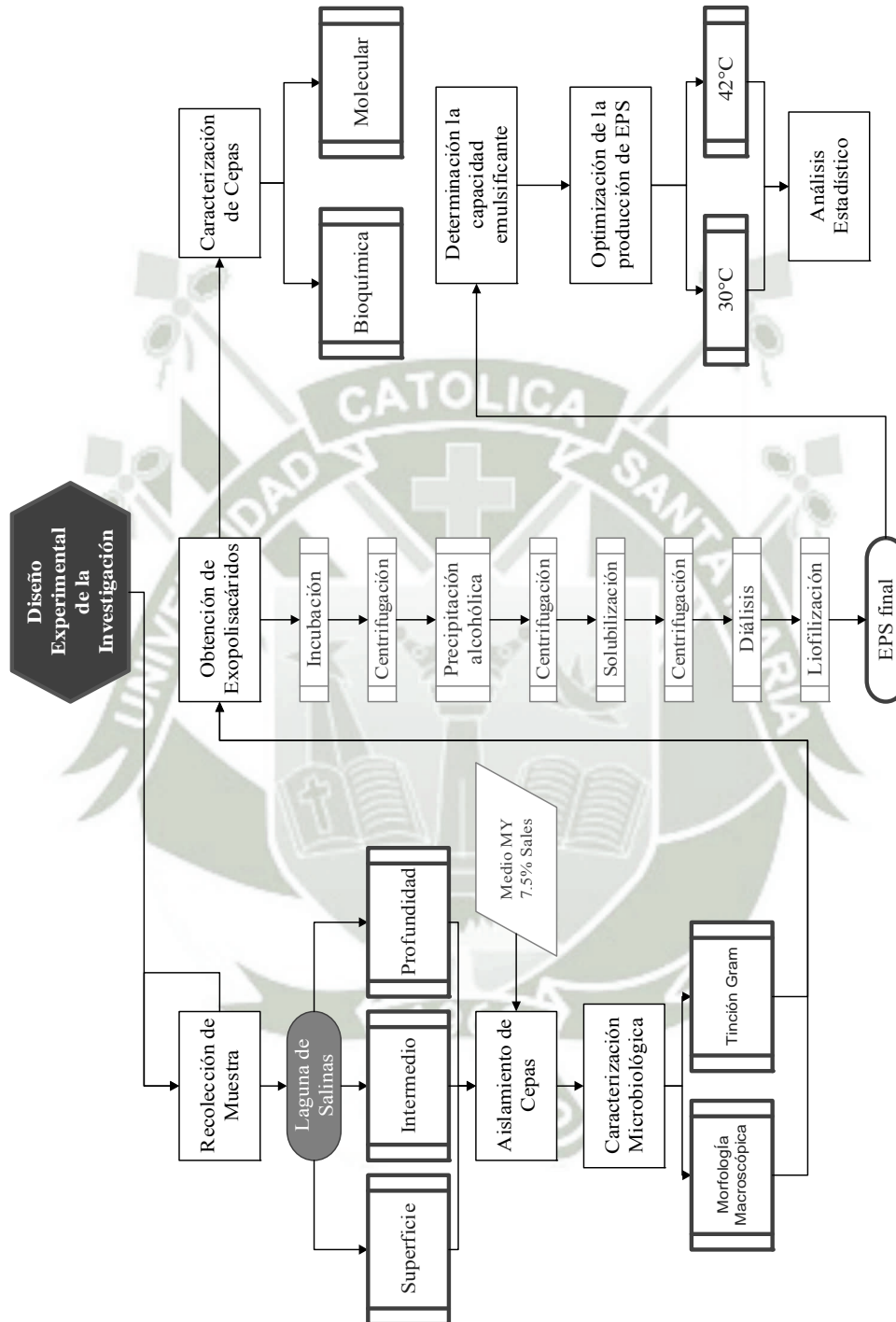
### 3.2.9. Análisis Estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), completamente aleatorio, para evaluar los resultados obtenidos en la extracción de EPS, así como también los datos en la determinación del efecto de la temperatura en la obtención de EPS.

Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional Statgraphics Centurion XVI.I. Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado significativo.



### 3.3.FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1.Recolección de muestras

La toma de muestras se realizó en el mes de Mayo del 2012. Se recolectaron 9 muestras de agua como se observa en la Tabla 8, las cuales están codificadas de acuerdo al punto 3.2.1.

**Tabla 8.** Origen de las muestras de agua de la Laguna Salinas

Zona de muestreo <sup>1</sup>	Superficie	Intermedio (20 cm)	Profundidad (40 cm)
1	M1R1	M1R2	M1R3
2	M2R1	M2R2	M2R3
3	M3R1	M3R2	M3R3

<sup>1</sup> Anexo 1. Muestreo a 100 metros de la orilla

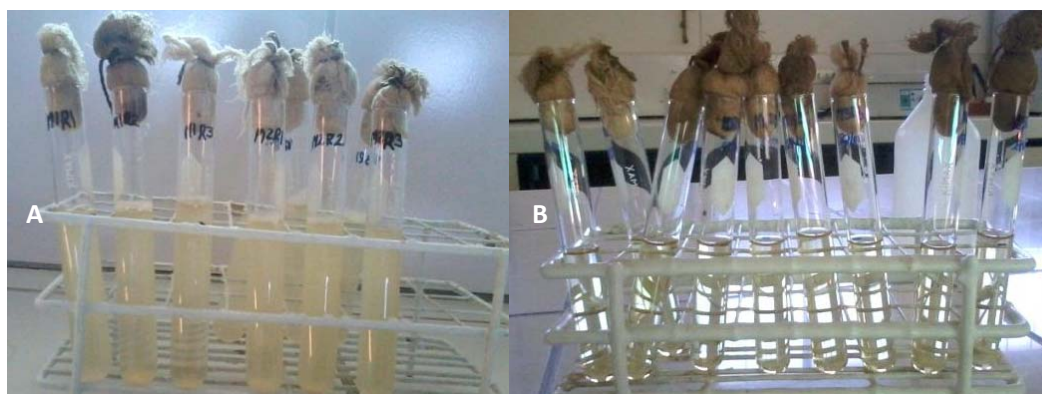
El promedio de la salinidad tomada de las muestras fue de  $9,55 \pm 0,19$  g/L, cuyos datos se reportan en el Anexo 10. Dicho dato difiere de la propuesta por el INRENA (9), esto debido a que la salinidad depende de las fases lacustres y de la estación. La apariencia de las muestras ya extraídas (Figura 6) fueron muy parecidas entre sí, sin embargo las muestras de la zona profunda tuvieron un aspecto turbio debido a la tierra, a su vez todas las muestras tuvieron una temperatura aproximada de  $5 \pm 1$  °C.



**Figura 6.** Muestra de agua de la Laguna de Salinas.

#### 4.2. Aislamiento de bacterias halófilas nativas de la Laguna de Salinas

Se realizó un cultivo inicial de cada muestra en medio líquido MY suplementado con 7,5% de sales a una temperatura de 37°C por 5 días (Figura 7-A) y posteriormente se realizó una dilución de 1:10.



**Figura 7.** Dilución a partir de muestras con crecimiento. A. Medio líquido con crecimiento bacteriano. B. Medio líquido con dilución 1:10

Las muestras diluidas (Figura 7-B) se sembraron en placas de medio sólido MY suplementado con 7,5% de sales; luego de una incubación de 72 horas a 37°C se observaron diversas características. La dilución ayudó a obtener cepas más aisladas y separadas, para así poder escoger las que tengan las características deseadas.

Se observó el crecimiento de gran diversidad de colonias bacterianas de diferentes tamaños, formas y coloración a las 72 horas de incubación. Debido a la dilución las colonias se observaban separadas (Figura 8). Cada cepa fue nombrada según el nombre de la muestra de agua a la cual pertenecía y si había más de una cepa por placa se le colocaban las letras del alfabeto: M1R1-A. Adicionalmente se le colocó un asterisco (\*) a la cepa que fue separada con tritón al 0,1%: M1R1\*A. Posteriormente, de cada placa, se eligieron las colonias que presentaban las características morfológicas deseadas propuestas por Singha (23): aspecto mucoso y cremoso, y éstas fueron repicadas en medio MY suplementado con sales 7,5%.



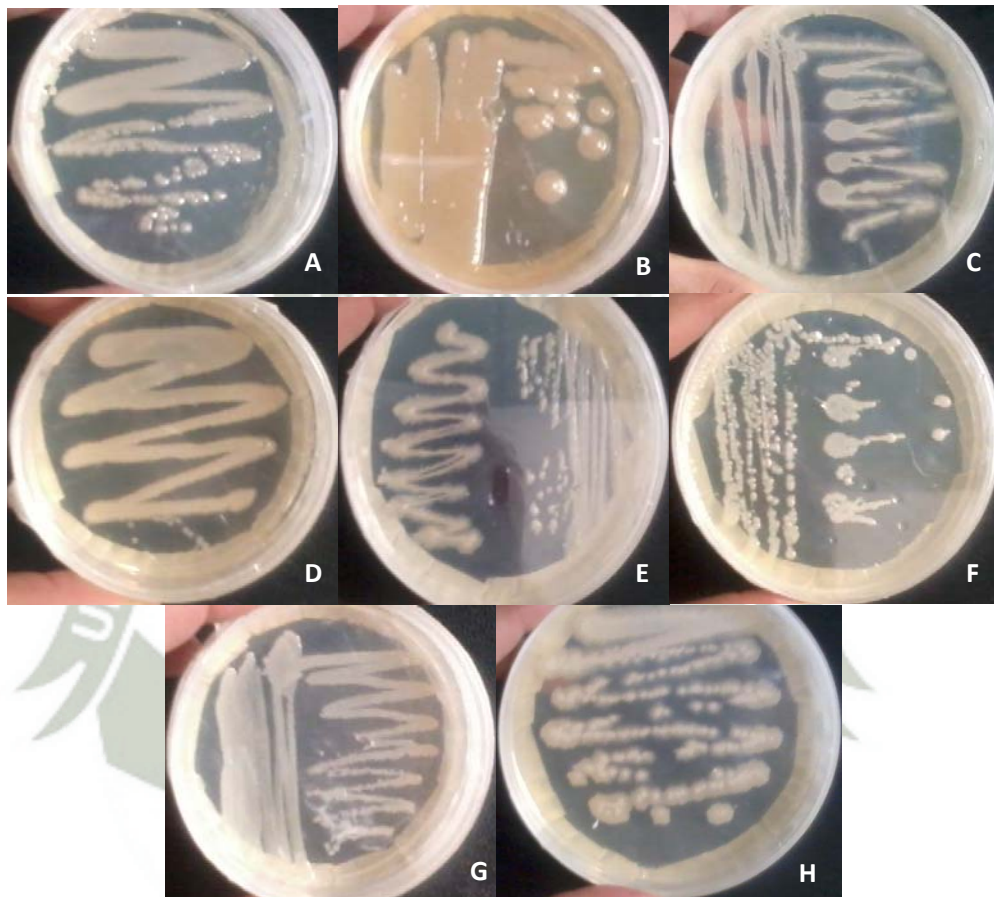
**Figura 8.** Cultivo inicial de bacterias halófilas nativas.

Del total de bacterias aisladas en el cultivo inicial, se seleccionaron 8 cepas que presentaron colonias con características mucosas y cremosas deseadas para la producción de EPS. Se realizaron varios repiques para la obtención de las cepas puras. Posteriormente estas cepas fueron sometidas a una caracterización microbiológica y bioquímica.

Después de 10 repiques se obtuvieron cultivos homogéneos de las 8 cepas seleccionadas. Todas las cepas tienen como característica principal su consistencia cremosa, tienen un tamaño que varía entre 1 y 5 mm y una coloración que varía entre blanco y crema, como se puede observar en la Figura 9 y cuyas características macroscópicas son descritas en la Tabla 9.

#### **4.3. Caracterización microscópica de las cepas nativas encontradas.**

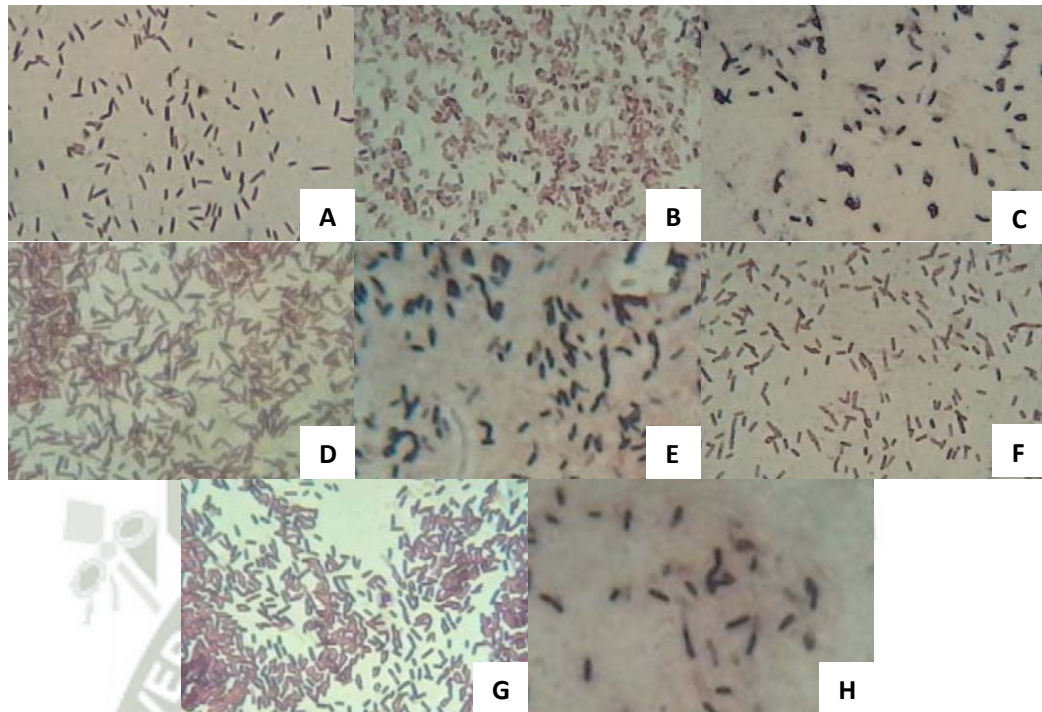
Con el motivo de identificar las bacterias halófilas nativas, se realizó la caracterización microscópica a las 8 cepas seleccionadas anteriormente; para ello se realizó la tinción de gram en un portaobjetos. Posteriormente los portaobjetos se observaron al microscopio a 100x, notándose que todas las bacterias son del tipo bacilo tanto Gram positivas, con una coloración azul violeta intensa; como Gram negativas, con una coloración rosácea (Figura 10).



**Figura 9.** Fotografías de las 8 cepas halófilas nativas seleccionadas cultivadas en medio MY suplementado con 7,5% de sales a 37°C por 72 horas. (A) M1R3-B. (B) M2R1\*A (C) M2R1\*B (D) M2R1-B (E) M3R1-A (F) M3R1\*A (G) M3R2 (H) M3R2\*A

**Tabla 9.** Características macroscópicas de las bacterias halófilas nativas aisladas de la Laguna Salinas

N° Cepa	Tamaño	Color	Forma	Bordes	Superficie	Consistencia	Elevación
1 M1R3-B	2-3 mm	Blanco	Circular	Enteros	Lisa	Cremosa	Convexa
2 M2R1*A	4-5 mm	Crema	Circular	Enteros	Lisa	Cremosa	Convexa
3 M2R1*B	2 mm	Blanco	Irregular	Filamentosos	Rugosa	Cremosa/ Membranosa	Umbonada
4 M2R1-B	2 mm	Crema	Circular	Enteros	Lisa	Cremosa	Plana
5 M3R1-A	4-5 mm	Blanco	Irregular	Ondulados	Acuminada	Mucoide	Elevada
6 M3R1*A	2 mm	Blanco	Circular	Enteros	Lisa	Cremosa	Convexa
7 M3R2	1-2 mm	Blanco	Circular	Enteros	Lisa	Cremosa	Convexa
8 M3R2*A	2 mm	Crema	Irregular	Lobulados	Rugosa	Cremosa/ Membranosa	Umbonada



**Figura 10.** Observación microscópica a100x de la coloración de Gram de las 8 cepas Nativas seleccionadas. (A) M1R3-B. (B) M2R1\*A (C) M2R1\*B (D) M2R1-B (E) M3R1-A (F) M3R1\*A (G) M3R2 (H) M3R2\*A

Se puede observar en la Tabla 10, que todas las bacterias aisladas resultaron ser bacilos: cinco gram negativos (M1R3-B, M2R1\*A, M2R1-B, M3R1\*A, M3R2) y tres gram positivos (M2R1\*B, M3R1-A, M3R2\*A).

Según Ventosa & Nieto (16), en la última década, los extensos estudios sobre ambientes hipersalinos que se han llevado a cabo en muchas áreas geográficas han permitido el aislamiento y caracterización taxonómica de un gran número de especies halófilas moderadas; donde la mayoría de las especies son bacterias halófilas moderadas gram negativas o gram positivas aerobias o anaerobias facultativas.



**Tabla 10.** Características microscópicas de las bacterias aisladas

Cepa	Gram	Forma
M1R3-B	Negativo	Bacilos
M2R1*A	Negativo	Bacilos
M2R1*B	Positivo	Bacilos
M2R1-B	Negativo	Bacilos
M3R1-A	Positivo	Bacilos
M3R1*A	Negativo	Bacilos
M3R2	Negativo	Bacilos
M3R2*A	Positivo	Bacilos

Las bacterias gram negativas aisladas podrían pertenecer a los generos: *Halomonas*, *Deleya*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* o *Chromobacterium*, descritos por Ventosa y Nieto (16). Según datos fenotípicos y filogenéticos apoyan la estrecha relación, y en la actualidad se incluyen en la familia *Halomonadaceae* como miembros de dos géneros: *Halomonas* y *Chromohalobacter*. Además se han descrito como halófilos moderados a especies pertenecientes a géneros no halófilos, tales como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, o *Spirochaeta*.

Por el contrario hay pocos reportes de bacterias halófilas moderadas gram negativas (45). Los bacilos aerobios halófilos moderados gram positivos, con la excepción de dos especies de *Bacillus* reportadas hasta hoy, pertenecen al género *Halobacillus*. Según el reporte de Ventosa y col. (16) muchos bacilos gram positivos aislados (que formaban endosporas y que eran móviles) podrían representar una nueva especie del género *Bacillus*.

Dentro de las bacterias aisladas lo más probable es que existan *Halomonas*, porque existen muchos reportes acerca de estas bacterias que se encuentran en muchos

ambientes hipersalinos y son usados para la extracción de EPS (4) (31) (38) (24) (44) (6). A su vez las cepas de bacilos gram positivos podrían pertenecer al género *Bacillus*, por lo antes descrito por Ventosa y col. (16).

#### 4.4. Obtención de exopolisacáridos (EPS) de las cepas nativas seleccionadas

Se realizó la obtención y extracción de exopolisacáridos (EPS) de cada una de las cepas seleccionadas a partir de un cultivo de 100 mL en medio líquido MY suplementado con sales al 7,5%. El EPS final es un polvo, que tiene una consistencia similar a un algodón, y tiene un color blanquecino o un color beige oscuro, dependiendo de la cepa productora. En la Figura 11 se pueden observar las características visuales de los EPS extraídos.



**Figura 11.** Exopolisacárido final liofilizado.

El medio de cultivo seleccionado para el crecimiento y producción de EPS, fue usado debido a que su composición tiene la fuente de carbono y nitrógeno necesarios para el desarrollo del EPS. A su vez Béjar y col. (24) demostraron que el medio MY fomentó el crecimiento más fuerte de todas las cepas de *H. eurihalina* al contrario del otro medio usado. Como la producción de EPS siempre estuvo vinculada a la biomasa también se obtuvieron los mayores rendimientos usando el medio MY.

Los datos obtenidos de tres repeticiones se analizaron estadísticamente y los resultados se reportan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Eficacia de la producción de EPS de cada cepa halófila nativa.<sup>1</sup>

<b>Cepa</b>	<b>EPS<sup>2</sup></b> <b>g/100 mL</b>	<b>Biomasa<sup>2</sup></b> <b>mg/100 mL</b>	<b>Rendimiento<sup>2</sup></b> <b>mg EPS/mg</b> <b>Biomasa</b>
<b>M1R3-B</b>	30,53	361,37	0,084
<b>M2R1*A</b>	25,93	468,20	0,055
<b>M2R1*B</b>	45,07	226,10	0,202
<b>M2R1-B</b>	42,47	357,07	0,124
<b>M3R1-A</b>	48,45	266,37	0,184
<b>M3R1*A</b>	4,03	407,13	0,010
<b>M3R2</b>	10,87	347,00	0,031
<b>M3R2 *A</b>	13,63	308,10	0,044

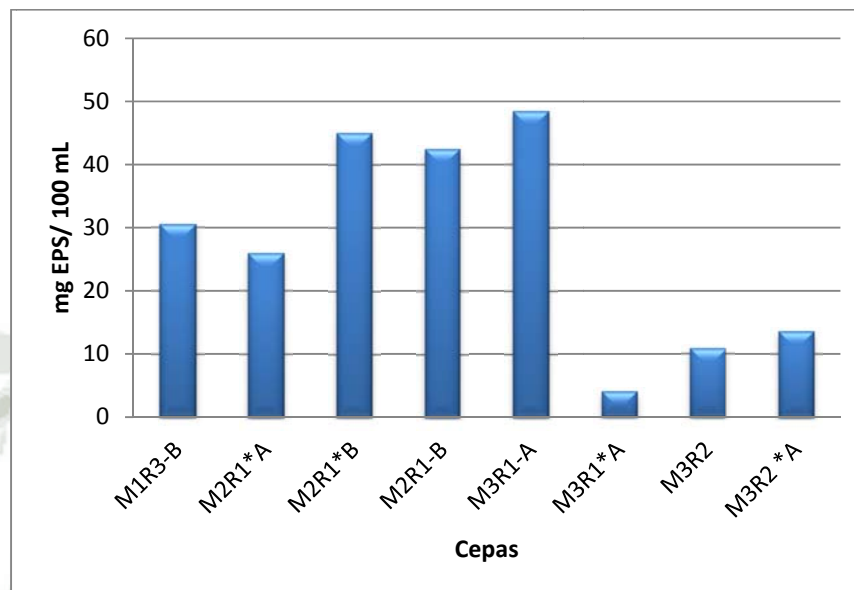
<sup>1</sup> Anexo 11; <sup>2</sup> n=3; P= 0.00

Los datos obtuvieron un valor de P = 0,00 con la prueba ANOVA con la cual existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de las 8 cepas con un nivel del 95,0% de confianza.

Como se observa en la Tabla 11, el rendimiento de EPS varía de una cepa a otra. Casi todas las bacterias sintetizan más de 25 mg/100 mL de medio de cultivo, a excepción de las cepas M3R1\*A, M3R2 y M3R2\*A cuyo rendimiento es mucho menor, y debido a esto no se utilizaron para experimentos posteriores.

En el Gráfico 1 se observan tres grupos de resultados similares bastante diferenciados entre sí; por ejemplo las cepas M1R3-B y M2R1\*A; las cepas M2R1\*B, M2R1-B y M3R1-A; y por último las cepas M3R1\*A, M3R2 y M3R2\*A, donde se puede diferenciar claramente que las bacterias M2R1\*B, M2R1-B y M3R1A son las que sintetizan más EPS con relación a las demás. Estos resultados son comparables con los propuestos por Bouchotroch y col. (38) cuyas cepas S-43 y S-45 de *Halomonas* producen 40 y 50 mg EPS/ 100 mL, respectivamente. A su vez nuestras cepas son

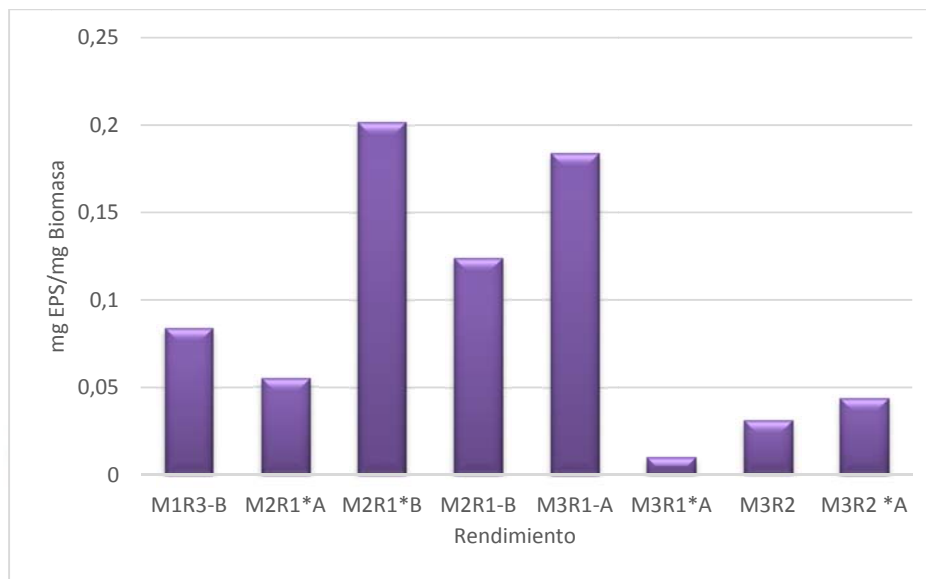
superiores en cantidad de EPS producido a las cepas reportadas por Mata y col. (44): A112T y A116 de *H. ventosae* que sintetizan 28,35 mg y 28,95 mg of EPS/100 mL, respectivamente y a las cepas FP35T y FP36 de *H. anticariensis* que sintetizan cerca de 29,65 y 49,95 mg of EPS/100 mL.



**Gráfico 1.** Comparación de la producción de EPS de las 8 cepas aisladas.

Se puede decir que el rendimiento es directamente proporcional al crecimiento bacteriano, como se puede observar en la Tabla 8 y Gráfico 2. A su vez las cepas M2R1\*B y M3R1-A cuentan con un mayor rendimiento a las condiciones de 37°C e incubación de 5 días. Según Mata-Gómez (6) el rendimiento varía significativamente en algunas cepas cuando los parámetros como la temperatura y agitación son cambiados. Los datos de rendimiento son comparables con los descritos por Bouchotroch y col. (38) donde las cepas S-5, S-24 y S-41 de *Halomonas* tienen un rendimiento de 0,20 mg EPS/ mg Biomasa similar al de la cepa M2R1\*B, a su vez la cepa S-47 tiene un rendimiento de 0,13 mg EPS/ mg Biomasa similar al de la cepa M2R1-B y finalmente la cepa S-10 tiene un rendimiento de 0,18 mg EPS/ mg Biomasa similar al de la cepa M3R1-A. Sin embargo existe un rendimiento mayor en la cepa S-7 con 0,42 mg EPS/ mg Biomasa (38), pero la cantidad de EPS reportado no es el mayor.

Con respecto a las cepas de este estudio, se puede observar que tienen un mediano rendimiento, el cual puede ser mejorado en una optimización.



**Gráfico 2.** Comparación del rendimiento de EPS de las 8 cepas aisladas.

Se puede decir que a pesar de la diversidad de bacterias estudiadas, el comportamiento que presentan al sintetizar EPS bajo las mismas condiciones es similar, lo que podría estar relacionado con un metabolismo y fisiología comunes, debido a que provienen de un mismo ecosistema salino. Un ejemplo claro sería que casi todas las cepas muestran una producción de EPS parcialmente asociada al crecimiento celular, esto puede deberse a que la síntesis de EPS comienza en la fase exponencial de crecimiento y alcanza su máximo durante la fase de crecimiento estacionario, tal y como lo reportan Mata-Gómez (6) y Arias y col. (31).

#### **4.5. Caracterización bioquímica de las bacterias nativas aisladas**

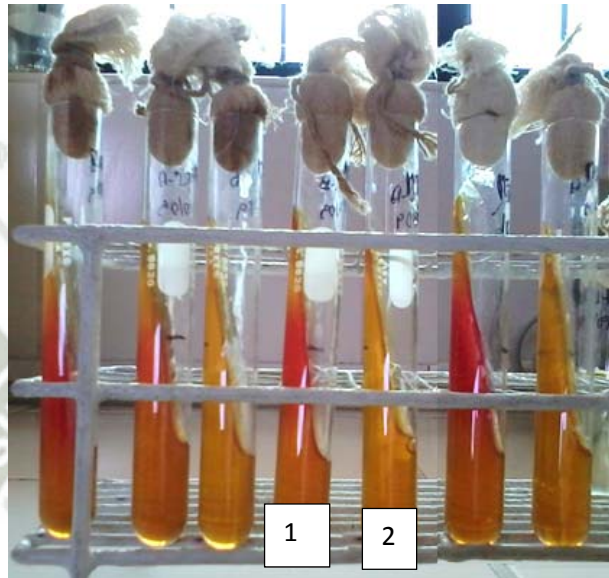
El resumen de todas las características bioquímicas de las cepas aisladas se reportan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Principales características bioquímicas de las Bacterias Halófilas Aisladas

Características	Cepas									
	M1R3-B	M2R1*A	M2R1*B	M2R1-B	M3R1-A	M3R1*A	M3R2	M3R2*A	M3R2*B	M3R2*A
Movilidad	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido a partir de Manitol <sup>1</sup>	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	+	ND	+
Hidrólisis de Almidón	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Hidrólisis de Gelatina <sup>2</sup>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Aerobio Facultativo <sup>2</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+

<sup>1</sup>El crecimiento en Agar manitol salado confirma que las bacterias son gram (+), inhibe en muchos casos el crecimiento de gram (-). <sup>2</sup>Todos los (-) fueron aerobios estrictos. ND. No determinado.

Al realizar la prueba del TSI (Figura 12) se pudo evaluar la capacidad de las cepas de formar ácido a partir de glucosa, como lo demostraron todas las cepas, así como también ninguna produjo  $H_2S$  ni  $CO_2$ . Pero la formación de ácido a partir de lactosa solo fue demostrada por las cepas M2R1\*B, M3R1-A y M3R2\*A.



**Figura 12.** Fotografía de la Prueba en Agar TSI. (1) Fermentador de glucosa. (2) Fermentador de glucosa y lactosa.

Se determinó que las cepas M1R3-B y M3R1\*A no hidrolizan ninguno de los sustratos usados: ni gelatina ni almidón, por el contrario las cepas M2R1\*A, M2R1\*B y M3R1-A hidrolizan tanto la gelatina como el almidón; mientras que las cepas M2R1-B y M3R2 solo hidrolizan gelatina y la cepa M3R2\*A solo el almidón. En la Figura 13 se observa que en la prueba de hidrólisis de almidón al añadir lugol se forma un halo alrededor de la colonia lo que significa que la bacteria hidrolizó el almidón del medio. Mientras que en la hidrólisis de gelatina positiva se observa que la gelatina se vuelve líquida después del crecimiento bacteriano

Las cepas nativas fueron sembradas en medio SIM para comprobar la formación de  $H_2S$  y la motilidad. Se determinó que las cepas M2R1\*A, M2R1\*B, M3R1-A y M3R2\*A

presentan motilidad, debido a la turbidez difusa del medio alrededor del canal de la picadura; y ninguna cepa presento formación de  $H_2S$ .



**Figura 13.** Fotografías de las pruebas de Hidrólisis. A. Hidrólisis de Almidón. B. Hidrólisis de Gelatina

Al realizar el cultivo en caldo Tioglicolato se determinó que las cepas M2R1\*B, M3R1-A y M3R2\*A son anaerobios facultativos debido a que presentaron turbidez en todo el tubo; sin embargo las cepas M1R3-B, M2R1\*A, M2R1-B, M3R1\*A y M3R2 demostraron ser aerobias estrictas debido a su crecimiento sólo en la superficie del medio de cultivo, tal y como se observa en la Figura 14.

Las cepas aisladas fueron sembradas en caldo nitrato y dieron los siguientes resultados: todas las cepas a excepción de la M2R1\*A pueden reducir nitratos a nitritos, debido a la coloración rojiza que presentaron al añadir la solución A y B. (Figura 15)

Se cultivaron las cepas en el Medio Manitol Salado para observar la producción de ácido a partir de manitol. En esta prueba solo crecieron los microorganismos gram positivos M2R1\*B, M3R1-A y M3R2\*A, debido a que el medio inhibe, en su mayoría, a las bacterias gram negativas (46). Como se observa en la Figura 16 las tres cepas



produjeron ácido a partir de manitol, debido a la coloración amarilla en el medio y en las colonias.



**Figura 14.** Fotografía de la prueba de Tioglicolato. A. Cepa anaerobia facultativa. B. Cepa aerobia estricta



**Figura 15.** Fotografía de la prueba de reducción de nitratos



**Figura 16.** Fotografía del cultivo en Agar Manitol Salado

Todas las cepas fueron cultivadas en Agar Sangre para la prueba de Oxidasa, la cual fue negativa en todas las cepas aisladas.

Se compararon las pruebas bioquímicas de todas las cepas gram negativas con las reportadas por Ventosa y col. (16). Las cepas M1R3-B, M2R1-B, M3R1\*A y M3R2 tuvieron perfiles parecidos entre sí con las 9 pruebas llevadas a cabo, todas estas fueron concordantes entre 5 y 6 pruebas bioquímicas de las diferentes especies de *Halomonas*; por lo que se identificó tentativamente a estas cepas bacterianas como pertenecientes al género *Halomonas*. A su vez Oren (47) señala que entre los representantes de las bacterias halófilas, las especies de *Halomonas* (*H. maura*, *H. eurihalina*) son una promesa considerable como productores de grandes cantidades de EPS, posiblemente como agentes emulsificantes potentes.

La cepa M2R1\*A presenta una concordancia de 6 pruebas sobre 9 realizadas con dos géneros *Halomonas* y *Salinivibrio*. De acuerdo a que las características morfológicas reportadas (16) éstas coinciden con la cepa reportada, se identificó tentativamente que el género de esta cepa nativa es el *Salinivibrio*.

La comparación con las bacterias gram positivas resultó un poco más dificultosa, por lo cual se utilizaron diferentes tablas donde se reportaron datos para los bacilos gram positivos. Al analizar las tres cepas M2R1\*B, M3R1-A y M3R2\*A con las pruebas bioquímicas reportadas por Orsod y col. (32) y Kalimutho y col. (48) se puede especular

que estos tres bacilos pertenecen al género *Bacillus*. Así también nuestras cepas coinciden casi totalmente con las pruebas bioquímicas de las cepas T-8 y T-12 aisladas de las salinas de Pilluana San Martín, y en donde Flores-Fernández y col. (41) reportan que podrían tratarse del género *Bacillus*, ya que son los géneros más representativos de gram positivos en ambientes salinos.

Debido a que las cepas estudiadas son nativas, no se puede realizar una identificación de especie bacteriana, con los datos obtenidos solo se pudo llegar a estimar el género de las bacterias.

#### 4.6. Caracterización molecular de las bacterias nativas aisladas

Las cepas nativas seleccionadas para la identificación molecular fueron M2R1-B y M3R1-A, debido a que fueron las bacterias gram negativas y gram positivas con mayor producción de EPS, respectivamente.

Para la secuenciación de 16s rRNA se usaron los primers universales 518F (CCAGCAGCCGCGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC) (49). El secuenciamiento del gen rRNA 16S de cada una de las cepas se muestra a continuación:

##### M2R1-B (Anexo 12)

Secuenciamiento Macrogen de M2R1-B empleando el primer 418F

```
GGGGGCACGTTTATCGGATTCTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAA
GCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAAGTGTG
AGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTGACA
CTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACCAGCCGTTGGGTGCCTAGAGCACTTT
GTGGCGAAGTTAACGCGATAAGTCGACCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTGACATCCTGCGAAC
CCGGAAGAGATTCCGGGGTGCCTTCGGGAAGTCAAGAGACAGGTGCTGCATG
GCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGC
AACCTTGTCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTCCGGGAAGTCTAAGGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
TACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGAG
```

CTCGCGAGAGTCAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTC  
TGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGT  
CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA  
GTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCCTAACGCAAGAGGGCGATCACCACGG  
TGTGGTTCATGACTGGGGTGGAGCTAGGAGGGGAGGCCCCCAAAAAAAAAAA  
AGTGGGGGGGGGG

Secuenciamiento Macrogen de M2R1-B empleando el primer 800R

CGCTTCTTTTCGCACTCAGTGTGTCAGTGTGTCAGTCCAGAAGGCCGCCTTCGCCA  
CTGGTATTCCTCCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCTACC  
TTCTCTCCTGCACTCTAGCCTGACAGTTCCGGATGCCGTTCCAGGTTGAGC  
CCGGGGCTTTCACAACCGGCTTATCAAGCCACCTACGCGCGCTTTACGCCA  
GTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGG  
AGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGAGTGATGTCTTTCCTGATGGGTATTAACCA  
CCAGGCGTTCTTCTCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAGGGCCTTCTTAC  
ACACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACT  
GCTGCCTCCCGTAGGAGTTCGGGCCGTGTCTCAGTCCCGATGTGGCTGATCA  
TCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTTGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAA  
CTAGCTAATCCGACATAGGCTCATCCAATAGCGGGAGCCGAAGCCCCCTTTC  
TCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCCTGGGTTTCCCAGGTTATCCCCAC  
TATCGGGCAGATTCTATGCATTACTACCCGTCCGCCGCTCGTCAGCGGGT  
AGCAAGCTACCCCTGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAG  
CGTTCAATCTGAGCAGAAAAAAAAAACTCTAAAAAACGGGGGGCGGGCGGCT

M3R1-A (Anexo 13)

Secuenciamiento Macrogen de M3R1-A empleando el primer 418F

GGCGTGACGTTCTCGGCATATTGCGGCGTAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTA  
GGTCTGATGTGATAGCCACGCGCTCAACCGAGGGAGGGTCATTGGATACT  
GGGTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCT  
GTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCC  
CTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC  
AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT  
GTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT  
GACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTG  
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC  
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCG  
AAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAG  
TCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT

```
GCCCGGTGGAATACCGTTCCTCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACG  
AGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCG  
AAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAATCTACGGGGGGGGGCCCCCATAAAA  
AGGGGGGGGGGGGGG
```

Secuenciamiento Macrogen de M3R1-A empleando el primer 800R

```
GGGCGTTCCTTTCGCGCATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGC  
CACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCA  
CTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGA  
GCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCC  
CAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC  
GTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCG  
AACGGTACTTGTCTTCCCTAACCAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCA  
TCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCT  
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGA  
TCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCAC  
CAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGCAAGTGGTAGCTGAAAGCCAC  
CTTTTATGATTGAACCATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGT  
TCCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCC  
GTCCGCCGCTGACCTAAGGGAGCAAGCTCCCGTCGGTCCGCTCGACTTGCAT  
GTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGACCAAAAACTCATA  
AACAGGCCCGAATCCCTA
```

Posteriormente fue hallada la secuencia consenso para cada una de las cepas y fueron analizadas en la herramienta Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De esta manera se obtuvo el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura de cada una de ellas con las secuencias de la base de datos.

En la Tabla 13 se presentan el nombre de los microorganismos que presentaron homología con la secuencia del gen 16s rRNA de la cepa nativa M2R1-B cuando fue comparada con la base de datos GenBank utilizando la herramienta BLAST, produciendo alineamientos significativos con bacterias del genero *Halomonas*. De las homologías encontradas, se muestran 4 en la tabla, en donde la bacteria *Halomonas sp.* SB119\_3 presenta un 99% de identidad con la secuencia de la cepa nativa M2R1-B cuando se compara 1495 pb. y en orden de homología le siguen otras bacterias del genero *Halomonas sp.*

**Tabla 13.** Microorganismos que presentan homología con la secuencia de la cepa M2R1-B

N° de Acceso	Descripción	Cobertura de Búsqueda	Valor E	Ident.
<b>HM126924.1</b>	Uncultured bacterium clone SINI546 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0.0	99%
<b>EU308320.1</b>	<i>Halomonas</i> sp. SB119_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0.0	99%
<b>EU308319.1</b>	<i>Halomonas</i> sp. SB119_2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0.0	99%
<b>EU308318.1</b>	<i>Halomonas</i> sp. SB119_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0.0	99%

De igual forma en la Tabla 14 se nombran los microorganismos que presentan homología con la secuencia de la cepa nativa M3R1-A, produciendo alineamientos significativos con bacterias del genero *Bacillus licheniformes*.

**Tabla 14.** Microorganismos que presentan homología con la secuencia de la cepa M2R1-B

N° de Acceso	Descripción	Cobertura de Búsqueda	Valor E	Ident.
<b>JF309229.1</b>	<i>Bacillus</i> sp. 3547BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	99%
<b>HQ850703.1</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> strain ML1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0.0	99%
<b>AF276309.1</b>	<i>Bacillus licheniformis</i> strain B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	99%
<b>JQ068114.1</b>	<i>Bacillus</i> sp. XJ-B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	0.0	99%

Al comparar las secuencias con las secuencias de la base de datos del NCBI empleando la herramienta del Blast se identificaron molecularmente a 2 de las cepas aisladas:

M2R1-B y M3R1-A, y se identificaron entonces como *Halomonas sp.* y *Bacillus licheniformes*, respectivamente.

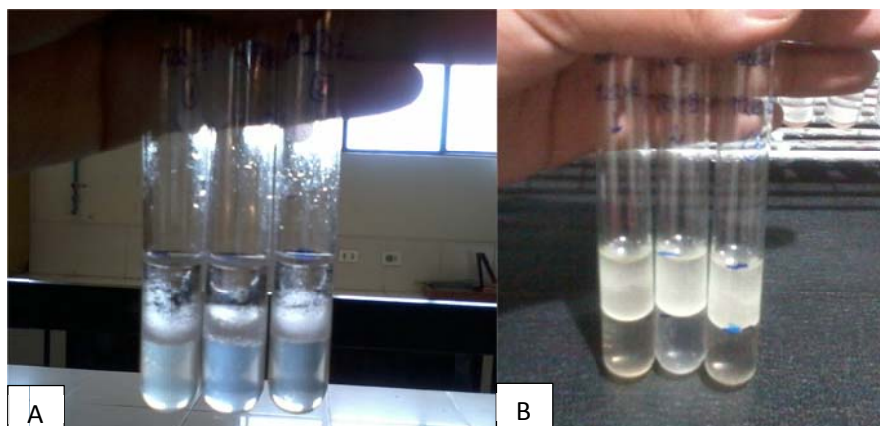
Luego de obtener los resultados de la identificación molecular que nos revela únicamente el género de la cepa M2R1-B podemos confirmar lo que se estableció anteriormente en la caracterización microscópica y caracterización bioquímica, con respecto al bacilo gram negativo, ya que se preveía que encontraríamos cepas de *Halomonas*. A su vez, al no tener una especie establecida podría ser una nueva especie de *Halomonas* nativa de la Laguna de Salinas. Para la producción de EPS se ha reportado muchos casos de bacterias *Halomonas* con alto potencial de extracción de EPS tales como los descritos por Amjres y col. (4), Arias y col. (31), entre otros.

Se observa una particularidad con el bacilo gram positivo, ya que aún no se considera al *Bacillus licheniformes* como bacteria halófila, pero si como halotolerante debido a que puede encontrarse en ambientes salinos como el mar (50). Sin embargo Ventosa (8) muestra algunos géneros representativos de halófilos moderados donde incluyen géneros de bacterias halófilas moderadas y otras no halófilas o halotolerantes; dentro de estas el género *Bacillus*. No obstante, no puede negarse que otras especies no-halofilas podrían incluirse también en un futuro próximo dentro del género de bacterias halófilas (8).

Se han reportado varios informes de producción de EPS de otras bacterias del género *Bacillus* como lo demuestra Orsod y col. (32). Así también hay reportes de *Bacillus licheniformes* como productor de EPS bajo distintas condiciones (51) con respecto al trabajo realizado en esta investigación.

#### **4.7. Determinación la actividad emulsificante de los EPS extraídos.**

Se determinó la capacidad de los EPS extraídos de estabilizar emulsiones, para esto se usaron aceite vegetal de soya y vaselina líquida como compuestos oleosos. Una de las maneras más adecuadas para la detección de posibles microorganismos productores de biotensioactivos es el uso del método de Cooper y Goldenberg (42) para estimar el porcentaje de emulsificación después de 24 horas, como se muestra en la Figura 17.



**Figura 17.** Emulsiones con fase acuosa de EPS extraídos después de 24 horas. A. Fase oleosa de vaselina líquida. B. Fase oleosa de aceite de soya.

**Tabla 15.** Porcentaje de emulsificación de los EPS extraídos.

Cepa	% Emulsificación	
	Vaselina Líquida	Aceite de Soya <sup>1</sup>
<b>M2R1*A</b>	18,28	ND
<b>M2R1-B</b>	29,90	ND
<b>M2R1*B</b>	3,13	ND
<b>M3R1-A</b>	16,67	ND
<b>Controles</b>		
<b>Tween 80</b>	42,86	46,55
<b>Triton X-100</b>	45,71	45,95

<sup>1</sup> ND, No Determinado

En la Tabla 15, se reportan los resultados de emulsificación con los EPS extraídos. Se puede observar que la cepa M2R1-B, identificada como *Halomonas sp.* muestra el mayor porcentaje de emulsificación (29,90%) con la vaselina líquida en comparación con las demás cepas analizadas. Este resultado podría ser comparado con el reportado por Bouchotroch y col. (38), donde las cepas de *Halomonas* S-26 y S-42, tuvieron un porcentaje de emulsificación de 29,4 y 27,7 respectivamente con aceite mineral, a una



concentración de 1% (p/v) de EPS. Sin embargo la cepa con mayor porcentaje de emulsificación reportada en el mismo estudio fue la S-30 con 83%, siendo aún mayor que la de los controles usados.

Otras cepas reportadas que obtuvieron porcentajes altos de emulsificación con aceite mineral fueron los reportados por Llamas y col. (43) con *S. mucosus* A3 con 71% ensayado a 4°C, por Mata, 2006 donde *H. ventosae* A116 reportó un valor de 62,5% ensayado a 4°C, por Llamas y col. (25) con la cepas *H. almeriensis* con 67,5% y por Mata (52) donde las cepas de *Idiomarina fontislapidosi* e *Idiomarina ramblicola* presentaron un valor de 62,5% de emulsificación para aceite mineral.

Las cepas M2R1\*A y M3R1-A obtuvieron porcentajes de emulsificación parecidos: 18,28 y 16,67% respectivamente, los cuales pueden ser comparados con los de la cepa *Halomonas* S32 que reporta un porcentaje de emulsificación de 19,5%. (38). Finalmente la cepa que obtuvo el menor porcentaje de emulsificación para vaselina líquida fue la M2R1\*-B con 3.13%.

Para el caso del aceite vegetal de soya, los valores de todas las cepas no pudieron ser determinadas, debido a que la fase emulsificada es muy ínfima (Figura 17-B) y el valor no puede ser cuantificado. Debido a que no hay casos conocidos de ensayos de emulsificación de EPS de bacterias halofilas con aceite de soya, los resultados se compararon con otros aceites vegetales como el girasol y la oliva.

Se encuentran muchos reportes de emulsificación con aceite de oliva como el de las cepas de HK8 y HK10 de *H. nitroreducens* con 48,7 y 50% de emulsificación, respectivamente. A su vez, la emulsificación con aceite de girasol reportado para las cepas HK6, HK10, HK12 y HK13 fueron de 52,6, 52,5, 51,1 y 47,3%, respectivamente reportadas por Amjres (4). A su vez los resultados reportados por Mata y col. (44) muestran un 51 y 47,5% de emulsificación ensayado a 4°C, para las cepas *H. ventosae* A112 y *H. anticariensis* FP35, respectivamente para aceite de girasol.

Otras cepas reportadas que obtuvieron porcentajes de emulsificación bastante altos fueron *H. nitroductens* HK30 con 85% para aceite de oliva y 70% para aceite de girasol reportado por Amjres (4) junto con *S. mucosus* ensayado a 4°C reportado por Llamas y col. (43).

Como se puede observar los resultados reportados son bastante diferentes a los encontrados en este trabajo para el aceite vegetal, esto puede ser debido a la diferencia de composición de los aceites reportados, y a su vez al tratamiento usado, ya que algunos tratamientos se hicieron a 4°C y en esta investigación se trabajó a temperatura ambiente (20,8±1°C).

Una de las propiedades funcionales más importantes de los polímeros microbianos es su capacidad de estabilizar emulsiones. Esta actividad tiene interés en alimentación y en la industria farmacéutica (4), ya que tienen numerosas ventajas frente a los surfactantes de origen químico, por ejemplo son compuestos biodegradables, de menor toxicidad, presentan una gran diversidad, son eficaces en condiciones extremas (pH, temperatura, salinidad) y se obtienen a partir de fuentes renovables (6). Como se puede observar en nuestros resultados, el porcentaje de emulsificación de los EPS extraídos para aceite mineral se encuentran dentro de un rango intermedio con respecto a la capacidad emulsificante reportada por otras cepas, es por eso que dichos EPS podrían ser usados en la industria farmacéutica.

Mata y col. (44) sugieren que el contenido de proteínas juega un papel crucial en la actividad emulsionante de un EPS, debido a que la actividad emulsionante específica del EPS de *H. ventosae*, al cual realizaron un tratamiento y que contenía 0% de proteína residual, fue algo menor que el de los de EPS sin ningún tratamiento, a su vez examinaron el efecto de las enzimas sobre ellos y encontraron que los tratamientos tanto con proteinasa K y tripsina causaron una pérdida significativa de actividad emulsionante. Por esta razón, se puede decir que los EPS extraídos en este trabajo podrían presentar proteínas en su composición química, debido a su capacidad emulsificante.

#### 4.8. Determinación del efecto de la temperatura en la producción de EPS

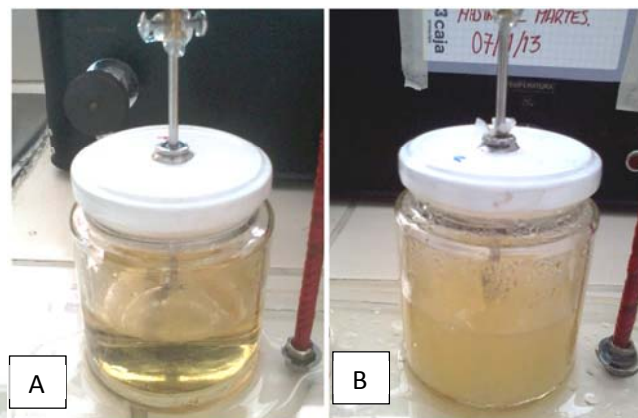
Se ensayó la influencia del parámetro de temperatura con el fin de determinar su efecto en la producción de EPS por la cepa M3R1-A, identificada como *Bacillus licheniformes*, la cual en ensayos iniciales sintetizó la mayor cantidad de EPS en comparación con las demás cepas analizadas. Para esto se utilizó un sistema como se observa en la Figura 18.



**Figura 18.** Sistema con agitación constante para la determinación del efecto de la temperatura en la producción de EPS.

Se realizó el crecimiento bacteriano a dos temperaturas diferentes: 30 y 42°C, ambos con una agitación mecánica constante, en la Figura 19 se observa el crecimiento bacteriano después de 5 días de incubación en el sistema.

Los datos obtenidos de tres repeticiones para cada temperatura ensayada se analizaron estadísticamente y los resultados se reportan en la Tabla 16.



**Figura 19.** Crecimiento bacteriano dentro del sistema. (A) Cultivo en tiempo inicial. (B) Cultivo después de 5 días de incubación.

**Tabla 16.** Producción de EPS de la cepa M3R1-A a diferentes temperaturas.

	Temperatura, °C <sup>2</sup>		
	30	37 <sup>3</sup>	42
EPS, mg/100 mL <sup>1</sup>	19,37	48,45	16,47
Biomasa, mg/100 mL <sup>1</sup>	146,47	266,37	137,10
Productividad, mg EPS/mg Biomasa <sup>1</sup>	0,136	0,184	0,123

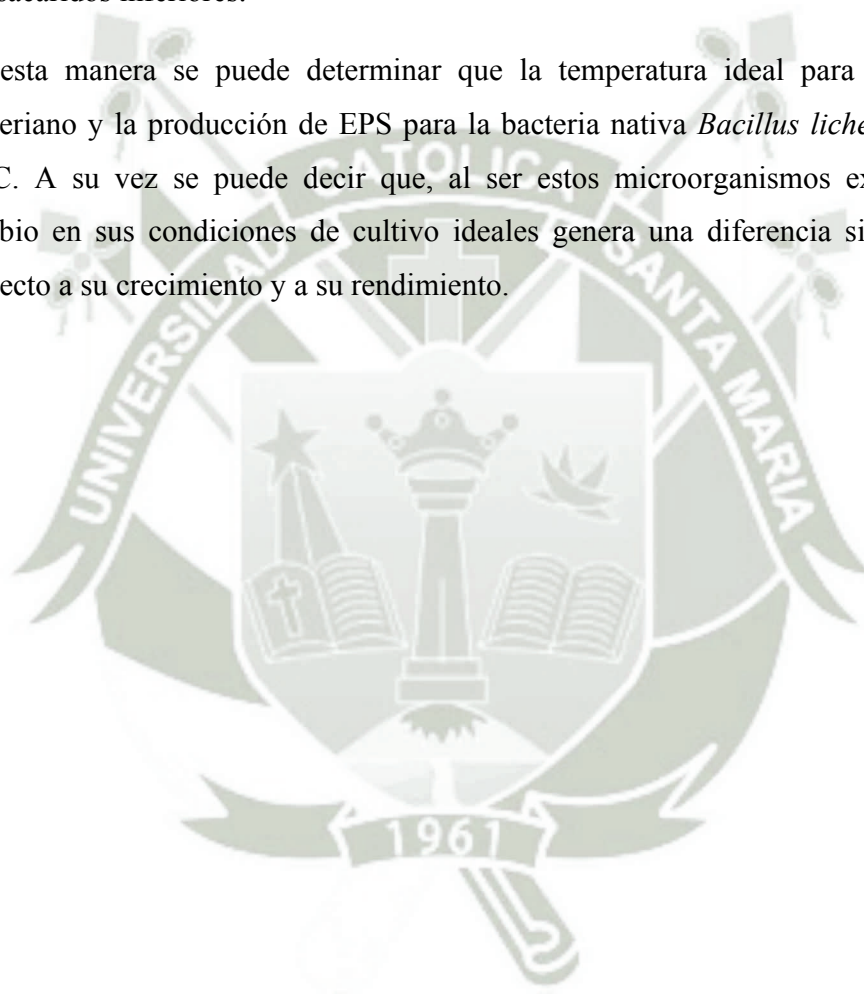
<sup>1</sup>Anexo 14; <sup>2</sup>n=3; <sup>3</sup> Datos con las condiciones iniciales de crecimiento

Como se puede observar en la Tabla 16 la cantidad de EPS extraídos fueron sustancialmente menores en tanto 30°C y 42°C que a 37°C, lo cual es concordante con una inhibición significativa en el crecimiento bacteriano. Se confirma así que el rendimiento de EPS está directamente relacionada con la cantidad de biomasa en el cultivo y con la temperatura de incubación. De la misma manera, tanto la incubación estática y una velocidad de agitación de más de 100 rpm dieron crecimiento similar inferior y EPS más bajos rendimientos.

Estos resultados pueden ser comparados con los reportados por Llamas y col. (25) donde analizaron varios parámetros culturales tales como la temperatura, agitación, cantidad de sales y concentración de glucosa para encontrar las condiciones ideales para la síntesis de EPS por *H. almeriensis* M8T. Los resultados demostraron que los valores obtenidos a

diferentes concentraciones salinas y concentraciones de glucosa (0, 1, 2, 5%) no producían variaciones muy grandes en la producción de EPS; sin embargo los parámetros de temperatura y agitación fueron determinantes ya que el máximo valor se obtuvo a los 32°C, pero 22°C y 42°C, los rendimientos fueron bastante más bajos. De la misma manera, tanto la incubación estática y una velocidad de agitación orbital de 200 rpm dieron como resultado un menor crecimiento bacteriano y los rendimientos de polisacáridos inferiores.

De esta manera se puede determinar que la temperatura ideal para el crecimiento bacteriano y la producción de EPS para la bacteria nativa *Bacillus licheniformes* es de 37°C. A su vez se puede decir que, al ser estos microorganismos extremófilos, un cambio en sus condiciones de cultivo ideales genera una diferencia significativa con respecto a su crecimiento y a su rendimiento.



## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- PRIMERA.- Se aisló ocho diferentes cepas bacterianas halófilas nativas a partir de nueve diferentes muestras de agua extraídas de la Laguna de Salinas, las cuales consiguieron tener las características deseadas para la producción de EPS: colonias mucosas y cremosas. De estas cepas, tres fueron gram positivas y cinco gram negativas.
- SEGUNDA.- Se extrajo exopolisacáridos (EPS) de las bacterias aisladas en un rango de 4,03 a 48,45 mg/100 mL en el medio MY suplementado con sales al 7,5%, a 37°C por 5 días. La cepa que produjo más cantidad de EPS fue la denominada M3R1-A, con 48,45 mg/ 100 mL (0,184 mg EPS/ mg Biomasa).
- TERCERA.- Se realizó las pruebas bioquímicas a todas las cepas aisladas, de las cuales se identificó tentativamente cuatro como *Halomonas*, una como *Salinivibrio* y tres como *Bacillus*. Las pruebas de caracterización molecular con el gen 16s rRNA fueron realizadas únicamente a 2 cepas, las cuales fueron reportadas como *Halomonas sp.* en el caso de la bacteria gram negativa M2R1-B, y como *Bacillus licheniformes*, en el caso de la bacteria gram positiva M3R1-A.
- CUARTA .- Se determinó la actividad emulsificante de los EPS extraídos. El EPS de la cepa *Halomonas sp.* fue el que tuvo un porcentaje de emulsificación mayor con respecto a los demás EPS para la vaselina líquida (29,90%). Sin embargo para el aceite de soya los resultados con los EPS extraídos no pudieron ser cuantificados, debido a la cantidad ínfima de fase emulsionada.

QUINTA.- Se determinó el efecto de la temperatura en la producción de EPS para la cepa *Bacillus licheniformis*, donde al trabajar a 2 temperaturas de 30 y 42°C se obtuvieron cantidades mucho menores de EPS en comparación a los parámetros iniciales y se concluyó que la temperatura es un parámetro importante y determinante en la producción de EPS.



## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de curvas de crecimiento y parámetros óptimos como concentración de sales, concentración de glucosa y tiempo de incubación con el fin de determinar condiciones óptimas de las bacterias halófilas nativas identificadas en este trabajo.
- Determinar el peso molecular de los EPS extraídos.
- Realizar otros ensayos como capacidad de unión a metales y de propiedades reológicas para determinar más aplicaciones a los EPS extraídos.
- Realizar ensayos de emulsificación para otras fases oleosas.
- Realizar una caracterización molecular de las cepas nativas restantes.
- Determinar otro tipo de aplicaciones a las cepas halófilas nativas aisladas, como la producción de otros metabolitos de importancia.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Cabeza Benjumea S. El mercado de biotecnología en Estados Unidos de America. Instituto Español de Comercio Exterior. 2006.
2. Bermúdez Garcia JE. Investigación científica en el Perú: factor crítico de éxito para el desarrollo del país. Sinergia e Innovación. 2008;(02).
3. Naciones Unidas. Examen de las Políticas de Ciencia, Tecnología e Innovación - Perú. ; 2011.
4. Amjres H BVQEAJyLI. Aplicaciones del exopolisacárido producido por la cepa HK30 de Halomonas nitroreducens en la industria farmacéutica. ARS Pharmaceutica. 2010; Suplemento 3(51): p. 255-266.
5. Castillo-Carvajal L. BHB. Aplicaciones Biotecnológicas De Microorganismos Halófilos. Revista Sistemas Ambientales. 2011; 4(2): p. 45-54.
6. Mata-Gómez JA. Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger. Tesis Doctoral. 2006;: p. Universidad de Granada.
7. DasSarma S,AP. Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group / www.els.net. 2001.
8. Ventosa A. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. SGM symposium 66: Prokaryotic diversity – mechanisms and significance. 2006;: p. 223-253.
9. INRENA. Plan maestro de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca 2006-2011. Lima;: 2007.
10. Meseguer Soria I. los microorganismos halofilos y su potencial aplicado en biotecnología. Ciencia e Investigacion VII. 2004; 2.
11. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,

28. 2002;: p. 56–63.
12. Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In F. Rodríguez-Valera (ed.), *Halophilic bacteria*, vol. I. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1988;: p. 109–138.
13. González-Hernández JC, Peña A. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol.* 2002; 44(3-4): p. 137-156.
14. Ramirez N, Serrano JA, Sandoval H. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos Halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas.* 2006; 37(003): p. 56-71.
15. Ramirez N, Sandoval AH, Serrano JA. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 2004; 24(1-2).
16. Ventosa A, Nieto JaOA. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62(2): p. 504–544.
17. Moran A. *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications* Oxford: Elsevier; 2009.
18. Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. *Mar. Drugs.* 2010; 8: p. 1779-1802.
19. Ashok kuma M&c. Production and Characterization of Exopolysaccharides (EPS) from Biofilm Forming Marine Bacterium. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011; 54(2): p. 259-265.
20. Wingender J, Neu TR, Flemming HC. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure, and Function* Berlin: Springer; 1999.
21. Sutherland IW. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides* Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
22. Nichols CA, Guezennec J, Bowman JP. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Environments with Special Consideration of the Southern Ocean, Sea Ice, and Deep-Sea Hydrothermal Vents: A Review. *Marine Biotechnology.* 2005; 7(4): p.

- 253 - 271.
23. Singha TK. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications. *Journal of Pharmacy*. 2012; 2(2): p. 276-281.
  24. Béjar V, Llamas I, Calvo C, Quesada E. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *Journal of Biotechnology*. 1998;(61): p. 135–141.
  25. Llamas I, Amjres H, Mata J, Quesada EaBV. The Potential Biotechnological Applications of the Exopolysaccharide Produced by the Halophilic Bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules*. 2012; 17: p. 7103-7120.
  26. Nwodo UU, Green E, Okoh AI. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13: p. 14002-14015.
  27. Nichols CM, Lardiére SG, Bowman JP, Nichols PD, Gibson JAE, Guézennec J. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb. Ecol. Microbial Ecology*. 2005; 49(4).
  28. Junge K, Eicken H, Deming JW. Bacterial activity at  $-2$  to  $-20$  °C in Arctic wintertime sea ice. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004; 70: p. 550–557.
  29. Freitas F, Alves VD, Reis MAM. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. 2011 August; 29(8).
  30. Murray R. Harper Bioquímica Ilustrada. 17th ed. México: Manual Moderno; 2007.
  31. Arias S, Del Moral A, Ferrer MR, Tallon R, Quesada E, Béjar V. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles*. 2003; 7: p. 319–326.
  32. Orsod M, Joseph MaHF. Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Bacillus cereus* and *Brachy bacterium* sp. Isolated from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Journal of Microbiology*. 2012; 8(3): p. 170-174.
  33. Moraine RA,RP. Kinetics of polysaccharides B-1459 fermentation. *Biotechnol. Bioeng*. 1966; 8: p. 511-524.

34. PANREAC. Manual Básico de Microbiología. ; 2010.
35. Rodríguez-Valera F, Ruiz -Berraquero F, Ramos-Comezana. Characteristics of heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microbial Ecol.* 1981; 7: p. 235-243.
36. Narváez Terán V. Aislamiento e identificación de bacterias aerobias halófilas que manifiestan actividad proteolítica, procedentes de piscinas de sal de la industria ECUASAL localizadas en la provincia de Santa Elena. ; 2007.
37. Streeter JC, Peters NK, Salminen SO, Pladys D, Zhaohua aP. Fate of Nodule-Specific Polysaccharide Produced by *Bradyrhizobium japonicum* Bacteroids. *Plant Physiol.* 1995; 107: p. 857-864.
38. Bouchotroch S, Quesada E, Izquierdo I, Rodríguez M, Béjar V. Bacterial exopolisaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus *Halomonas*, isolated for hypersaline habitats in Morocco. *Journal for Industrial Microbiology & Biotechnology.* 2000; 24: p. 374-378.
39. Bhaskar P, Bhosle N. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environ Int.* 2006 ; 32(2): p. 191-198.
40. LABCONCO. A Guide to Freeze Drying for the Laboratory. Kansas City;; 2004.
41. Flores-Fernández M, Zavaleta A, Chávez-Hidalgo E. Bacterias Halotolerantes con Actividad Lipolítica Aisladas de las Salinas de Pilluana San Martín. *Ciencia e Investigación.* 2010; 13(2): p. 87-91.
42. Cooper D, Goldenberg B. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology.* 1987; 53(2): p. 224-229.
43. Llamas I, Mata J, Tallon R, Bressollier P, Urdaci M, Quesada EaBV. Characterization of the Exopolysaccharide Produced by *Salipiger mucosus* A3T, a Halophilic Species Belonging to the Alphaproteobacteria, Isolated on the Spanish Mediterranean Seaboard. *Mar. Drugs.* 2010; 8: p. 2240-2251.
44. Mata J, Béjar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, et al. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology* 157. 2006;: p. 827–835.

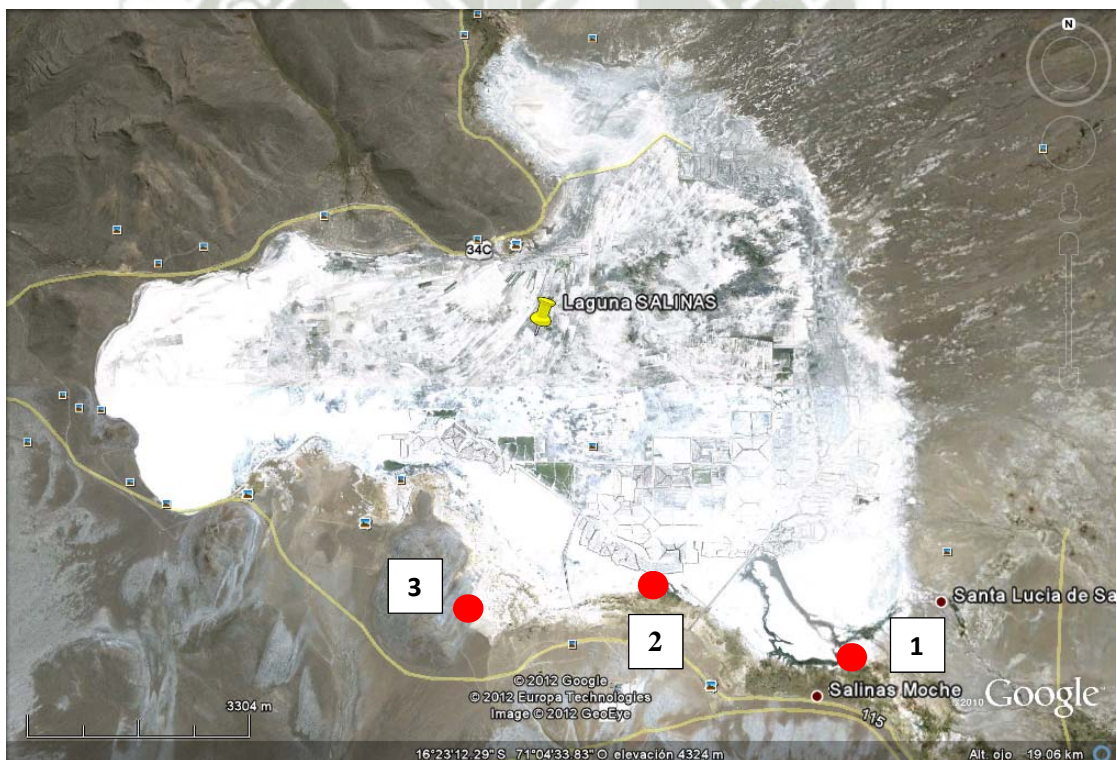
45. Ventosa A, Márquez M, Garabito M, Arahál D. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*. 1998; 2: p. 297-304.
46. Bachoon DS, Dustman W. *Microbiology Laboratory Manual*: Ed. Michael Stranz. Mason, OH: Cengage Learning; 2008.
47. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*. 2010; 31(8-9): p. 825-834.
48. Kalimutho M, Ramanathan T, Ahmad A, Ahmad AS. Taxonomical Identity and Polysaccharide Produced by *Bacillus* Species Isolated from Old Aged Medicinal Decoctions. *Journal of Sustainability Science and Management*. 2011; 6(1): p. 2-9.
49. Macrogen. Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas a través del servicio de secuenciación de genomas individuales de Macrogen. Seúl; 2009.
50. Spano Aac. A novel EPS-Producing Strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a Shallow Vent Off Panarea Island (Italy). *Curr Microbiol*. 2013.
51. Stefanović JR, col. &. Exopolysaccharides from *Bacillus licheniformis*: Production, partial characterization and emulsifying activity. *Microbiologia Balkanica* 2011. 2011.
52. Mata JA, Béjar V, Bressollier P, Tallon R, Urdaci MC, Llamas EQaI. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 105: p. 521-528.
53. Iyer A, Mody KaJB. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme Microb. Technol*. 2006; 38: p. 220-222.

## ANEXOS

### Anexo 1. Puntos de muestreo en la Laguna de Salinas.

Este anexo nos permite observar donde se hizo la recolección de muestras para el presente trabajo. Los puntos marcados (●) señalan los lugares de toma de muestra.

**Figura 20.** Localización de la Laguna de Salinas, Google Earth ®



## Anexo 2. Medio de cultivo TSI

### a) Preparación

Pesar 65g de medio TSI para 1000 mL de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

#### Fórmula (en gramos por litro)

Extracto de carne	3.0
Pluripeptona	20.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Glucosa	1.0
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar	13.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

### b) Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones  $Fe^{3+}$ , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

*c) Siembra e Incubación*

A partir de un cultivo puro, sembrar en TSI, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio. Incubar a 37°C durante 24 horas, en aerobiosis.

*d) Resultados*

1. Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
2. Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
3. Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
4. La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.



### Anexo 3.

#### Hidrólisis de gelatina

##### a) Preparación

Mezclar la gelatina con el agua destilada y dejar reposar durante 15 minutos. Calentar a ebullición, agregar los otros ingredientes y seguir calentando hasta que se disuelvan, sin sobrecalentar. Distribuir en tubos, esterilizar en autoclave. Enfriar en posición vertical.

##### Fórmula en gramos por litro

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Gelatina	120.0
pH final:	6.8-7.0

##### b) Fundamento

Los microorganismos productores de gelatinasa causan liquefacción. Esta propiedad varía con la cepa y con la temperatura de incubación. Es importante referirse a un tubo patrón sin inocular. Se debe tener en cuenta que a la temperatura de incubación, 37°C, la gelatina esta líquida, por lo tanto, es necesario enfriar para interpretar los resultados. Algunos microorganismos se deben incubar por mas de 48 horas.

##### c) Siembra e incubación

A partir de un cultivo puro, sembrar en medio Gelatina, picando en el fondo y hasta la superficie del medio. Incubar a 37°C durante 48 horas, en aerobiosis.

##### a) Resultados

Si la gelatina esta líquida luego de enfriar los tubos, significara que la cepa hidroliza la gelatina.

## Hidrólisis de almidón

### a) Preparación

Disolver los ingredientes en agua destilada, llevar a ebullición agitando regularmente, calentar 3-4 minutos hasta disolución. Enfriar a 50-60°C. Esterilizar en autoclave. Distribuir en placas Petri.

#### Formula en gramos por litro

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Almidon soluble	2.0
Agar-agar	15.0

### b) Fundamento

Este medio se utiliza para identificar microorganismos que degradan el almidón. La hidrólisis del almidón se evidencia cubriendo la placa con una solución de lugol (I2-KI). Se forma un complejo color azul con el almidón, ausente en las zonas donde hubo hidrólisis. Si las colonias son almidón positivas, aparece un halo transparente alrededor de las mismas.

### c) Siembra e inoculación

Inocular en puntos equidistantes de la superficie de las placas (tocando suavemente con el asa un punto de dicha superficie) con las bacterias de prueba. Incubar a 37°C durante 24-48 horas.

#### Anexo 4. Medio SIM

##### a) Preparación

Pesar 20g de medio SIM para 1000 mL de agua destilada. Mezclar hasta disolver; calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.

##### Fórmula (en gramos por litro)

Tripteína	20.0
Peptona	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
pH final: 7.3 ± 0.2	

##### b) Fundamento

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovacs, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

##### c) Siembra e incubación

A partir de un cultivo de 18-24 horas en medio sólido, sembrar por punción profunda con aguja de inoculación recta (no usar ansa con anillo). Se debe inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la

superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta. Incubar durante 24 horas, a 37°C, en aerobiosis. Luego de la incubación, agregar 3-5 gotas de reactivo de Kovacs.

*d) Resultados*

- **Cepas móviles:** producen turbidez del medio, que se extiende mas allá de la línea de siembra.
- **Cepas inmóviles:** el crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.
- **Cepas SH<sub>2</sub> positivas:** ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.
- **Cepas SH<sub>2</sub> negativas:** el medio permanece sin cambio de color.
- **Cepas indol positivas:** desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovacs
- **Cepas indol negativas:** sin cambio de color.



## Anexo 5. Caldo Tioglicolato

### a) Preparación

Pesar 29 g de caldo tioglicolato en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar a ebullición hasta disolución total. Distribuir en tubos con tapa y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### Fórmula (en gramos por litro)

Tripteína	17.0
Peptona de soya	3.0
Glucosa	6.0
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
Agar	0.7
L-cistina	0.25
Sulfito de sodio	0.1

pH final:  $7.0 \pm 0.2$

### b) Fundamento

El medio de cultivo, tiene por sus componentes la calidad nutricional del caldo tripteína soya. Este permite el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos los nutricionalmente exigentes. Además, se observa que las bacterias estrictamente aerobias, crecen en la parte superior, mientras que las anaerobias facultativas o anaerobias estrictas crecen en las profundidades del medio. Las sustancias reductoras como tioglicolato de sodio y cisteína proporcionan una anaerobiosis suficiente y debido a los grupos -SH- de estos compuestos, se neutralizan los efectos bacteriostáticos de los derivados mercuriales, arsenicales y de otros metales pesados. La presencia de una baja cantidad de agar, retarda la dispersión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Debido a todas estas características desarrollan microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos

*c) Siembra e incubación*

- Muestras líquidas: agregar 1 o 2 gotas de la muestra a tubos conteniendo medio de cultivo.
- Tejidos y otras muestras sólidas: macerar en caldo estéril. Luego sembrar de la misma manera que para muestras líquidas.
- Hisopos: insertarlos en el medio de cultivo, luego de haber sembrado el medio sólido apropiado.

Para el cultivo de anaerobios, antes de sembrar, eliminar el oxígeno presente, mediante el hervido de los tubos con las tapas flojas, y luego enfriarlos a temperatura ambiente con las tapas bien cerradas.

El tiempo, temperatura y condiciones de incubación dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

- Microorganismos de fácil crecimiento: a 37°C durante 24 horas.
- Microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales: a 37°C hasta 7 días.

*d) Resultados*

El crecimiento microbiano se observa por turbidez.

- Microorganismos aerobios estrictos: crecen en la parte superior del medio de cultivo.
- Microorganismos anaerobios facultativos: crecen en todo el medio de cultivo.
- Microorganismos anaerobios estrictos: crecen en las profundidades del medio de cultivo.

**Anexo 6. Caldo nitrato.***a) Preparación*

Pesar 9 g de caldo nitrato para 1000 mL de agua destilada. Disolver y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

**Formula en gramos por litro**

<i>Extracto de carne</i>	3,0
<i>Peptona</i>	5,0
<i>Nitrato de potasio</i>	1,0

pH 7

Solución A

<i>Ácido sulfanílico</i>	8,0 g
<i>Ácido acético 5N</i>	1000,0 mL

Solución B

<i><math>\alpha</math>-Naftol</i>	5,0 g
<i>Ácido acético 5N</i>	1000,0 mL

*b) Fundamento*

En esta prueba se detecta una respiración anaerobia: la que utiliza nitrato como aceptor final de electrones. Los nitratos se reducen a nitritos y algunas bacterias reducen los nitritos a productos gaseosos ( $N_2$  y  $N_2O$ ). Las enzimas responsables de ambas reducciones se denominan nitrato y nitrito reductasa, respectivamente.

*c) Siembra e inoculación*

Con el asa de kohl transfiera al medio una porción de cultivo puro. Incubar a 37°C por 12 a 24 horas.

*d) Resultados*

Para determinar si el nitrato ha sido reducido a nitrito, después de la incubación, añádale al medio de cultivo, 2 gotas de solución A, y luego 2 gotas de la solución B del reactivo de Griess y mezcle. La aparición de una coloración rosada o roja indica que los nitratos han sido reducidos a nitritos.





## Anexo 7. Agar Manitol Salado

### a) Preparación

Pesar 108 g de polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos. Distribuir en placas Petri.

#### Fórmula (en gramos por litro)

Extracto de carne	1.0
Pluripeptona	10.0
d-Manitol	10.0
Cloruro de sodio	75.0
Agar	15.0
Rojo de fenol	0.025

pH final:  $7.4 \pm 0.2$

### b) Fundamento

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas, se repicarán en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles, posteriormente, la prueba de la coagulasa.

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Los estafilococos que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

#### *c) Siembra e Inoculación*

Sembrar en superficie un inóculo denso de la muestra incubar durante 24-48 horas a 37°C, en aerobiosis.

#### *d) Resultados*

- Microorganismos fermentadores de manitol: colonias de color amarillo rodeadas o no de un halo amarillo.
- Microorganismos no fermentadores de manitol: colonias del color del medio, rojas rodeadas o no de halo rojizo-púrpura.

## Anexo 8. Prueba de oxidasa

### a) *Fundamento*

Los discos contienen oxalato de dimetil-para-fenilendiamina, el cual es el sustrato de la enzima oxidasa.

Los microorganismos que producen la enzima oxidasa se evidencian porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo c, se oxida el sustrato presente en los discos a un compuesto de color rojo-fucsia.

### b) *Metodología*

**Siembra:** En portaobjetos: humedecer el disco de OX con una gota de agua y luego colocar sobre él la colonia en estudio.

**Incubación:** Generalmente dentro del minuto, y a temperatura ambiente se detectan los resultados positivos. Una reacción lenta, pasado los 2 minutos, debe considerarse negativa.

### c) *Resultados*

Positivo: observación de color rojo-fucsia en el disco y/o solución.

Negativo: el disco permanece sin cambio de color.

### d) *Limitaciones*

- La prueba debe realizarse utilizando cultivos frescos (18-24 horas), y que no provengan de medios con azúcares con pH ácido, por eso se usan cultivos en Agar Sangre.

## **Anexo 9. Protocolo del Kit Wizard Genomic Dna Purification (Promega)**

### *Pellet celular:*

Agregar 1mL de cultivo de 12 – 20 horas a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

#### *A. Para bacterias gram positivas:*

1. Suspender las células en 480µl de EDTA 50Mm.
2. Agregar 120 uL de lisozima.
3. Incubar a 37°C por 30-60 minutos.
4. Centrifugar por 2 minutos a 13 000- 16 000 rpm y remover el sobrenadante.
5. Seguir con el paso 1 de Lisis Celular.

#### *B. Para bacterias Gram Negativas*

1. Seguir con el paso 1 de Lisis Celular

### *Lisis celular*

1. Agregar 600 uL de solución de lisis nucleica. Pipetear sucesivamente hasta resuspender las células.
2. Incubar a 80°C por 5 minutos para lisar las células, enfriar a temperatura ambiente.
3. Agregar 3 uL de la solución de RNAsa a las células lisadas. Mezclar por inversión de 2 a 5 veces. Incubar a 37°C por 15 – 60 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

### *Precipitación Proteica*

4. Agregar 200 uL de la solución de precipitación de proteínas. Agitar vigorosamente en el vortex por 20 segundos.
5. Incubar en hielo por 5 minutos.
6. Centrifugar de 13000 a 16000 rpm por 3 minutos.

*Precipitación del ADN y Rehidratación*

7. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN a un nuevo tubo conteniendo 600 uL de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar por inversión hasta que se note una masa de ADN visible semejante a un hilo.
8. Centrifugar de 13000 a 16000 rpm por 2 minutos. Decantar el sobrenadante con cuidado, dejar escurrir sobre papel adsorbente.
9. Agregar 600 uL de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invertir para lavar el pellet de ADN.
10. Centrifugar de 13000 a 16000 rpm por 2 minutos.
11. Aspirar cuidadosamente el etanol. Escurrir el tubo en un papel absorbente, dejar secar de 10 a 15 minutos.
12. Agregar 100 uL de solución rehidratante de ADN y rehidratar incubando a 65°C por 1 hora o a temperatura ambiente toda la noche. Mezclar la solución periódicamente.
13. Almacenar el ADN entre 2 – 8 °C.

### Anexo 10. Medida de la salinidad de las muestras recolectadas

Este anexo muestra los datos de salinidad medidos por el multiparametro HANNA para cada una de las muestras tomadas de la Laguna de Salinas.

**Tabla 17.** Datos de Salinidad para las muestras de agua obtenidas.

<b>Muestra</b>	<b>Salinidad, g/L</b>
<b>M1R1</b>	9.48 ± 0.19
<b>M1R2</b>	9.53 ± 0.19
<b>M1R3</b>	9.48 ± 0.19
<b>M2R1</b>	9.55 ± 0.19
<b>M2R2</b>	9.54 ± 0.19
<b>M2R3</b>	9.60 ± 0.19
<b>M3R1</b>	9.64 ± 0.19
<b>M3R2</b>	9.57 ± 0.19
<b>M3R3</b>	9.54 ± 0.19

### Anexo 11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevo a cabo tal como se explica en el apartado 3.2.9. de Materiales y Metodos

**Tabla 18.** Resumen Estadístico de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo

	1	2	3	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
<b>MIR3-B</b>	30.2	27.6	33.8	3	30.5333	3.11341	10.1968%	27.6	33.8	6.2
<b>M2R1*A</b>	12	32.7	33.1	3	25.9333	12.0683	46.5358%	12.0	33.1	21.1
<b>M2R1*B</b>	44.3	45	45.9	3	45.0667	0.802081	1.77976%	44.3	45.9	1.6
<b>M2R1-B</b>	47.1	39.4	40.9	3	42.4667	4.08207	9.61242%	39.4	47.1	7.7
<b>M3R1*A</b>	3.1	3.8	5.2	3	4.03333	1.06927	26.5108%	3.1	5.2	2.1
<b>M3R1-A</b>	46.5	50.4		2	48.45	2.75772	5.69188%	46.5	50.4	3.9
<b>M3R2</b>	15.3	8.9	8.4	3	10.8667	3.84751	35.4065%	8.4	15.3	6.9
<b>M3R2*A</b>	11.2	16.4	13.3	3	13.6333	2.61598	19.1881%	11.2	16.4	5.2
<b>Total</b>				23	26.7174	16.4508	61.5734%	3.1	50.4	47.3

**Tabla 19.** ANOVA de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5555.36	7	793.623	29.88	0.0000
Intra grupos	398.472	15	26.5648		
Total (Corr.)	5953.83	22			

**Tabla 20.** Resumen Estadístico de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo

	1	2	3	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
<b>M1R3-B</b>	363.7	327.9	392.5	3	361.367	32.3631	8.95576%	327.9	392.5	64.6
<b>M2R1*A</b>	428.8	427	548.8	3	468.2	69.8074	14.9097%	427.0	548.8	121.8
<b>M2R1*B</b>	194.5	219.9	263.9	3	226.1	35.113	15.5298%	194.5	263.9	69.4
<b>M2R1-B</b>	306.1	456.5	308.6	3	357.067	86.1209	24.119%	306.1	456.5	150.4
<b>M3R1*A</b>	269.4	240.2	289.5	3	266.367	24.7896	9.30656%	240.2	289.5	49.3
<b>M3R1-A</b>	413.1	397.4	410.9	3	407.133	8.50078	2.08796%	397.4	413.1	15.7
<b>M3R2</b>	346	354.9	340.1	3	347.0	7.4505	2.14712%	340.1	354.9	14.8
<b>M3R2*A</b>	318.5	314.9	290.9	3	308.1	15.004	4.86985%	290.9	318.5	27.6
<b>Total</b>				24	342.667	81.9224	23.9073%	194.5	548.8	354.3

**Tabla 21.** ANOVA de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	123284.	7	17612.0	9.07	0.0001
Intra grupos	31075.2	16	1942.2		
Total (Corr.)	154359.	23			



Tabla 22. Resumen Estadístico de la Productividad de mgEPS/mg Biomasa

	1	2	3	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
M1R3-B	0.083	0.0824	0.0861	3	0.0844333	0.00156312	1.8513%	0.083	0.0861	0.0031
M2R1*A	0.028	0.0766	0.0603	3	0.0549667	0.0247351	45.0001%	0.028	0.0766	0.0486
M2R1*B	0.2278	0.2046	0.1739	3	0.2021	0.0270368	13.3779%	0.1739	0.2278	0.0539
M2R1-B	0.1539	0.0863	0.1325	3	0.124233	0.0345499	27.8105%	0.0863	0.1539	0.0676
M3R1*A	0.1936	0.1741		2	0.18385	0.0137886	7.49991%	0.1741	0.1936	0.0195
M3R1-A	0.0075	0.0096	0.0127	3	0.0099333	0.00261598	26.3353%	0.0075	0.0127	0.0052
M3R2	0.0442	0.0251	0.0247	3	0.0313333	0.0111447	35.568%	0.0247	0.0442	0.0195
M3R2*A	0.0352	0.0521	0.0457	3	0.0443333	0.00853249	19.2462%	0.0352	0.0521	0.0169
Total				23	0.0879	0.068753	78.2173%	0.0075	0.2278	0.2203

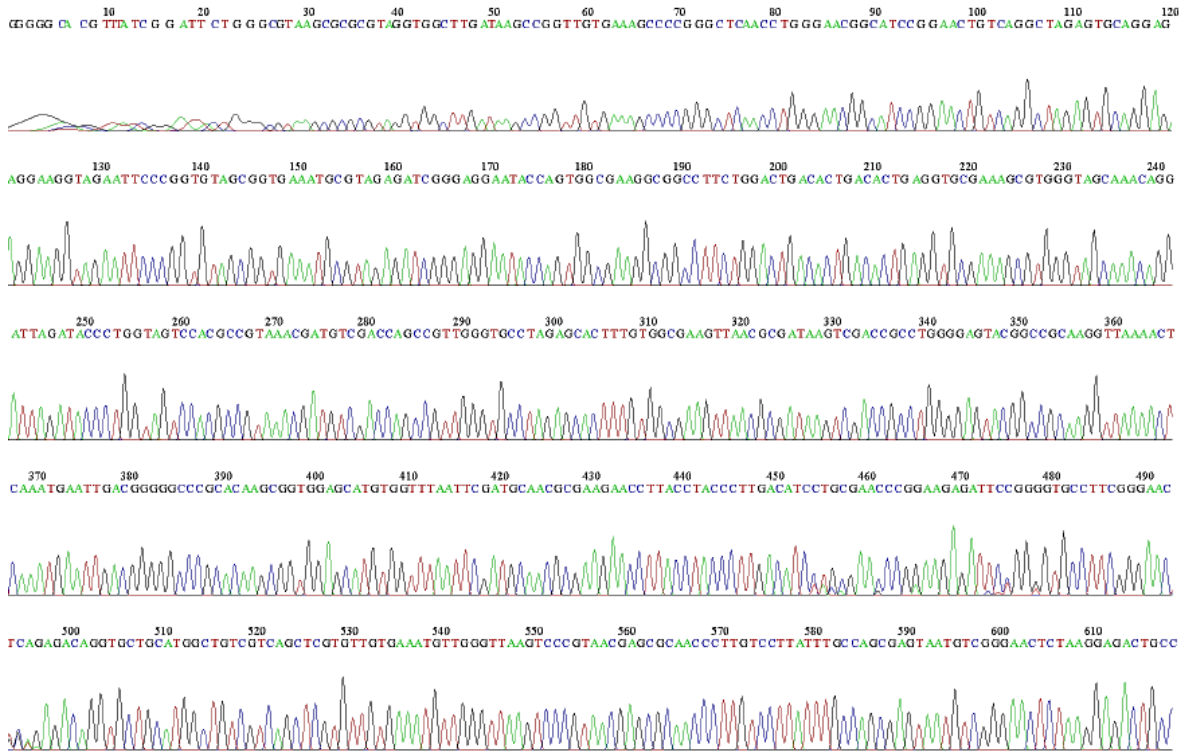
Tabla 23. ANOVA Productividad de mgEPS/mg Biomasa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0983179	7	0.0140454	37.12	0.0000
Intra grupos	0.00567573	15	0.000378382		
Total (Corr.)	0.103994	22			

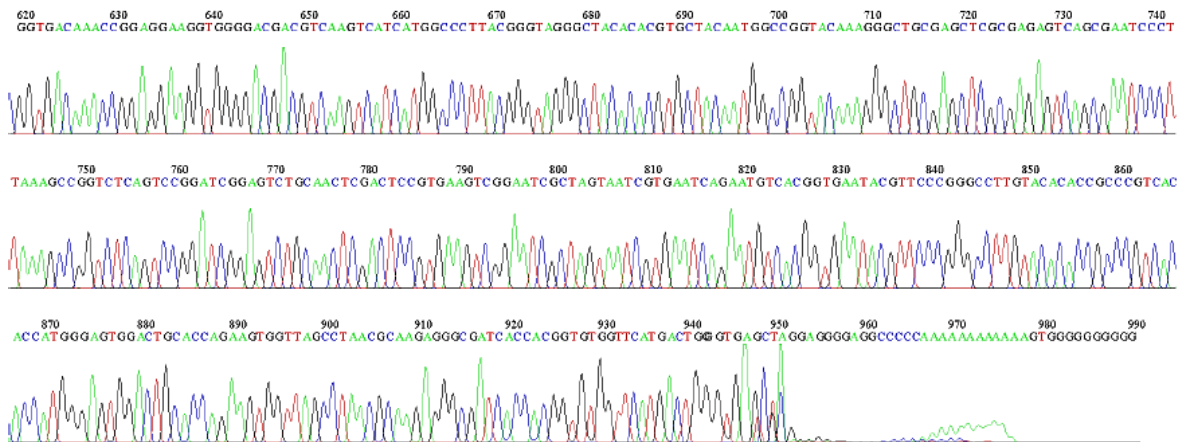
## Anexo 12. Electroferograma de la región 16S de rRNA de la cepa M2R1-B

### Primer 518F

File: CPD\_2\_minus\_518F.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:4497 A:3407 C:3741 T:2272  
Sample: CPD\_2\_minus\_518F Lane: 72 Base spacing: 15.588035 990 bases in 11955 scans Page 1 of 2

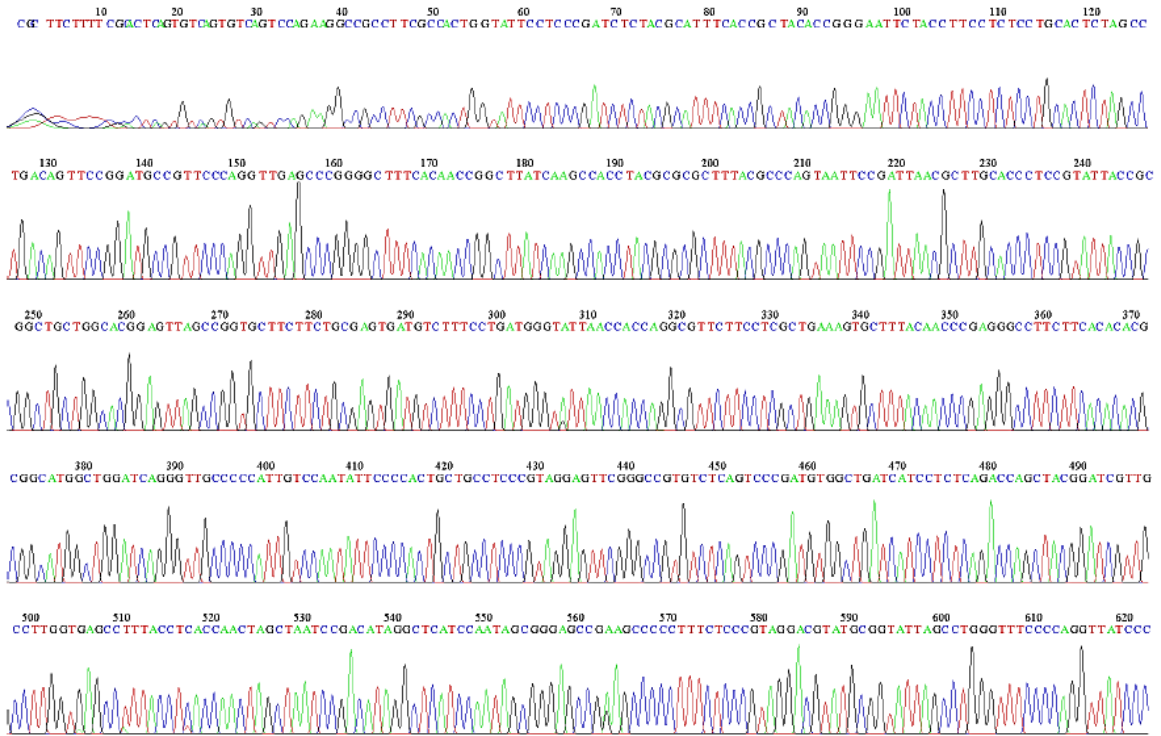


File: CPD\_2\_minus\_518F.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:4497 A:3407 C:3741 T:2272  
Sample: CPD\_2\_minus\_518F Lane: 72 Base spacing: 15.588035 990 bases in 11955 scans Page 2 of 2

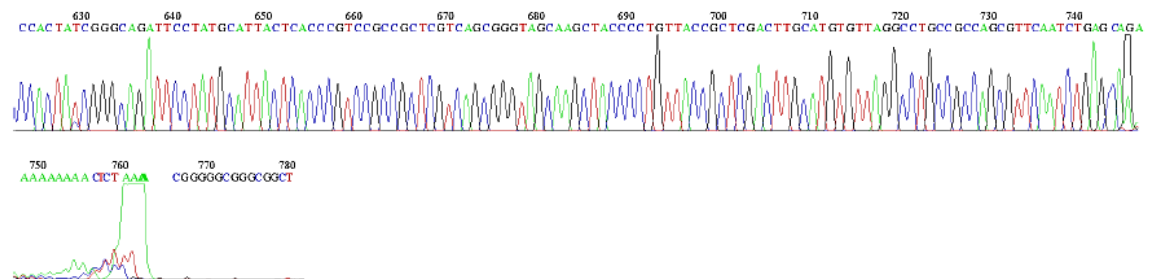


Primer 800F

File: CPD\_2\_minus\_800R.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:3101 A:2258 C:3849 T:2366  
Sample: CPD\_2\_minus\_800R Lane: 70 Base spacing: 15.636991 781 bases in 9386 scans Page 1 of 2



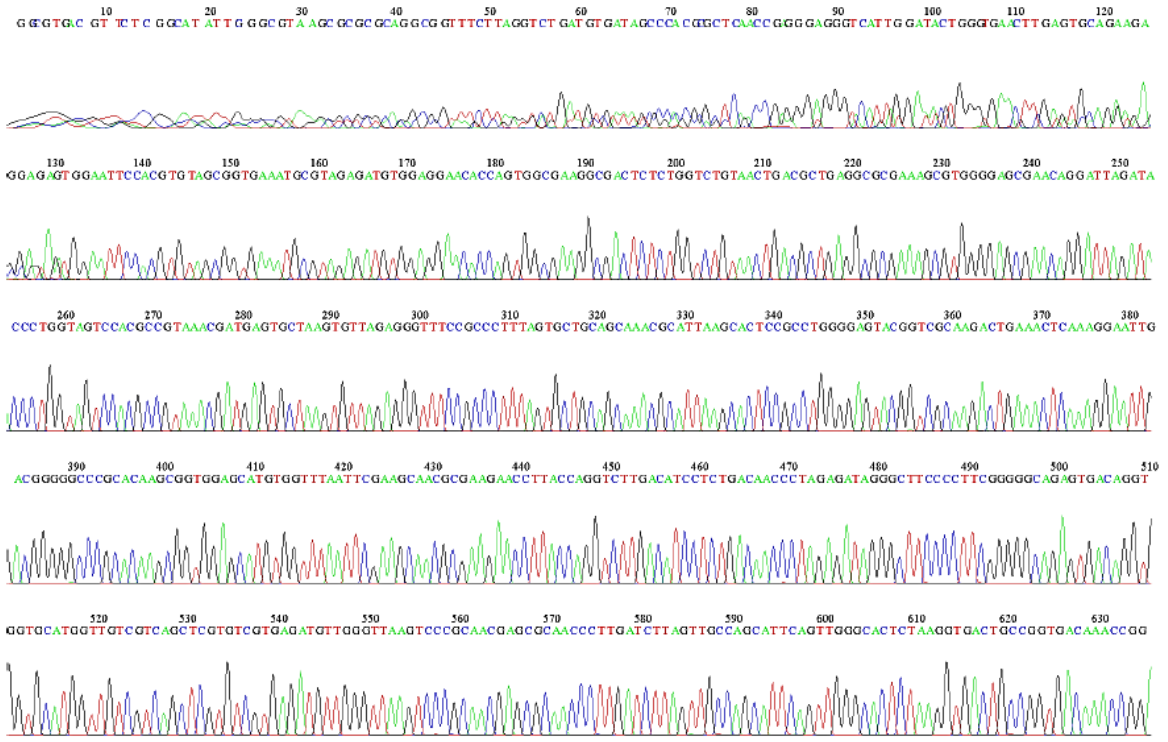
File: CPD\_2\_minus\_800R.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:3101 A:2258 C:3849 T:2366  
Sample: CPD\_2\_minus\_800R Lane: 70 Base spacing: 15.636991 781 bases in 9386 scans Page 2 of 2



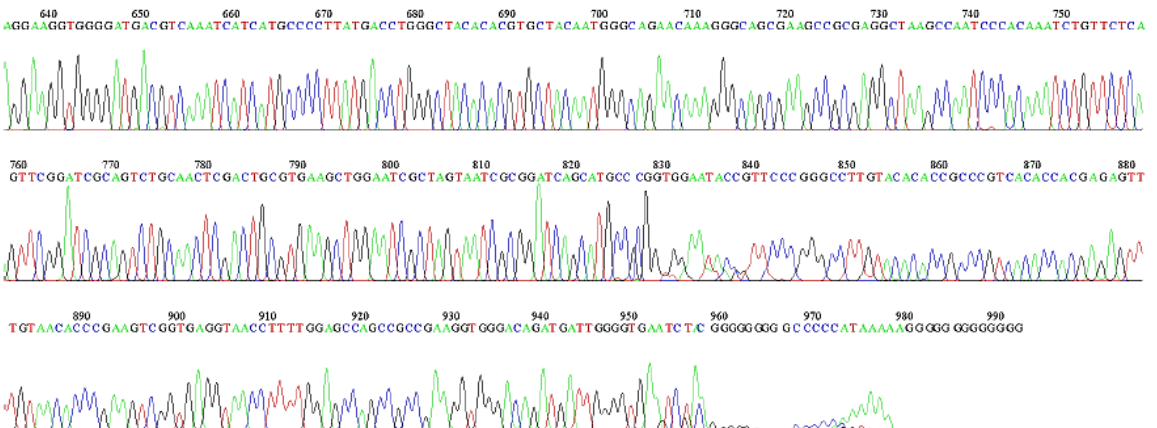
### Anexo 13. Electroferograma de la región 16S de rRNA de la cepa M3R1-A

#### Primer 518F

File: CPD\_3\_plus\_518F.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:3020 A:2351 C:2439 T:1537  
Sample: CPD\_3\_plus\_518F Lane: 68 Base spacing: 15.551947 993 bases in 11847 scans Page 1 of 2

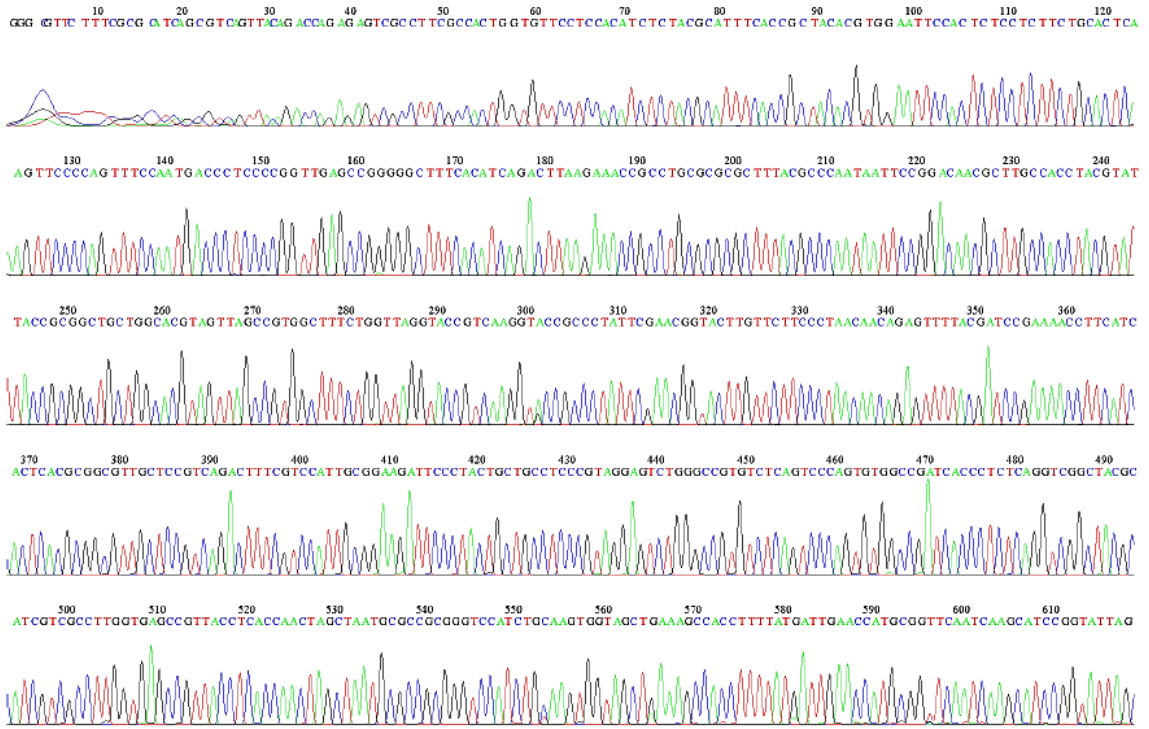


File: CPD\_3\_plus\_518F.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:3020 A:2351 C:2439 T:1537  
Sample: CPD\_3\_plus\_518F Lane: 68 Base spacing: 15.551947 993 bases in 11847 scans Page 2 of 2

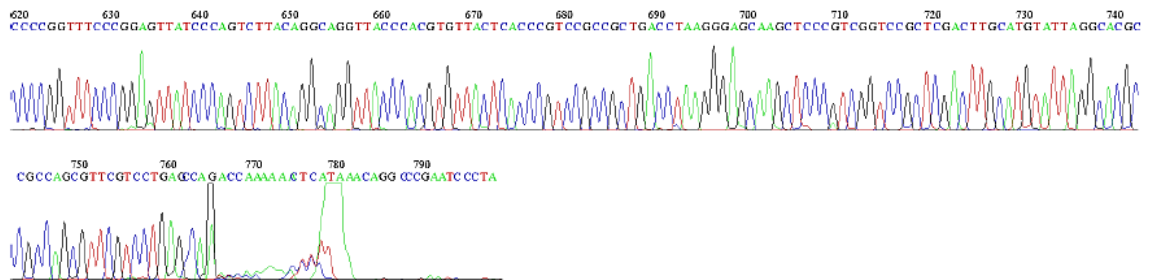


Primer 800F

File: CPD\_3\_plus\_800R.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:1477 A:1182 C:2017 T:1134  
Sample: CPD\_3\_plus\_800R Lane: 66 Base spacing: 15.633996 799 bases in 9653 scans Page 1 of 2



File: CPD\_3\_plus\_800R.ab1 Run Ended: 2013/11/21 0:37:39 Signal G:1477 A:1182 C:2017 T:1134  
Sample: CPD\_3\_plus\_800R Lane: 66 Base spacing: 15.633996 799 bases in 9653 scans Page 2 of 2



Anexo 14. Análisis estadístico de la optimización

Tabla 24. Resumen Estadístico de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo

	1	2	3	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
42°C	12	19	18.4	3	16.4667	3.87986	23.5619%	12.0	19.0	7.0
30°C	15.9	24.6	17.6	3	19.3667	4.61122	23.8101%	15.9	24.6	8.7
<b>Total</b>				6	17.9167	4.12912	23.0463%	12.0	24.6	12.6

Tabla 25. ANOVA de la Cantidad de EPS por 100 mL de Medio de Cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12.615	1	12.615	0.69	0.4514
Intra grupos	72.6333	4	18.1583		
Total (Corr.)	85.2483	5			

**Tabla 26.** Resumen Estadístico de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo

	1	2	3	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
<b>30°C</b>	176.8	147.6	115	3	146.467	30.9156	21.1076%	115.0	176.8	61.8
<b>40°C</b>	134.3	165.6	111.4	3	137.1	27.2083	19.8456%	111.4	165.6	54.2
<b>Total</b>				6	141.783	26.547	18.7237%	111.4	176.8	65.4

**Tabla 27.** ANOVA de la Cantidad de Biomasa por 100 mL de Medio de Cultivo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>Entre grupos</b>	131.602	1	131.602	0.16	0.7137
<b>Intra grupos</b>	3392.13	4	848.032		
<b>Total (Corr.)</b>	3523.73	5			

**Tabla 28.** Resumen Estadístico de la Productividad de mgEPS/mg Biomasa

	1	2	3	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
<b>42°C</b>	0.0894	0.1147	0.1652	3	0.1231	0.0385918	31.35%	0.0894	0.1652	0.0758
<b>30°C</b>	0.0899	0.1667	0.153	3	0.136533	0.0409625	30.0018%	0.0899	0.1667	0.0768
<b>Total</b>				6	0.129817	0.0363461	27.998%	0.0894	0.1667	0.0773

**Tabla 29.** ANOVA de la Productividad de mgEPS/mg Biomás

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Entre grupos</b>	0.000270682	1	0.000270682	0.17	0.7005
<b>Intra grupos</b>	0.00633451	4	0.00158363		
<b>Total (Corr.)</b>	0.00660519	5			