

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DE CONSORCIOS MICROBIANOS ANAEROBIOS EXTREMÓFILOS EN  
RELACIÓN A SU POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE PROTEASAS Y AMILASAS  
COLECTADOS DE GEISERS UBICADOS EN EL PARQUE NACIONAL SAJAMA,  
DEPARTAMENTO DE ORURO, BOLIVIA.**



**Realizada por:**

Raquel Ines, Rosa Cordero

(Tesis de Grado realizada para optar al grado de licenciatura en Bioquímica)

**Tutores:**

María Teresa Alvarez Aliaga Ph.D.

Enrique Terrazas Siles Ph.D.

La Paz – Bolivia

2011

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Dios, por darme vida, salud y la fuerza suficiente para llegar a este momento, por permitir que este trabajo sea realizado, concluido exitosamente y mi ingreso a la institución que me acoge. Por entregarme a la familia que tengo como apoyo.

A mi mamá por estar en todo momento conmigo, por darme el aliento y la fuerza necesaria cuando ya no podía más, por escucharme y alentarme en todo momento.

A mi familia, por todo el apoyo recibido, mi papá y mis hermanos.

A mi tía Marthita, mis primos, Ángel y Camilo, siempre su apoyo, aliento y buena energía está presente conmigo.

A mis tías, Charo, Ivonne y María del Carmen, que a pesar de la distancia siempre estuvieron apoyándome.

A la Dra. Teresa Alvarez Aliaga y al Dr. Enrique Terrazas Siles, por toda la enseñanza, el apoyo y la dirección brindada a lo largo de este proyecto, antes y después del mismo.

A la Agencia de Cooperación Sueca ASDI-SAREC por todo el apoyo brindado, por el material invertido dentro del marco del proyecto Biodiversidad Microbiana, dentro del cual se encuentra enmarcado el presente.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas y a todo el equipo de trabajo que conforma el mismo, por todo el aporte intelectual, de infraestructura y equipamiento brindado para la elaboración del proyecto.

A José Luís Choquehuanca, por toda la ayuda recibida.

A Iván, Fabiola y Crispín por toda la amistad recibida a lo largo del tiempo que nos conocemos y por los aportes personales e intelectuales.

A Rafael Crovo, por todo el cariño, apoyo y el aliento recibido desde que lo conocí.

A todos mis amigos, formaron un papel realmente importante en la elaboración del proyecto, sé que si los nombro a todos, las hojas no alcanzarían, ustedes saben quienes son, gracias por el cariño impreso a lo largo de este periodo y a lo largo de mi vida.

*A mi mami;  
Silvia Yolanda Cordero Llanos,  
por ser mi fuerza cada  
día de mi vida y  
por entregarme la suya desde  
mi llegada a este mundo.*

*A mi querido Abuelito;  
Zoilo Efraín Cordero Videa  
que desde el cielo me cuida.*

## RESUMEN

El estudio de enzimas extremófilas es importante para la biotecnología industrial debido a que tienen propiedades de resistencia a altas y bajas temperaturas, solventes orgánicos y pH's extremos. Las amilasas y proteasas tienen muchas aplicaciones industriales especialmente en la industria de los detergentes, industria de alimentos, industria del cuero y biorremediación de suelos y aguas contaminadas. Los microorganismos extremófilos producen más de 55 proteínas extracelulares, muchas de ellas con aplicación industrial.

En el presente trabajo se realizó la colecta de muestras de consorcios microbianos extremófilos, con características halófilas y termófilas; de geisers ubicados en el Parque Nacional Sajama, departamento de Oruro, Bolivia. Se realizó un cultivo primario, selectivo para microorganismos que producen amilasas y proteasas. Se realizaron curvas de Biomasa Microbiana Vs. Actividad Enzimática de 14 consorcios productores de Amilasas y Proteasas, seleccionando al mejor consorcio productor de enzima, se realizó la optimización del medio de cultivo con ayuda de diseños factoriales, los cuales presentan dos variables independientes: pH y concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) y como variable independiente la Actividad Enzimática (Proteasa o Amilasa). Finalizando con la identificación molecular de los consorcios seleccionados.

Se seleccionó un consorcio con alta producción de amilasas, HMA-2, que además produce biofilm, realizando la optimización del medio de cultivo, siendo estadísticamente significativa la modificación del pH a un valor de 11 para la producción enzimática, presentando también un cambio en la conformación del biofilm a ese pH. Se realizó la identificación molecular del consorcio, por el método de Hibridación Fluorescente *in situ* estando el compuesto de microorganismos del grupo de las bacterias sulfato-reductoras y presumiblemente la presencia de Arqueas.

Para el consorcio productor de proteasas, E-1p dilución  $10^{-4}$ , se realizó el diseño factorial siendo estadísticamente significativa la interacción de las dos variables independientes, llegando a obtener una Actividad Proteolítica de 13.908 UI/mL, siendo ésta vez 6 veces mayor que la máxima actividad del consorcio inicial. Se realizó la identificación molecular del mismo, por el método de Hibridación Fluorescente *in situ* estando el consorcio compuesto microorganismos del grupo de las bacterias sulfato-reductoras y presumiblemente Arqueas metanogénicas.

## ABSTRACT

The study of extremophile enzymes is important for the industrial biotechnology because they have resistant properties to high and low temperatures, organic solvents and extreme pH. Amilases and proteases have important applications, like detergent industry, aliments, leather and soils and water bioremediation.

In this work, the samples were collected from extremophile environments, with halophile and thermophile characteristics, from geisers on Sajama National Park, Oruro, Bolivia. A primary culture has been realized, selective for microorganisms that produce amilases and proteases. It has been realized graphics for Biomass Vs. Enzimatic Activity to 14 consortia that produce Amilases and Proteases respectively, one consortia has been selected in each case. The culture media was optimized with a factorial-design analysis, with two independent variables: pH and sodium clorure concentration (NaCl). Finalizing with the molecular identification of the selected consortia.

We select a consortia producer of amylases, HMA-2, this also to present a high enzymatic – biofilm production. We did the optimization of the culture medium being relevant the 11 pH for the enzymatic-production, we also witness a change in the conformation of the Biofilm at this pH. We made the molecular identification using the method of Fluorescence *in situ* hybridization being the consortia made of sulfate-reducing bacteria guessing also the presence of *Archea*.

For the consortia producer of Protease, E-1p  $10^{-4}$  dilution, we made the factorial-design being relevant the interaction of the two independent variables, achieving a Proteolytic activity of 13.908 UI/mL, being this 6 times greater than the maximum activity of the original consortia. We made the molecular identification using the method of Fluorescence *in situ* hybridization being the consortia sulfate-reducing bacteria and guessing also the presence of methanogenic *Archea*.

## Índice

	<b>Pág.</b>
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Justificación.....	4
4. Objetivos	
4.1 Objetivo General.....	5
4.2 Objetivos Específicos.....	5
5. Marco Teórico	
5.1 Microorganismos extremófilos.....	6
5.2 Metabolismo Anaeróbico.....	7
5.3 Microorganismos Termófilos e Hipertermófilos.....	9
5.3.1 Estabilidad de las macromoléculas de los Termófilos e Hipertermófilos .....	9
5.4 Microorganismos Halófilos.....	12
5.5 Extremozimas.....	13
5.5.1 Enzimas Amilolíticas.....	15
5.5.2 Enzimas Proteolíticas (E.C. 3:4).....	18
5.6 Formación de Biofilms Microbianos.....	21
5.7 Medida del crecimiento bacteriano, método indirecto por medida de la turbidez.....	22
5.8 Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	23
6. Materiales y Métodos	
6.1 Colección de las muestras.....	28
6.2 Métodos de Aislamiento bacteriano.....	28
6.3 Determinación de la Biomasa Microbiana.....	29
6.4 Métodos Analíticos.....	30
6.4.1 Determinación de Actividad Amilasa.....	30
6.4.2 Determinación de Actividad Proteasa.....	31
6.5 Métodos Moleculares.....	33
6.5.1 Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	33
6.5.1.1 Preparación de la muestra.....	33
6.5.1.2 Aplicación de la muestra a los portaobjetos y deshidratación.....	34
6.5.1.3 Hibridación de las sondas.....	34
6.5.1.4 Lavado.....	35
6.5.1.5 Montaje de los portaobjetos.....	37
6.5.1.6 Vista al microscopio de los portaobjetos.....	37

7. Resultados y Discusión.....	38
7.1 Colección de las Muestras.....	38
7.2 Aislamiento Microbiano.....	41
7.3 Determinación de Biomasa Microbiana Vs. Actividad Enzimática....	42
7.3.1 Consorcios Productores de Amilasas.....	42
7.3.2 Consorcios Productores de Proteasas.....	45
7.4 Diseño Factorial.....	49
7.4.1 Consorcio HMA-2 productor de Amilasas.....	49
7.4.2 Consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ productor de Proteasas.....	53
7.4.2.1 Primer Diseño Factorial.....	53
7.4.2.2 Segundo Diseño Factorial.....	58
7.5 Identificación de consorcios productores de Amilasas y Proteasas por Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> .....	60
8. Conclusiones.....	69
9. Recomendaciones.....	71
10. Referecias Bibliográficas.....	73
ANEXOS.....	76

### Índice de Gráficos

	Pág.
<b>Gráfico 1.</b> Cadenas anaeróbicas alimenticias.....	8
<b>Gráfico 2.</b> Enlace tipo éter que se encuentra en los lípidos de <i>Archaea</i> , y el Isopreno, el precursor de las cadenas laterales hidrofóbicas(R) de los lípidos de las <i>Archaea</i> , en bacterias y eucariotas R son ácidos grasos.....	11
<b>Gráfico 3.</b> Principales lípidos de <i>Archaea</i> y la estructura de sus membranas.....	11
<b>Gráfico 4.</b> Lugar de Acción de las Amilasas.....	17
<b>Gráfico 5.</b> Mecanismo general de hidrólisis del enlace peptídico.....	19
<b>Gráfico 6.</b> Composición del rRNA 16S.....	25
<b>Gráfico 7.</b> Regiones que componen el rRNA 16S.....	26

## Índice de Tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Aplicaciones industriales de enzimas aisladas de extremófilos.....	6
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de enzimas Amilolíticas.....	17
<b>Tabla 3.</b> Especificidad de algunos métodos de fragmentación de cadenas polipeptídicas.....	19
<b>Tabla 4.</b> Concentración de formamida en el pozo y cantidad necesaria de la misma en la preparación del Buffer de Hibridación.....	35
<b>Tabla 5.</b> Cantidad de NaCl Y EDTA necesarios para la preparación del Buffer de lavado, de acuerdo al porcentaje de formamida utilizado en el Buffer de Hibridación.....	36
<b>Tabla 6.</b> Lugar de procedencia de las muestras, se muestra el pH inicial y la Temperatura a la cual se realizó la toma de muestra.....	39
<b>Tabla 7.</b> Condiciones del medio de cultivo para el tratamiento de las muestras para su aislamiento primario.....	39
<b>Tabla 8.</b> Consorcios microbianos seleccionados para continuar con el Aislamiento Microbiano.....	40
<b>Tabla 9.</b> Observación de la tinción Gram, después de la recuperación de una sola colonia de los tubos roller y cultivo bifásico.....	41
<b>Tabla 10.</b> Diseño Factorial propuesto, modificaciones en el medio de cultivo. Variables independientes: pH y concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Amilolítica .....	50
<b>Tabla 11.</b> Análisis estadístico de datos, obtenidos del diseño factorial para el consorcio HMA-2, con el programa STATISTICA 8.....	51
<b>Tabla 12.</b> Diseño Factorial propuesto, modificaciones en el medio de cultivo. Variables independientes: pH y concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Proteolítica.....	54
<b>Tabla 13.</b> Análisis de los datos estadísticos obtenidos para el consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ con ayuda del programa STATISTICA 8.....	55
<b>Tabla 14.</b> Diseño Factorial propuesto, modificaciones en el medio de cultivo. Variables independientes: pH y concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Proteolítica.....	57
<b>Tabla 15.</b> Análisis estadístico de datos, obtenidos del diseño factorial para el consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ , con el programa STATISTICA 8.....	58
<b>Tabla 16.</b> Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) para los resultados más relevantes del diseño factorial propuesto para microorganismos productores de amilasas, del consorcio HMA-2.....	61



<b>Tabla 17.</b> Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) para los resultados más relevantes del primer diseño factorial propuesto para el consorcio productor de proteasas, E-1p dilución $10^{-4}$ ....	63
<b>Tabla 18.</b> Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) para los resultados más relevantes del segundo diseño factorial propuesto para el consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ productor de proteasas.....	66

### Índice de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Toma de muestra en los geisers seleccionados.....	38
<b>Figura 2.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Amilolítica del consorcio HMA-1, productor de enzimas amilolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.....	42
<b>Figura 3.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Amilolítica del consorcio HMA-2, productor de enzimas amilolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.....	43
<b>Figura 4.</b> Imagen de la formación del biofilm del consorcio HMA-2.....	44
<b>Figura 5.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Amilolítica del consorcio HMB-1, productor de enzimas amilolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.....	44
<b>Figura 6.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-1p, productor de enzimas proteolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.....	45
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-2p, productor de enzimas proteolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.....	46
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ , productor de enzimas proteolíticas.....	47
<b>Figura 9.</b> Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-2p dilución $10^{-4}$ , productor de enzimas proteolíticas.....	48
<b>Figura 10.</b> Se presentan todos los medios de cultivo utilizados en el diseño factorial propuesto.....	50
<b>Figura 11.</b> Se presenta la superficie de respuesta del diseño factorial. Variables independientes: pH y Concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Amilolítica.....	51
<b>Figura 12.</b> A. Cambio en la forma macroscópica del biofilm microbiano. B. Se observa el biofilm producido por el consorcio inicial HMA-2. C. Biofilm pegado al vidrio, a pH 11 y 40g/L de NaCl.....	52
<b>Figura 13.</b> Cambio en la morfología microscópica del biofilm.....	53

<b>Figura 14.</b> Medio de cultivo control con la misma turbidez que un medio de cultivo inoculado con 30 días de incubación.....	54
<b>Figura 15.</b> Superficie de respuesta de variables pH y concentración de Cloruro de Sodio, NaCl, sobre la Actividad Proteolítica.....	56
<b>Figura 16.</b> Se presentan todos los medios de cultivo utilizados en el diseño factorial propuesto para el consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ .....	57
<b>Figura 17.</b> Superficie de respuesta de variables pH y concentración de Cloruro de Sodio, NaCl, sobre la Actividad Proteolítica.....	59
<b>Figura 18.</b> Se muestra una fotografía del análisis del consorcio HMA-2, con la sonda para eubacterias EUB marcado con CY3; se observan cocos y esporas libres, también el biofilm en el que se encuentran las bacterias.....	61
<b>Figura 19.</b> Fotografía del análisis FISH del consorcio E-1p, se observan cocos y esporas libres. Marcados con la sonda de eubacterias EUB marcado con CY3.....	64
<b>Figura 20.</b> Fotografía del consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ , análisis FISH del mismo se observan esporas libres, marcadas con la sonda DSB 985, que corresponde a <i>Desulfobacter</i> spp. y <i>Desulfobacula</i> spp.....	67

## 1. Introducción.

Un microorganismo extremófilo es aquel que tiene la capacidad de crecer bajo condiciones extremas, éstas pueden ser condiciones físicas (temperatura, radiación, presión) o geoquímicas (deseccación, salinidad, pH, especies de oxígeno o potencial redox). Generalmente estos microorganismos son miembros del grupo de arqueas y bacterias (1). La temperatura es un factor muy importante para los extremófilos, debido a que las altas temperaturas (encima de los 80°C) provocan la desnaturalización de las macromoléculas como las proteínas, los ácidos nucleicos y el incremento en la fluidez de las membranas a niveles letales para las células; además de influir con la solubilidad de los gases en agua.

Los microorganismos extremófilos se colectan de medio ambientes que presentan temperaturas por encima de los 60 °C como en geisers o fumarolas que contengan lodo, que son ecosistemas en los cuales ocurre el crecimiento de microorganismos.

Las características citadas determinan que los extremófilos vivan generalmente en ecosistemas anoxigénicos o microaerofílicos, debido al ecosistema en el que se encuentran. Este tipo de ecosistemas permite la mayor solubilidad de los gases presentes en la atmósfera, generando un medio ambiente anoxigénico o microaerofílico al interior del geiser (1, 2, 4).

En Bolivia, este tipo de ecosistemas se encuentra en la zona del Parque Nacional Sajama, que posee muchos geisers dentro de la reserva (3).

Las enzimas producidas por estos microorganismos tienen varias razones fundamentales por las cuáles estudiarlas, para los bioprocesos la importancia radica en la termoestabilidad de las mismas, esto implica la posibilidad del almacenamiento prolongado (a temperatura ambiente), alta tolerancia a solventes orgánicos (5), bajo riesgo de contaminación, además de la baja pérdida de actividad durante el

procesamiento (cuando se mantiene por debajo del  $T_m$  de la enzima) como también con tratamientos a elevadas temperaturas.

En las aplicaciones de la industria de los detergentes como la más importante entre otras, por ejemplo, la actividad de las enzimas utilizadas y de las proteasas aceleran la degradación de proteínas y producen pequeños péptidos o aminoácidos individuales, los cuales pueden ser fácilmente removidos de tejidos como la ropa. Las amilasas actúan sacando manchas de chocolate y manchas que contengan almidón, entre otros (35).

En el presente estudio, se cultivaran microorganismos extremófilos productores de proteasas y amilasas, realizando la colecta de los mismos en el Parque Nacional Sajama ubicado en el departamento de Oruro, Bolivia. Realizando el aislamiento para microorganismos anaerobios, llegando a determinar la actividad enzimática de cada uno de los consorcios, realizando la selección de aquellos que tienen mayor actividad enzimática, la optimización de las condiciones de cultivo con la finalidad de incrementar la actividad enzimática, finalmente se realizará la identificación molecular de los consorcios microbianos por medio de una técnica denominada Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

## 2. Antecedentes.

Muchos estudios realizados, determinaron que los microorganismos anaerobios termófilos pertenecen al orden de los Thermotogales, Clostridiales y Arqueobacterias (6, 7). El uso de estos microorganismos para la producción de enzimas termoestables es importante debido a la resistencia de las mismas en condiciones extremas, que brindan características de estabilidad únicas a este tipo de enzimas (8).

Las enzimas termoestables han sido estudiadas con mucho interés en las últimas décadas, el interés por las mismas comenzó en 1960 por el trabajo pionero de Brock y sus colaboradores. Los cuales demostraron que la vida en ambientes extremos es posible (10).

Varios estudios demuestran que los microorganismos extremófilos son capaces de producir enzimas con alto potencial biotecnológico, además de ser termoestables. Mencionan el aislamiento de *Thermus aquaticus*, de una fuente termal, productora de la enzima *taq polimerasa*, componente esencial para la prueba de PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa por su alta estabilidad a temperaturas mayores a 90°C (10, 11).

En Bolivia, los estudios realizados con microorganismos termófilos comprenden el aislamiento de los mismos y la observación de su actividad enzimática, como por ejemplo la producción de celulasas y hemicelulasas de los mismos, además del aislamiento de microorganismos viables no cultivables por métodos tradicionales y no tradicionales (12). Estudios sobre la producción de etanol a partir de microorganismos extremófilos, su aislamiento e identificación (25) además de haberse realizado estudios de caracterización de microorganismos halófilos y halotolerantes, con muestras obtenidas de la Laguna Chairkota en el departamento de Potosí, Bolivia (24).

### 3. Justificación.

El estudio de las biomoléculas de los extremófilos y la producción de enzimas termoestables para la aplicación industrial es importante debido a su alto valor comercial en la industria biotecnológica y de una infinidad de aplicaciones a la cual están sometidas las mismas, como la provisión de nuevos materiales y reactivos proveyendo alta funcionalidad, la producción de nuevos kits (promotores, chaperonas, enzimas termoestables, etc.), el estudio de nuevas moléculas bioactivas.

Es interesante estudiar las biomoléculas de los extremófilos, pudiendo basarnos en las secuencias del genoma de los mismos. Así también cada uno de estos microorganismos es capaz de sintetizar más de cinco mil clases de enzimas. Es por esto que el estudio de los extremófilos representa un gran potencial para el descubrimiento de nuevas enzimas y metabolitos para aplicaciones industriales.

Para obtener estas enzimas, es necesario cultivar microorganismos extremófilos, aislados de fuentes termales como son los geisers. De los cuáles se debe tratar de aislar un microorganismo específico el cual sea el mayor productor de enzima y que la actividad de la misma sea alta, en condiciones de alta temperatura. Posteriormente, a este tratamiento de los microorganismos, se realiza una identificación de los mismos por medio de técnicas moleculares como la identificación por secuenciación de la porción de RNA 16S y la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

## **4. Objetivos.**

### **4.1 Objetivo General.**

Estudiar consorcios microbianos anaerobios extremófilos en relación a su potencial de producción de proteasas y amilasas colectados en geisers ubicados en el Parque Nacional Sajama, Departamento de Oruro, Bolivia; optimizando las condiciones de producción de las mismas, realizando luego la identificación molecular de los mismos por medio de técnicas moleculares.

### **4.2 Objetivos específicos.**

Colectar bacterias extremófilas anaerobias de medio ambientes con las mismas características ubicados en el Parque Nacional Sajama del departamento de Oruro, Bolivia.

Aislar bacterias anaerobias termófilas y/o halófilas productoras de amilasas y proteasas por medio de técnicas propias para microorganismos anaerobios.

Determinar cinéticas de crecimiento de los microorganismos o consorcios anaeróbicos extremófilos obtenidos.

Establecer cinéticas de actividad enzimática de los microorganismos o consorcios anaeróbicos obtenidos.

Optimizar las condiciones del medio de cultivo e incubación para incrementar la actividad enzimática.

Realizar la identificación bacteriana a través de la técnica molecular Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

## 5. Marco Teórico.

### 5.1 Microorganismos extremófilos.

Un extremófilo es aquel microorganismo que tiene la capacidad de crecer bajo condiciones extremas, éstas pueden ser condiciones físicas (temperatura, radiación o presión) o geoquímicas (deseccación, salinidad, pH, especies de oxígeno o potencial redox). Generalmente este grupo de organismos son miembros del grupo de arqueas y bacterias (1). Entre los microorganismos extremófilos podemos citar varios con características distintas como se describe en la siguiente tabla, presentando las aplicaciones industriales de cada uno de ellos:

**Tabla 1.** Aplicaciones industriales de enzimas aisladas de extremófilos.

<b>Extremófilo</b>	<b>Habitat</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Aplicaciones Representativas</b>
Termófilo	Alta Temperatura Moderados (45-65 °C) Termófilos (65-85 °C) Hipertermófilos (<85 °C)	Amilasas Xylanasas Proteasas DNA polimerasas	Glucosa y fructosa para edulcorantes. Blanqueamiento de papel. Panadería, detergentes. Ingeniería Genética.
Psicrófilos	Baja Temperatura	Proteasas Deshidrogenasas Amilasas	Maduración de quesos, producción diaria. Biosensores. Degradación de polímeros en detergentes.
Acidófilos	pH bajo	Oxidación de sulfuro Concentrado de calcopirita	Desulfurización del carbón. Recuperación de metales preciosos.
Alcalófilos	pH Alto	Celulasas	Degradación de polímeros en detergentes.
Halófilos	Altas concentraciones de sal.		Disposición de resina regenerante de intercambio iónico produciendo ácido poli (gamma-glutámico) (PGA) y ácido poli-β-hidroxibutírico (PHB).
Piezófilos	Alta presión	Todo el microorganismo.	Formación de geles y gránulos de almidón.
Metalófilos	Alta concentración de metales.	Todo el microorganismo.	Biorremediación, biominería, biolixiviación.
Radiofilos.	Altos niveles de radiación.	Todo el microorganismo.	Biorremediación de sitios contaminados con radionucleótidos.
Microaerófilos.	Crecimiento en atmósferas con <21% de O <sub>2</sub> .		

Extraído de DEMIRJIAN, D. Enzymes from extremophiles. Current Opinio in Chemical Biology. 2001, 5:144-151. (38).



## 5.2 Metabolismo Anaeróbico.

El logro de un metabolismo anaeróbico es exclusivo de los organismos procariotas, es por esto que este tipo de metabolismo no se observa en los eucariotas. En este caso podemos clasificar a los microorganismos como:

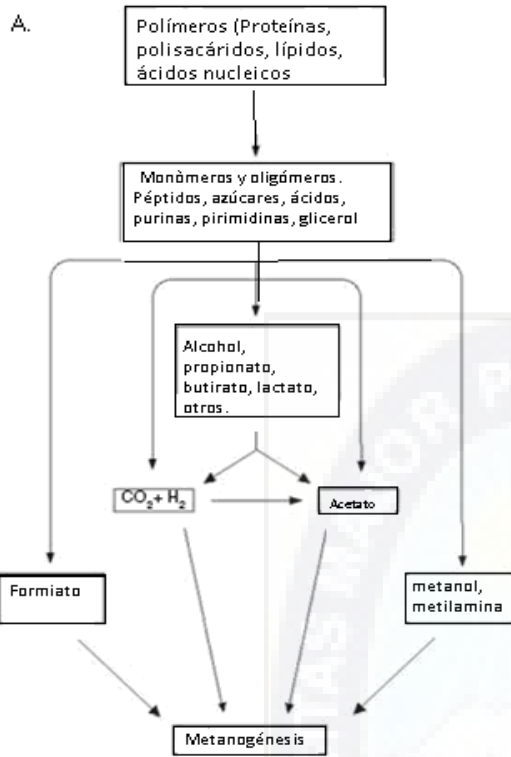
**Aerobios**, pueden utilizar aceptores de electrones alternativos como nitrato y nitrito cuando son expuestos a medio ambientes aeróbicos. El transporte de electrones de NADH a estos aceptores está ligado a la fosforilación de ADP, con el transporte de electrones hacia el oxígeno.

**Aerobios facultativos**, crecen como los aerobios en presencia de oxígeno y en su ausencia, se llevan a cabo fermentaciones.

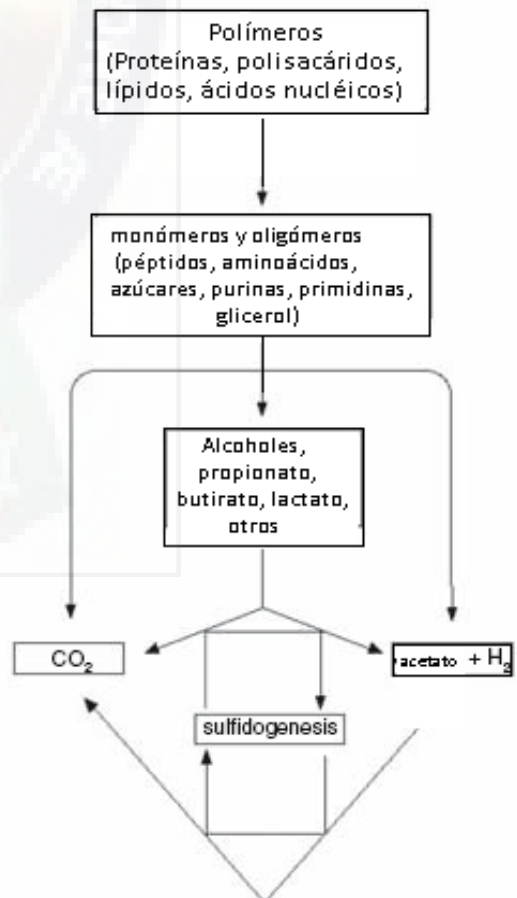
**Anaerobios estrictos**, caracterizados por la incapacidad de llevar a cabo una cadena respiratoria que tenga al oxígeno como aceptor terminal de electrones. Son restringidos a la vida sin oxígeno, es por esto que poseen varios aceptores de electrones cercanos al oxígeno, que son utilizados por las bacterias anaerobias como el  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , más lejanos en la escala de aceptores de electrones están  $\text{S}^0$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  (2, 27)

Los anaerobios obligados son importantes en todos los habitats anaeróbicos en la tierra. Debido a su incapacidad de utilizar oxígeno, tienen que utilizar estrategias para conservar la energía que producen en forma de ATP, para metabolizar los sustratos y por la producción de moléculas orgánicas como el etanol, lactato, butirato o acetato.

La cadena anaeróbica de nutrición se compone de la siguiente manera:



B.



**Gráfico 1:** Cadenas anaeróbicas alimenticias. (A) Metanogénesis, como un proceso terminal, todo el material orgánico es metabolizado a metano por la vía metanogénica, como substratos:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ , acetato, formato, metanol y metilaminas. (B) Sulfidogénesis. Como un proceso terminal, los oxidadores incompletos convierten varios productos a  $\text{CO}_2$  y acetato, y los oxidadores completos llevan a cabo la reducción de sulfato con la oxidación de acetato a  $\text{CO}_2$ . Añadiendo, el  $\text{H}_2$  puede ser usado en la reducción de sulfato (2).

### 5.3 Microorganismos Termófilos e Hipertermófilos.

Los microorganismos termófilos son aquellos que crecen en temperaturas de 60-80°C y los hipertermófilos son los que crecen por encima de 80°C generalmente, estos microorganismos pertenecen a los géneros *Protozoa* y *Archaea*. Pueden ser encontrados en la naturaleza, en lugares muy expuestos a la luz solar, alcanzando temperaturas de 50-70°C. En los geisers y las fuentes hidrotermales submarinas (fumarolas) pueden llegar a los 150-500°C. La zona de mayor concentración de este tipo de fuentes termales se ubica en el Parque Nacional de Yellowstone, Wyoming, USA. En Bolivia, este tipo de fumarolas y geisers se ubican en el Parque Nacional Sajama, departamento de Oruro, Bolivia.

Muchas de las fuentes termales tienen la característica de estar en el punto de ebullición (80-100°C), los microorganismos que se encuentran en los mismos generalmente no son fototrópicos, debido a la temperatura de crecimiento que presentan.

En medio ambientes no naturales, en los que se observa una temperatura óptima de 50-80°C como los hervidores de agua industriales, es posible encontrar microorganismos termófilos. Fue de uno de ellos que se aisló el *Thermus aquaticus*, muy importante para la producción de *taq-polimerasa*, se trata de una enzima muy importante para la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, debido a su estabilidad a altas temperaturas.

#### 5.3.1 Estabilidad de las macromoléculas de los Termófilos e Hipertermófilos.

Las macromoléculas de los termófilos son muy estables, pero no debido al cambio de estructura en comparación con un mesófilo, sino que se trata del cambio de un solo aminoácido el cuál ocasiona que las proteínas sean mucho más estables, llegando a conformar un núcleo mucho más hidrofóbico. Lo que da mayor estabilidad intrínseca a la

proteína, además del predominio de la conformación del alfa-hélice en las mismas debido a la estabilidad que presenta.

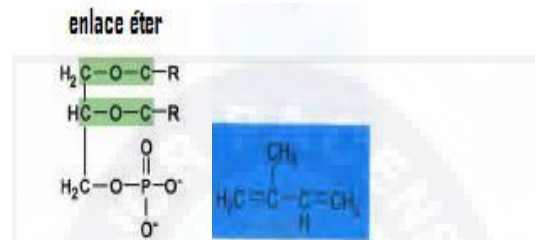
Los ácidos nucleicos que componen el DNA deben ser protegidos de la depuración y de la hidrólisis del mismo, es por esto que generalmente los microorganismos extremófilos viven en ambientes que contienen altas concentraciones de KCl y MgCl<sub>2</sub> debido a que estas sales ayudan a mantener el equilibrio entre las cargas negativas y los grupos fosfato de los grupos fosfato del DNA, añadiendo termoestabilidad.

Así también se correlaciona con el alto contenido de Guanina y Citosina. Añadiendo los termófilos, producen una *topoisomerasa* especial denominada *girasa reversa de DNA*, la cual introduce giros positivos al DNA, en contraste con la *DNA girasa* normal que introduce giros negativos; la *girasa reversa* provoca la mayor estabilidad del mismo y resistencia a temperaturas altas. Para mantener la conformación de dúplex de DNA, las arqueas poseen unas proteínas específicas, denominadas *Sac7d*, que se unen al surco menor del DNA, de manera no específica, aumentando la temperatura de fusión del DNA en unos 40°C.

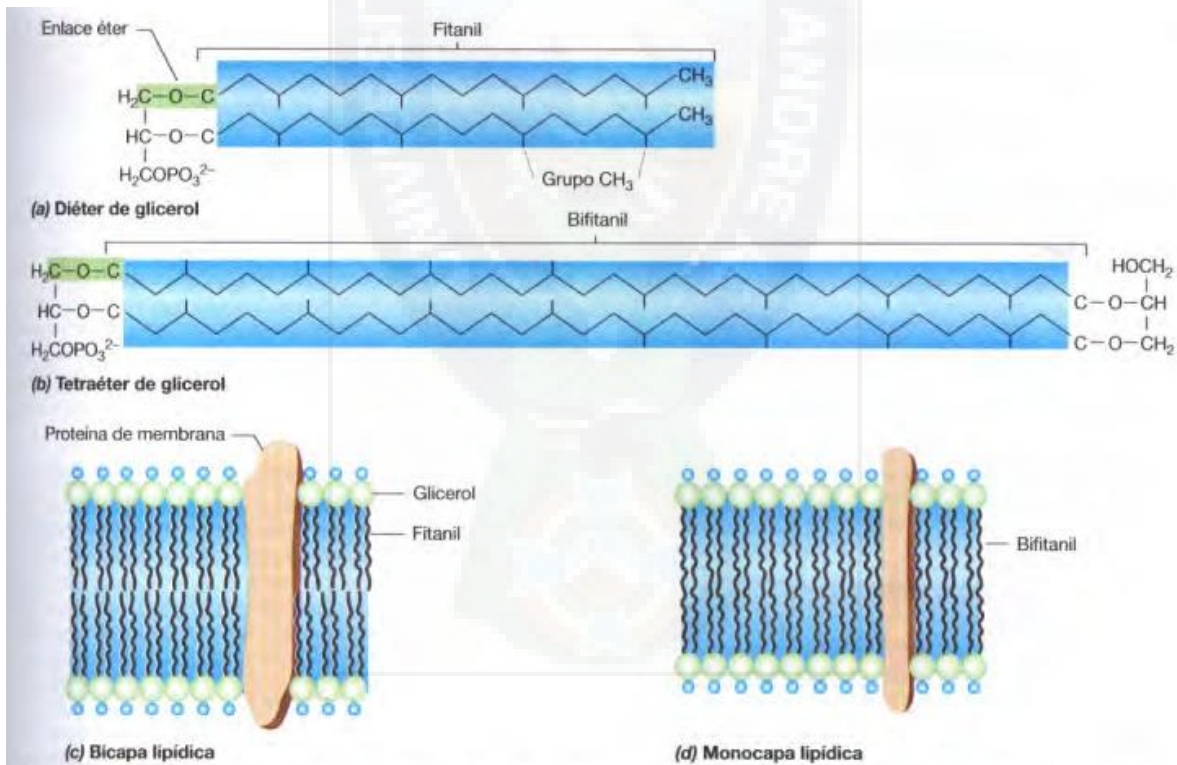
Las membranas celulares de los termófilos son estables debido al alto contenido de ácidos grasos saturados, los cuáles forman un medio ambiente mucho más hidrofóbico, favoreciendo la estabilidad de la membrana. Generalmente construidas en base al *bifitanil tetra éster*. Las membranas de los miembros de *Archaea*, no presentan ácidos grasos en sus membranas, sino carbohidratos de tipo C<sub>40</sub> compuestos de unidades repetitivas isoprenoides de cinco átomos de carbono que se unen por un enlace éter al glicerol fosfato.

La estructura global es una monocapa lipídica, estas cadenas se mantienen con unos extremos hidrofílicos y un interior hidrofóbico. Los diéteres y tetraéteres de glicerol son los principales tipos de lípidos presentes en estos microorganismos. Las cadenas laterales

de fitano (compuesto por cuatro unidades ligadas de isopreno) en las moléculas de un tetraéter se unen covalentemente entre sí. Esto hace que se produzca una monocapa en vez de una bicapa lipídica. Las monocapas lipídicas son mucho más estables y resistentes a la disgregación.



**Gráfico 2.** Enlace tipo éter que se encuentra en los lípidos de *Archaea*, y el Isopreno, el precursor de las cadenas laterales hidrofóbicas(R) de los lípidos de las *Archaea*, en bacterias y eucariotas R son ácidos grasos. Extraído de BROCK et al, *Biología de los microorganismos*. Cap 4, p. 68. (27).



**Gráfico 3.** Principales lípidos de *Archaea* y la estructura de sus membranas. (a) Diéteres de glicerol. (b) Tetraéteres de glicerol. En todos los casos la porción hidrocarbonada se une al glicerol por enlaces éter. En (a) la porción hidrocarbonada es gitano (C<sub>20</sub>) y en (b) es bifitano (C<sub>40</sub>). (c, d) Estructura de la membrana presente en *Archaea*. (c) Bicapa lipídica, (d) monocapa lipídica. Extraído de BROCK et al, *Biología de los microorganismos*. Cap 4, p. 69. (27).

#### 5.4 Microorganismos Halófilos.

Se denominan microorganismos **halófilos** a todos aquellos que tienen una dependencia específica del ión sodio además de tener un crecimiento óptimo a bajos valores de actividad de agua.

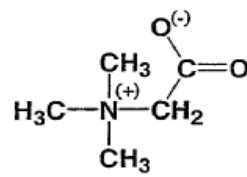
Se los puede clasificar como: *halófilos discretos*, con un requerimiento de NaCl de 1-6%, *halófilos moderados*, con un requerimiento de 6-15% de NaCl y los *halófilos extremos*, que requieren 15-30% de NaCl.

En medio ambientes con altas concentraciones salinas se provoca un cambio en la presión osmótica de la célula; la salinidad a la que están expuestos los microorganismos halófilos (2-5 M NaCl), supera a los requerimientos iónicos para la sobrevivencia a estas concentraciones salinas. Es por esto que en este tipo de microorganismos se puede observar el comportamiento de la presión osmótica y presión de turgencia para mantener la vida dentro de la célula, ya que los microorganismos halófilos pueden vivir en estrés osmótico.

Muchos microorganismos responden al estrés osmótico por medio de moléculas que son acumuladas en su citosol, llamadas también solutos compatibles, que ayudan a ajustar la actividad agua del mismo, sin inhibir los procesos bioquímicos del mismo. Estos solutos, los protegen de la deshidratación y la desecación del mismo, generalmente son azúcares o alcoholes derivados de azúcares, otro tipo de alcoholes, aminoácidos, derivados de aminoácidos o sales de potasio (KCl).

En la mayoría de los casos la glicin-betaína, derivada del aminoácido glicina es la molécula utilizada y con más efectividad, en la cual los protones del grupo amino fueron sustituidos por tres grupos metilo, esta molécula es utilizada especialmente por las proteobacterias y

arqueas (1, 2). La capacidad para acumular estos solutos está definida genéticamente para la síntesis y la acumulación de este tipo de solutos.



Glicin - betaína

Las proteínas también tienen mecanismos para protegerse de la alta salinidad, en este caso los aminoácidos son altamente hidrofílicos, es poco común encontrar aminoácidos hidrofóbicos como la prolina, las proteínas son muy polares en un medio altamente iónico por lo cual tienden a permanecer en solución. En cambio las proteínas hidrofóbicas se agrupan y pierden actividad. Los ribosomas, también adaptados a la salinidad tienen un alto requerimiento de potasio, por lo que las cargas son compensadas.

Las moléculas que están expuestas hacia afuera de las células, necesitan iones sodio para contrarrestar la fuerte carga negativa que tienen las proteínas de pared, generando estabilidad a la pared celular y a la proteína. En tanto que todas las macromoléculas de dentro de la célula, requieren potasio para realizar este balance de cargas.

### 5.5 Extremozimas.

Las extremozimas como su nombre lo indica, son enzimas que provienen de microorganismos extremófilos. Tienen características especiales en cuanto a la conformación espacial que presentan y a la estabilidad que poseen en sus distintos medio ambientes.

Las extremozimas, no pudieron ser aún caracterizadas en cuanto a la especificidad del sustrato y la enantioselectividad de las mismas, debido a que los microorganismos que las producen no fueron aislados, al ser especies viables no cultivables. Por ello se utiliza un protocolo determinado para su estudio, el cual incluye el aislamiento del microorganismo

productor, la purificación de la enzima y la posterior clonación del gen productor de la misma en un microorganismo mesófilo, provocando una mayor expresión de la misma, en condiciones de cultivo mucho más factibles (37).

Las condiciones ambientales de las extremozimas, requieren que las interacciones dentro de la proteína sean optimizadas, en la unión proteína-solvente, o con la influencia de factores extrínsecos como los metabolitos, cofactores y solutos compatibles. Algunos de los factores que ayudan a la estabilidad son el incremento de pares iónicos, la reducción en el tamaño de las cavidades, reducción del área de contacto con el medio ambiente, cambios específicos en los residuos de aminoácidos, internalizando aminoácidos en el núcleo de la proteína de mutaciones rigidificantes de la proteína.

Algunos autores (39) mencionan que se realiza un cambio de los residuos de glicina y alanina, por residuos de alanina y prolina, incrementando de esta manera las interacciones hidrofóbicas en las interfaces de las áreas de las subunidades, cambios en las áreas que están expuestas a los solventes y del alcance de la conformación de la estructura secundaria y el extremo carboxi y amino terminal truncado (38).

Además de la conformación de más redes de interacciones iónicas dentro de la molécula, lo cual incluye interacciones entre las subunidades de la enzima, como también la existencia de cavidades hidrofílicas en el núcleo de la proteína, estas dos interacciones proveen a las proteínas mayor resistencia a la desnaturalización térmica de la misma y está asociado con un incremento de la rigidez estructural de la proteína (37). Estas enzimas, debido a todas las características que poseen, son altamente resistentes a proteasas, detergentes y agentes caotrópicos y les confieren generalmente resistencia a solventes orgánicos (38).

La estabilidad de las enzimas a una alta concentración iónica, como el caso de las enzimas que provienen de los microorganismos halófilos, se basa en un exceso de aminoácidos con



carga negativa en la superficie de las mismas. El rol de estos aminoácidos es el de unirse a iones hidratados, manteniendo la superficie de la proteína hidratada y reduciendo la hidrofobicidad de la misma, así mismo se disminuye la tendencia de agregación de las proteínas a una alta concentración salina y las interacciones secundarias en este tipo de proteínas, hacen que el sitio activo de la enzima sea mucho más accesible para el sustrato debido a que se aumenta la solubilidad de la enzima (37, 38).

### 5.5.1 Enzimas Amilolíticas.

Las moléculas de almidón son polímeros unidos por puentes glucosídicos alfa-1.4 y alfa-1.6, las amilasas rompen el polímero en unidades individuales de glucosa.

Debido a la existencia de dos tipos de uniones, alfa 1,4 y alfa 1,6 son posibles estructuras distintas de las moléculas de almidón: la *amilosa*, conformada por una cadena simple de 500 a 2000 subunidades de glucosa con puentes alfa 1,4; la *amilopectina*, es un polímero de subunidades de glucosa con puentes alfa 1,6. El grado de ramificación en la amilopectina es de aproximadamente uno por cada 25 unidades de glucosa en los segmentos no ramificados. Mientras más ramificado sea el almidón, es mucho más insoluble.

El almidón es en general insoluble en agua a temperatura ambiente, por ello se observan en forma de gránulos de reserva guardados en las células que se ven con la ayuda de un microscopio. Los gránulos son resistentes a la penetración por agua y por enzimas hidrolíticas, debido a la formación de puentes de hidrógeno dentro de la molécula y con las moléculas vecinas. Estos intra e inter puentes de hidrógeno pueden debilitarse con el aumento de la temperatura, la solución en la que se encuentren, cuando una suspensión de almidón es calentada.

Los puentes de hidrógeno se rompen, el agua se absorbe y los gránulos de almidón se disuelven. Este proceso es conocido como *gelatinización* debido a que la solución formada es gelatinosa y tiene una consistencia altamente viscosa.

Dependiendo de la localización relativa local de los puentes de hidrógeno, contando por el final de la cadena, los productos del proceso amilolítico son dextrinas, maltotriosa, maltosa y glucosa. Las dextrinas son segmentos cortos de almidón que se forman como resultado de la hidrólisis aleatoria de los puentes glucosídicos internos.

Una molécula de maltotriosa es formada si el tercer puente del final de una molécula de almidón es clivada; una molécula de maltotriosa es formada si el punto de ataque es el segundo puente; una molécula de glucosa resulta si el puente clivado es terminal.

El rompimiento de partículas grandes reduce drásticamente la viscosidad de la solución de almidón gelatinizada, resultando un proceso llamado *liquefacción* debido a la disminución de la turbidez de la solución. Los pasos finales de la despolimerización son principalmente la formación de mono-, di- y tri-sacáridos. Este proceso es llamado *sacarificación*, debido a la formación de sacáridos.

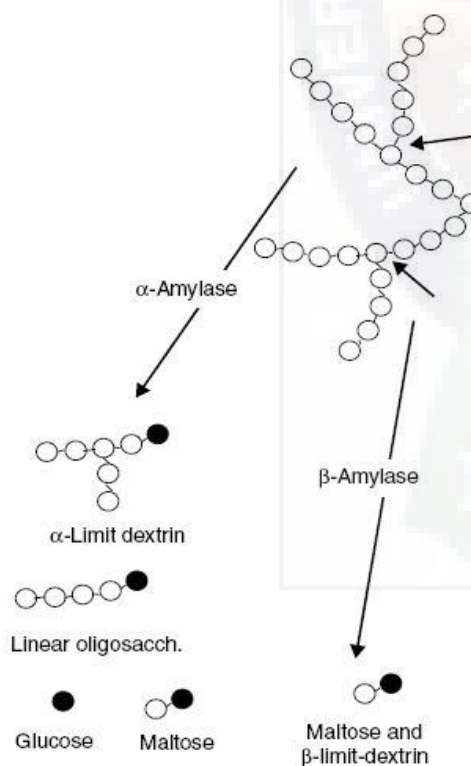
El proceso llevado a cabo por las amilasas bacterianas se sitúa en el ataque aleatorio de los puentes alfa-1,4, correspondiendo al proceso de liquefacción. La reacción de hidrólisis llevada a cabo por estas enzimas es usualmente llevada a cabo y aplicada en muchos procesos industriales. Por ejemplo, el almidón es solubilizado para su fácil remoción en las fábricas textiles. En la industria del papel, se utilizan amilasas que ayuden a la liquefacción en el proceso de recubrimiento del papel de unidades de glucosa no deseadas.

La aplicación de las enzimas amilolíticas es importante debido a que con ellas se realiza una parte del proceso de Biostoning para la decoloración de las telas. En la industria de alimentos también son muy requeridas, especialmente en la elaboración de pan y fideos, en las que se emplean amilasas en pasos clave de cada proceso (42).

**Tabla 2.** Clasificación de las enzimas amilolíticas, según el sitio de clivaje y nomenclatura correspondiente a cada una de las mismas.

Clasificación	Nombre Común	Sitio de Clivaje
EC 3.2.1.1.	Alfa-Amilasa	Endohidrólisis de enlaces (1->4)-alfa-D-glucosídicos, en oligo y polisacáridos. Actúa en almidón, glucógeno y oligosacáridos.
EC 3.2.1.2	Beta-Amilasa 4-alfa-D-glucan maltohidrolasa Glicogenasa Sacarogeno Amilasa	Hidrólisis de enlaces (1->4)-alfa-D-glucosídicos en polisacáridos removiendo unidades sucesivas de maltosa de extremos no reducidos de las cadenas de almidón. Actúa en almidón, glucógeno y polisacáridos relacionados produciendo beta-maltosa por inversión.
EC 3.2.1.3	4-alfa-D-glucan glucohidrolasa Amiloglucosidasa Exo-1,4-alfa-glucosidasa Gamma-Amilasa Glucoamilasa Alfa-glucosidasa lisosomal	Hidrólisis de residuos (1->4)-alfa-D-glucosa sucesivos de extremos no reducidos de las cadenas con liberación de beta-D-glucosa. Muchas formas de la enzima pueden hidrolizar puentes glucosídicos-D- alfa-1,6, cuando el siguiente puente de unión en la molécula es alfa-1,4. Esta enzima actúa de forma rápida en polisacáridos, más que en oligosacáridos.

Fuente: Elaboración propia.



**Gráfico 4.** Lugar de acción de las Amilasas sobre el almidón, como se observa, la  $\alpha$ -amilasa nos da como resultado de la hidrólisis del almidón glucosa y maltosa. La  $\beta$ -amilasa da como resultado de la hidrólisis maltosa o una dextrina limitada en el sitio  $\beta$ . Extraído de BERTOLDO C., ANTRANIKIAN G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology. 2002. 6:151-160. (42)

### 5.5.2 Enzimas Proteolíticas. (EC 3.4)

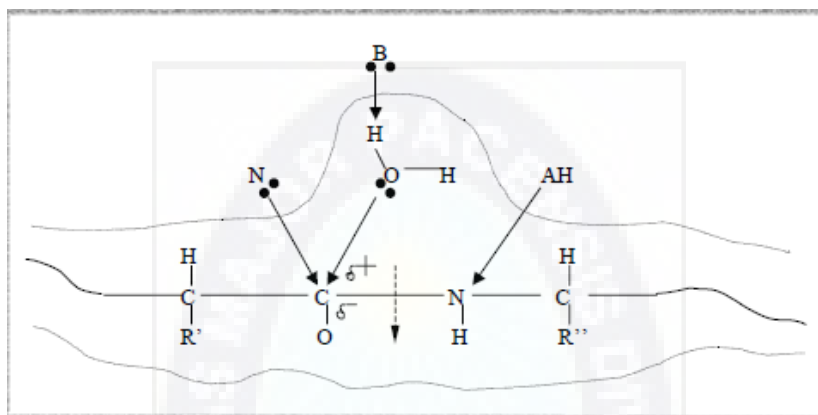
Las moléculas de proteínas, son polímeros de aminoácidos unidos por puentes covalentes (enlaces peptídicos y puentes disulfuro) y no covalentes (puentes de hidrógeno), los cuales se encargan de dar la conformación secundaria y sumando a las anteriores las interacciones hidrófobas e iónicas se encargan de la conformación tridimensional de cada proteína. Todas las interacciones anteriormente citadas se encargan de la estabilidad de la proteína debido a que son muy numerosas. Es muy importante que cualquier grupo polar o cargado de la proteína tenga los grupos adecuados para formar los enlaces de hidrógeno o las interacciones hidrófobas que le dan estabilidad a la proteína.

Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan el clivaje de los enlaces peptídicos de las proteínas. Una de las características más importantes de las proteasas es su alta especificidad. El hecho de que un enlace peptídico sea hidrolizado o no por una proteasa depende de varios factores, entre ellos, la secuencia de aminoácidos alrededor del enlace, ya que la mayoría reconocen aminoácidos o secuencias específicas.

Otro requisito para que tenga lugar la hidrólisis es la accesibilidad estérica del enlace, de manera que si éste se encuentra en el interior hidrofóbico de las proteínas o en zonas poco accesibles, no podrá ser atacado por la proteasa a menos que se produzca una desestructuración de la proteína que aumente la accesibilidad. Por último, se deben considerar condiciones físico-químicas del medio, dado que las proteasas presentan un rendimiento óptimo a determinadas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de factores orgánicos y/o metálicos.

Las proteasas son enzimas que realizan un trabajo de escisión por modificación covalente, estas enzimas catalizan la rotura hidrolítica de los enlaces peptídicos. Algunas proteasas cortan sólo los enlaces peptídicos adyacentes a residuos de aminoácidos específicos y fragmentan una cadena polipeptídica de forma predecible y reproducible. De manera

genérica, el mecanismo catalítico de una proteasa suele consistir en la polarización del enlace peptídico por el ataque nucleofílico sobre el enlace carbono-oxígeno y la donación paralela de un protón al átomo de nitrógeno. Cada tipo de proteasa cuenta con residuos específicos que cumplen las funciones de nucleófilos y de donadores de protones.



**Gráfico 5.** Mecanismo general de hidrólisis del enlace peptídico. El ataque sobre el carbono del grupo carbonilo se produce directamente por un grupo nucleófilo (N) o bien por acción de una base (B) a través de la molécula de agua y se combina con la donación de un protón por parte de AH sobre el átomo de nitrógeno. Modificado de Vendrell (1987).

**Tabla 3.** Especificidad de algunos métodos usuales de fragmentación de cadenas polipeptídicas.

Tratamiento	Punto de Corte
Tripsina	Lys, Arg (C)
Proteasa de <i>Submaxillarus</i>	Arg (C)
Quimotripsina	Phe, Trp, Tyr (C)
Proteasa V8 de <i>Staphylococcus aureus</i>	Asp, Glu (C)
Proteasa Asp-N	Asp, Glu (N)
Pepsina	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinasa Lys C	Lys (C)
Bromuro de Cianógeno	Met (C)

Extraído de: NELSON, D., COX, M. Lehninger Principles of Biochemistry. Tercera Edición. Ed. Omega. Capítulo 5. Pág. 143. 2000. (41). A excepción del bromuro de cianógeno, todas son proteasas. Residuos que proporcionan el punto de reconocimiento primario para la proteasa o el reactivo; la rotura del enlace peptídico tiene lugar en el lado carbonilo (C) o amino (N) del residuo aminoácido indicado.

A nivel celular las proteasas impiden la acumulación de proteínas defectuosas o innecesarias, debido a la inclusión de uno o varios aminoácidos incorrectos o a causa de un deterioro acumulado durante el funcionamiento normal, esto permite el reciclado de

los aminoácidos que las conforman. Generalmente en bacterias, este proceso es llevado a cabo por sistemas citosólicos dependientes de ATP.

Las proteasas pueden clasificarse en base a diferentes criterios: especificidad de sustrato, mecanismo catalítico, localización intracelular, función en el organismo, etc.

Las proteasas representan uno de los grupos de enzimas industriales más grandes y constituyen el 60% de la venta mundial total de enzimas en el mundo. Son enzimas degradadoras de importancia central, porque pueden ser utilizadas en muchas industrias para crear cambios importantes en el producto como el sabor, textura, apariencia, también en el recubrimiento y en la biorremediación de basura orgánica.

Son importantes también en aplicaciones médicas y farmacéuticas. Los microorganismos son fuentes de proteasas muy importantes, además de la diversidad que presentan y su susceptibilidad a la manipulación genética. En los procesos microbianos fermentativos, la optimización del medio de cultivo es importante para obtener una cantidad de proteasas de forma económica y que la misma sea viable. Para tener estas consideraciones la necesidad de la producción de proteasas a gran escala, es necesario tener en cuenta los procesos de las técnicas de producción, recubrimiento, purificación y la caracterización de las mismas (26).

Las proteasas producidas por microorganismos termófilos generalmente son extracelulares, se las produce de esta forma para poder captar aminoácidos libres que ayuden a la síntesis de nuevas proteínas por los microorganismos que las producen.

Las aplicaciones biotecnológicas de las proteínas son muchas, podemos citar el tratamiento de cuero de forma que no sea contaminante para el medio ambiente, la industria más desarrollada es la producción de proteasas para detergentes, con mucha

importancia práctica para los extremófilos, debido a la alta estabilidad de estas enzimas y la biorremediación de suelos contaminados con mucha carga proteica.

### **5.6 Formación de Biofilms Microbianos.**

La formación de Biofilms Microbianos es un fenómeno al que denominaremos “biofiling” (40), el cual se define como la formación indeseable de un biofilm en un medio de cultivo determinado, afectando el desarrollo del consorcio microbiano; sin embargo la presencia del mismo puede estimular e incrementar la producción de enzimas de diferente índole, además de convertirse en un soporte para los microorganismos que componen el consorcio microbiano (42).

Los biofilms son generalmente polímeros formados por la interacción de los microorganismos que poseen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que están asociados a productos de corrosión, partículas y al suelo. Generalmente, la presencia de un biofilm en un medio de cultivo no es favorable, debido a que el mismo atrapa iones como el Hierro que al ser acumulado en el biofilm, produce corrosión en el medio ambiente en el que se encuentra (40), pero en la producción de enzimas, su presencia es bastante interesante puesto que los microorganismos quedan inmovilizados en el mismo y estimulando la producción enzimática en alguna forma.

La formación de un biofilm en un medio de cultivo, muestra que los microorganismos poseen adhesinas especiales en la pared celular del mismo, el cual permite la adhesión de las bacterias al polímero formado por las mismas, generalmente este polímero está compuesto por un polisacárido con distintos tipos de enlaces,  $\beta$  (1-4),  $\beta$  (1-6) o presentan los dos tipos de enlace. Como se sabe, las amilasas pueden romper los dos tipos de enlace, por ello la producción enzimática aumenta, en el caso de las amilasas, en el caso de consorcios microbianos, podemos decir que la conformación del biofilm puede estar a cargo de una población microbiana componente del consorcio microbiano, en

contraposición a esto, es otra población la que intenta romper el mismo produciendo mayor cantidad de enzimas amilolíticas obteniendo de esta forma el producto que se necesita que son las Amilasas con una actividad bastante alta.

Si bien muchos autores indican que los biofilms son perjudiciales para el estudio de los consorcios microbianos, también es cierto que los mismos causan efectos inesperados en la producción de enzimas de todo tipo, siendo uno de los efectos que aún no es investigado, el aumento en la producción y el incremento en la actividad de las mismas.

### **5.7 Medida del crecimiento bacteriano, método indirecto por medida de la turbidez.**

Un método muy rápido para obtener una estimación del número de células presentes en un medio de cultivo, es la medida de la turbidez del mismo. Una suspensión celular aparece turbia a la vista, porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión.

Cuanto más células están presentes, mayor será la luz dispersada y, por tanto, mayor será la turbidez. Esta medición de la turbidez, se puede realizar con un espectrofotómetro que tenga una lámpara de luz dentro del rango del visible. Las longitudes de onda, más comúnmente usadas para medir la turbidez bacteriana son: 540 nm, 600nm y 660nm. Las medidas de turbidez, se utilizan con frecuencia para seguir la velocidad de crecimiento microbiano en los cultivos microbianos; la misma muestra se puede medir repetidamente. Los resultados pueden ser representados semilogarítmicamente frente al tiempo y usarse para calcular el tiempo de generación de un cultivo en crecimiento (27).



## 5.8 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

La técnica de FISH nos permite la visualización de células procariotas en su medio ambiente natural. En síntesis, las células son fijadas (puede ser utilizado si las células ya no son viables pero el estado de su DNA y RNA es preservado aún), permeabilizadas para facilitar el acceso de la sonda al sitio objetivo y luego, las mismas hibridan con las sondas de ácido nucleico. Las sondas están unidas a un fluorocromo de forma previa o el mismo es introducido en un paso secundario para su detección. Las muestras pueden ser analizadas luego por epifluorescencia, microscopía escáner de tipo láser o citometría de flujo.

La técnica clásica de FISH se utiliza en rRNA (RNA 16S) como molécula objetivo dentro de la célula. El rRNA sugiere por sí mismo el objetivo ideal, porque está presente en todas las células vivientes en una cantidad relativamente alta de copias. El mismo es usado tradicionalmente como marcador filogenético, siendo posible obtener un gran número de secuencias de datos para el diseño de la sonda complementaria a la molécula (36).

Desde sus orígenes hace 25 años, esta técnica se convirtió en una herramienta invaluable para los microbiólogos ambientales y produjo una gran cantidad de variaciones. Las razones para que sea tan popular, son las siguientes: 1) El FISH permite la detección de células a pesar de su cultivabilidad. Con un 0.3% de bacterias en el suelo y <0.1% en agua marina que son cultivables. 2) La posibilidad para detectar células *in situ* permite dar una idea sobre la estructura de las comunidades microbianas y pueden ayudar a revelar su función ecológica.

A pesar de estas características muy prometedoras, el protocolo clásico de FISH sufre de algunas limitaciones. La mayor desventaja es que a menudo se tiene una baja intensidad en la señal. Esto puede ser atribuido en parte a la insuficiente permeabilidad de las células previniendo el acceso de las sondas dentro de las células y en el sitio objetivo. La introducción de varios tratamientos químicos y enzimáticos puede aliviar este problema hasta cierto punto. Sin embargo, la permeabilidad de la célula siempre tiene que ser

balanceada cuidadosamente con la integridad celular para prevenir la pérdida de la misma (36).

Aparte de la permeabilidad de las células, la razón principal para una señal débil con el objetivo clásico, el rRNA, para la técnica es el bajo contenido de ribosomas encontrado en el crecimiento lento o en las células con metabolismo inactivo en las muestras medioambientales.

Los problemas de esta naturaleza llevaron a los investigadores a abordar la forma de amplificar más la señal, siendo los mismos diseñados en años recientes. Esta sensibilidad provista por el método últimamente negada por el dogma de que FISH requiere un gran número de copias de la molécula objetivo; abriendo el camino para nuevas aplicaciones, permitiendo a los microbiólogos el prescindir del rRNA 16S e instando a utilizar como objetivo a otras moléculas de ácidos nucleicos presentes en menor cantidad de copias, como el mRNA, plásmidos o genes con una sola copia (36).

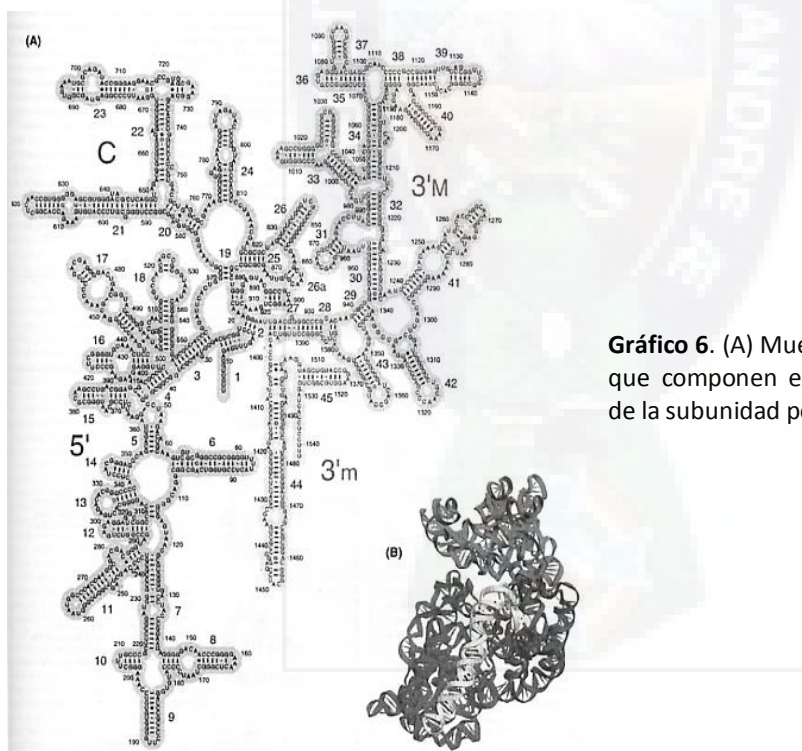
La técnica de FISH incluye la interacción entre ácidos nucleicos, esto quiere decir que una pequeña sonda hecha de DNA se une al RNA de la célula que está siendo analizada, este RNA objetivo, es el RNA ribosomal de la célula. Formando un híbrido rRNA-DNA (32).

Para definir una sonda, podemos decir que es en un sentido químico y biológico, una molécula que tiene una interacción específica con una molécula, siendo la misma identificada por una molécula “reportera” en este caso una molécula fluorescente unida al extremo 5´ de la molécula, se utiliza un fluorocromo por cada oligonucleótido (30, 32).

La especificidad de esta unión está dada por el tamaño de las bases nucleotídicas que comprenden las mismas. Para esto, se debe tener en cuenta que los pares de bases Guanina-Citosina forman 3 puentes de hidrógeno y el par Adenina-Timina (Uracilo) forma solo dos puentes de hidrógeno. Esta conformación afecta también la Temperatura Melting del DNA, que es la temperatura a la cual el DNA o RNA sufre una desnaturalización del 50% del total de la molécula (27), afectando así mismo la estabilidad de esa molécula.

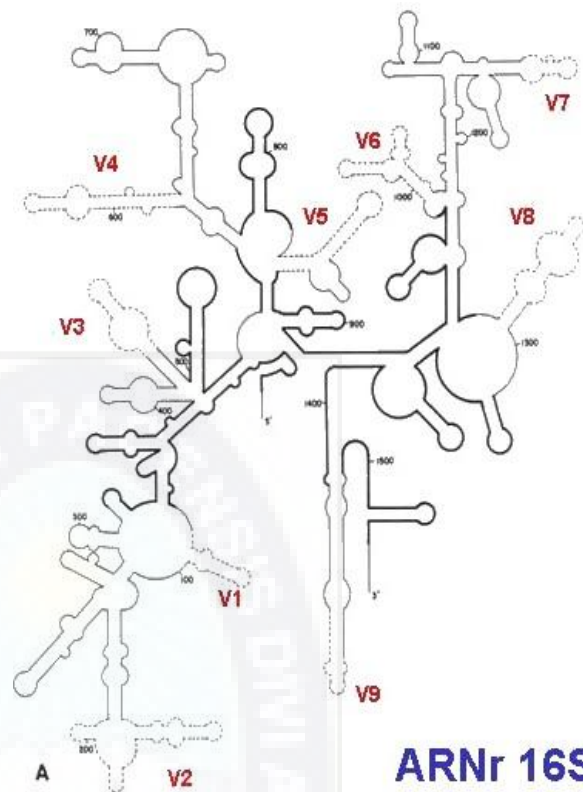
Además de los puentes de hidrógeno actúan dentro de la molécula de DNA, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas, las cuáles se mantienen juntas y se agrupan en un medio ambiente acuoso. La hibridación de las sondas de ácidos nucleicos ocurre generalmente a 5°C menos del Tm de la molécula (32, 33).

EL objetivo del análisis es la molécula de rRNA 16S en la hibridación específica de las sondas de DNA para la detección de la especie de un microorganismo específico, el RNA 16S está compuesto por muchas regiones, en esta técnica se trabaja con la región V6 del mismo. Para detectar un tipo de bacteria en específico, se utiliza como molécula objetivo para la hibridación el rRNA 23S. Ambas moléculas pueden estar amplificadas o son secuencias específicas que pertenecen a un grupo filogenético en especial (31-33).



**Gráfico 6.** (A) Muestra de las Bases nucleotídicas que componen el rRNA 16S. (B) Conformación de la subunidad pequeña del RNA 30S.

**Gráfico 7.** Conformación de las regiones que componen el rRNA 16S. En este caso la región de interés para la técnica aplicada es la porción V6.

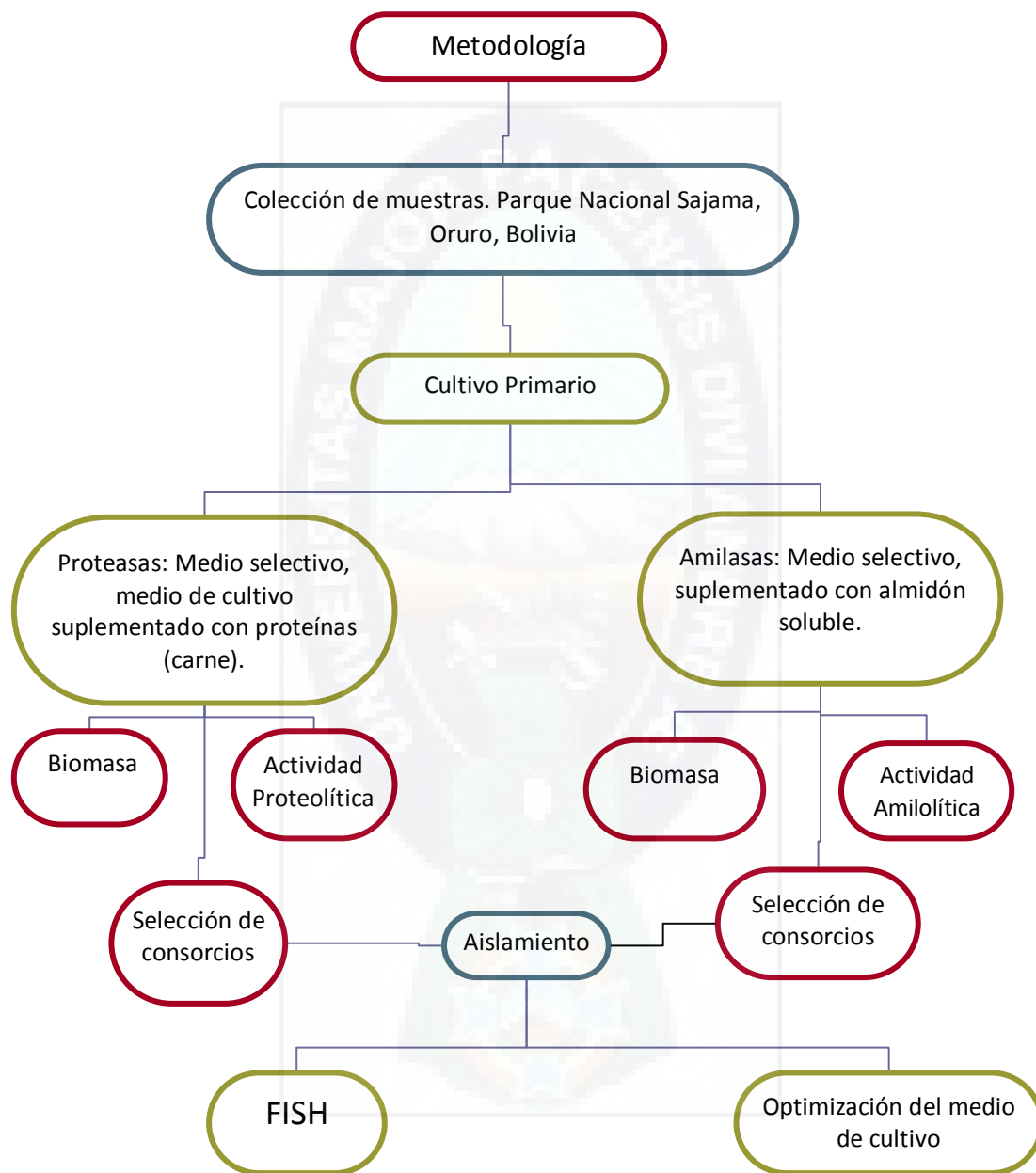


Definiendo el proceso de hibridación se puede decir que es la construcción de una molécula de ácidos nucleicos de doble hélice, partiendo de dos moléculas simples de ácido nucleico. Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel muy importante. En este paso, los solventes reducen la estabilidad del híbrido formado, pero no juegan un papel esencial en la especificidad del mismo (33).

El objetivo del FISH es hibridar de forma específica la mayor cantidad de sondas y tener la menor cantidad de uniones erróneas entre la sonda y el objetivo, a esto se llama **estringsencia** de la prueba (32).

Para que dos cadenas de oligonucleótidos se mantengan unidas de forma complementaria a baja temperatura y de esta forma mantener la estringsencia de la prueba, se utiliza formamida, un solvente desnaturizante, que ayuda a mantener la temperatura baja. La concentración salina también debe ser estandarizada, además de la temperatura de hibridación para cada oligonucleótido (32).

## 6. Materiales y Métodos.



## 6.1 Colección de las Muestras.

La colecta de muestras se realiza en medio ambientes extremófilos, geisers ubicados en el Parque Nacional Sajama, departamento de Oruro, Bolivia. Al momento de la toma de muestra se debe determinar el pH y la temperatura de los geisers escogidos. Colectando muestras de lodo de las paredes de cada geiser, arrastrando así toda la biomasa posible. Para el transporte del mismo se utilizarán botellas térmicas, en las cuales se debe incluir lodo y agua, manteniendo la temperatura inicial durante el tiempo de transporte de las muestras hasta el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas – Área de Biotecnología Microbiana, donde se deben disponer de los medios de cultivo específicos (ver Anexo1), para el aislamiento de bacterias productoras de enzimas específicas como las amilasas y proteasas, para ser inoculados de forma inmediata.

## 6.2 Métodos de Aislamiento Bacteriano.

Para la realización de las técnicas de Tubos Roller y cultivo Bifásico, las cuáles se describen a continuación, se realizaron diluciones de cada consorcio bacteriano en una secuencia como la siguiente:  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$ ,  $\frac{1}{128}$ ,  $\frac{1}{256}$ ,  $\frac{1}{512}$  y  $\frac{1}{1024}$ . Se determinaron las actividades enzimáticas y se eligieron las 3 diluciones, que presentaron mayor actividad enzimática. Cada muestra se procesó por duplicado.

***Técnica de los tubos Roller***, es un método simple, flexible, que no requiere de reactivos ni instrumentos complejos. Es un método bastante utilizado para bacterias anaerobias estrictas, debido a que no existe oxígeno en el medio. Se basa en el uso de botellas de 100mL, cerradas con tapones de caucho de butil, selladas con anillas de aluminio.

El medio está compuesto básicamente por minerales con la adición de un agente reductor, posteriormente es gasificado con un gas libre de oxígeno, en este caso, el nitrógeno. Una vez que el medio ya esta embotellado y sellado, puede utilizarse. La

inoculación de los microorganismos y la adición de algunos compuestos deben hacerse con una jeringa hipodérmica estéril.

Existen variaciones en la técnica original descrita por Hungate, en el presente trabajo, se utilizó una modificación de la técnica denominada “Técnica de los Roller Tubes”, la misma que incluye el crecimiento de colonias dentro de una matriz de agar-agar que es esparcido por las paredes de la botella (12, 13).

**La técnica de cultivo bifásico**, o cultivo en dos fases, es bastante utilizada en hemocultivos. Desarrollada por Ruiz Castañeda para el cultivo de *Brucella*, la principal ventaja que ofrece la técnica es permitir el desarrollo del inóculo primero en la fase líquida del medio de cultivo, enriqueciendo el medio de cultivo y luego se realiza el aislamiento y la formación de colonias en la fase sólida. Para esto, el cultivo se realiza primero en forma vertical y posteriormente la botella se cultiva de forma horizontal hasta la formación de colonias sobre el agar-agar (12, 13).

### **6.3 Determinación de Biomasa Microbiana.**

Se realizó la determinación de la turbidez del medio de cultivo a tiempo determinado para cada consorcio, el tiempo utilizado es de 48 horas, debido a que se observó que los consorcios microbianos presentaban un crecimiento lento. Se utilizó agua destilada como blanco para la lectura. La lectura de la turbidez de los medios de cultivo se realizó a 600nm de longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro.

## 6.4 Métodos Analíticos.

### 6.4.1 Determinación de Actividad Amilasa.

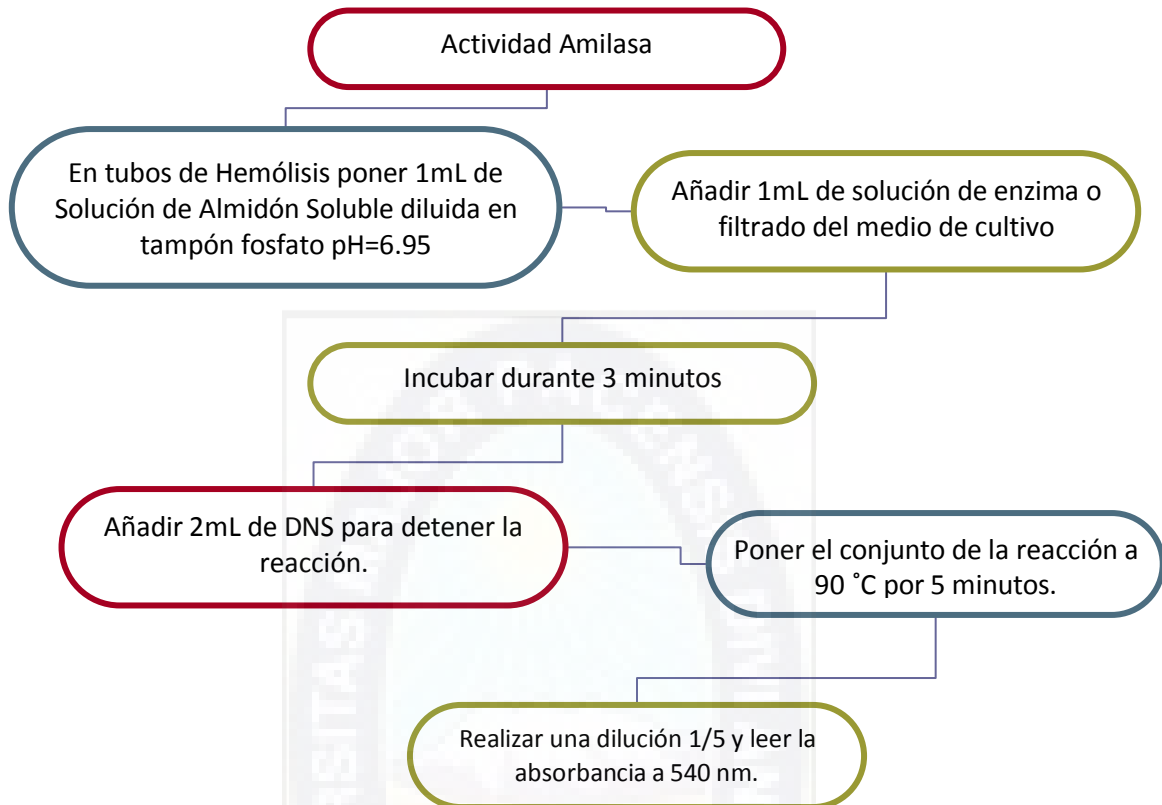
Se utilizó el método del DNS, o ácido Dinitro-salicílico. Con modificaciones específicas para la determinación de la actividad Amilolítica.

El sustrato preparado para el mismo es, almidón soluble al 1%, diluido en Tampón Fosfato 50mM pH= 6.95.

A 1mL de sustrato, que consiste en almidón soluble 1% (p/v) diluido en Tampón Fosfato 0.02M, pH 6.95. Añadir 1mL de solución enzimática, en este caso el filtrado del medio de cultivo a través de filtros millipore de 0.45µm de diámetro, para eliminar las bacterias. Mezclar bien con ayuda de un Vortex. Incubar durante 3 minutos, a la temperatura a la cuál el consorcio microbiano tiene un crecimiento óptimo, en este caso, temperatura ambiente, aproximadamente 20°C. Añadir 2mL de reactivo DNS (Anexo 2), incubando todo el conjunto a 90 °C por 5 minutos. Realizar una dilución 1/5 de todo el digerido, en placas de ELISA para un volumen total de 240µL. Leer la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro, lector de placas de ELISA a 540 nm.

La curva estándar se realiza con maltosa a distintas concentraciones (ver Anexo 3) (22, 23). Una unidad enzimática es igual a 1 micromol de maltosa, liberado por minuto bajo las condiciones del ensayo.





#### 6.4.2 Determinación de Actividad Proteasa.

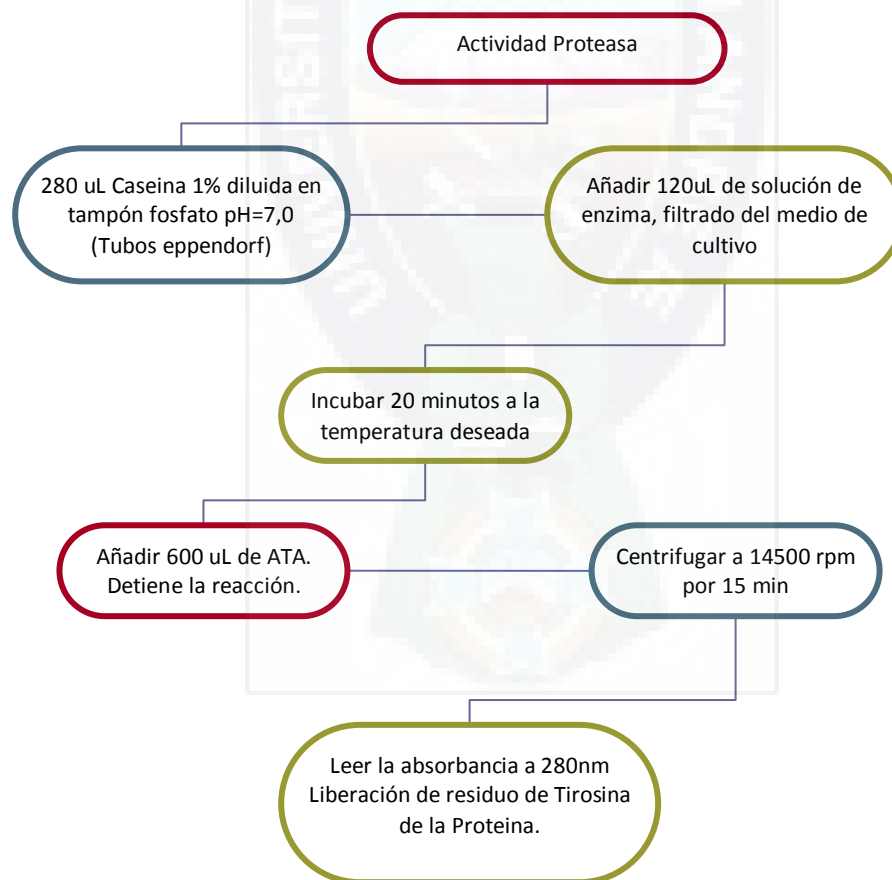
Se realizó la determinación por medio del método de la Caseína (Kunitz, 1947), debiendo realizarse modificaciones al método inicial para un volumen total de 1mL de solución de reacción (16-21). Obteniendo los mismos resultados que los propuestos por el método inicial.

A 280  $\mu$ L de solución de caseína al 1%, diluida en tampón fosfato 50mM, pH=7.0. Añadir 120 $\mu$ L de solución de enzima, o en este caso el filtrado del medio de cultivo a través de filtros millipore de 0.45 $\mu$ m de diámetro, para eliminar las bacterias del medio de cultivo. Mezclar bien con ayuda de un Vortex. Incubar 20 minutos, a la temperatura a la cual el consorcio microbiano tenga crecimiento óptimo, en este caso 55°C. Habiendo realizado un análisis previo de termoestabilidad de la enzima. Al término de la incubación añadir

600µL de Ácido Tricloroacético (TCA o ATA) al 10% (p/v) frío, mezclar bien con ayuda de un Vortex. Centrifugar durante 15 minutos a 14 500 rpm.

Leer la absorbancia del sobrenadante de la muestra en un espectrofotómetro a 280nm de longitud de onda, frente a un blanco reactivo que solo posee caseína, pero que debe pasar por el mismo procedimiento que las muestras.

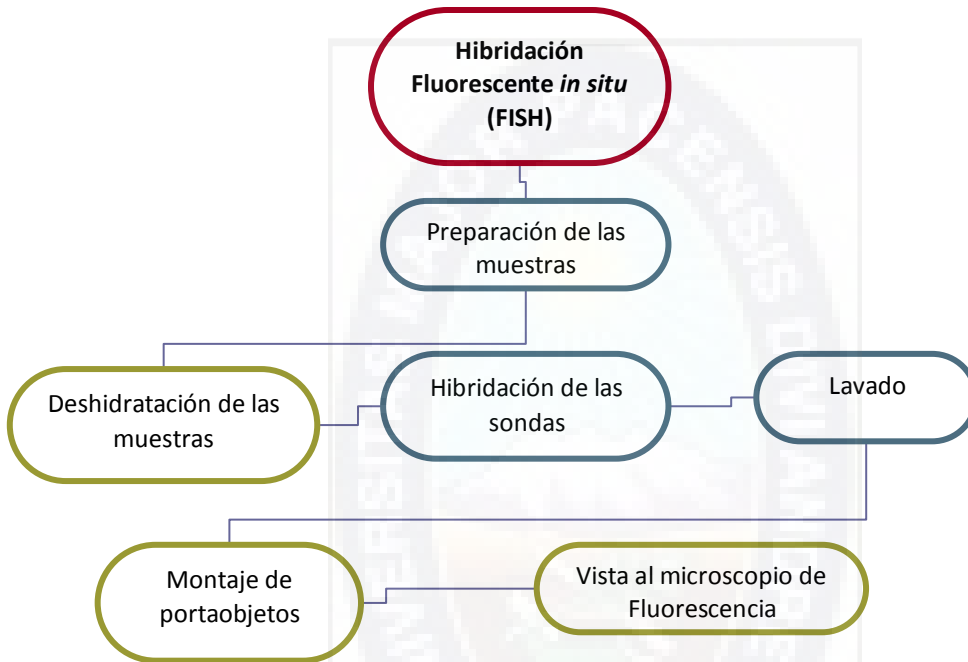
Se determina la liberación de residuos de tirosina en el sobrenadante provocados por la actividad proteolítica sobre la caseína. La curva estándar se realiza con tirosina a distintas concentraciones (ver Anexo 3). Una unidad enzimática equivale a la liberación de 1µg de Tirosina por minuto, bajo las condiciones del ensayo.



## 6.5 Métodos Moleculares.

### 6.5.1 Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH).

El protocolo propuesto para esta técnica puede ser resumido en el siguiente organigrama.



#### 6.5.1.1 Preparación de las muestras.

Se realizó un concentrado de las bacterias por medio de centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, hasta 3 veces, observando que el precipitado obtenido sea concentrado para tener una buena cantidad de bacterias. Luego, se lava la muestra con buffer PBS 1X, por 3 veces para eliminar las impurezas del medio de cultivo.

- a. Para Bacterias Gram (+). En un tubo eppendorf se pone etanol 98% en una relación 1 a 1 con la muestra de bacterias previamente concentrada, mezclar por inversión por 3 veces y dejar a 4°C por 12 a 16 horas.

- b. Para Bacterias Gram (-). En un tubo eppendorf se pone formol al 4% en una relación 3 a 1 con el concentrado de bacterias, mezclar por inversión 3 veces y dejar a 4°C por 2 a 4 horas.

#### **6.5.1.2 Aplicación de las muestras a los portaobjetos y deshidratación.**

En cada uno de los portaobjetos, se colocó un volumen de muestra entre 3-30  $\mu\text{L}$ , secar a temperatura ambiente. Luego se procedió a la deshidratación de la misma, sumergiendo el portaobjetos en etanol a 50%, 80% y 98%, por 3 minutos en cada uno. Luego de este procedimiento, las muestras pueden ser guardadas por tiempo indefinido a -20°C.

#### **6.5.1.3 Hibridación de las Sondas.**

El buffer de hibridación es preparado en tubos de microcentrifuga de 2mL. En cada pozo del portaobjetos que contiene la muestra se deben poner 8 $\mu\text{L}$  del buffer, lo que resta del buffer de hibridación se lo debe vaciar en un tubo Falcon que contenga un papel absorbente para mantener la forma de una cámara húmeda.

La formamida (guardada a -20°C en alícuotas de 2mL) debe ser utilizada dependiendo del número de hibridaciones que se requieran, no debe tener coloración. Cuando es descongelada, guardar a 4°C y usar en el lapso de una semana. Se necesita una concentración de formamida específica para cada una de las sondas que se utilizan. El Dodecil Sulfato Sódico (SDS) es añadido en la tapa de cada tubo al final de todos los reactivos en la preparación de buffer, debido a que interactúa con el Cloruro de Sodio (NaCl) y precipita. En un tubo eppendorf de 2mL añadir los siguientes volúmenes:

360 $\mu\text{L}$  de NaCl 5M (autoclavado)

40 $\mu\text{L}$  de Tris/HCl 1M (autoclavado)

2 $\mu\text{L}$  de SDS (no autoclavado), ponerlo en la tapa del tubo de microcentrifuga.

X  $\mu\text{L}$  de Formamida (vea la tabla a continuación)

Y  $\mu\text{L}$  de agua milliQ (autoclavada), depende de la cantidad de formamida.

**Tabla 4.** Concentración de formamida en el pozo y cantidad necesaria de la misma en la preparación del Buffer de Hibridación.

Cantidad de Formamida ( $\mu\text{L}$ ) = x	Porcentaje de Formamida en el Pozo	Cantidad de Agua milli-Q H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ ) = y
0	0	1598
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

**Fuente:** BLACKALL, L. Fluorescence *in situ* hybridisation FISH. Apuntes de cátedra. Advanced Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.

Luego añadir 1 $\mu\text{L}$  de la sonda en el pozo para una concentración final de 25ng/ $\mu\text{L}$ , mezclar cuidadosamente. No hay necesidad de calentar el tubo o el buffer de hibridación. Poner el portaobjetos en un tubo falcon de 50mL conteniendo el papel absorbente empapado en el buffer de hibridación. Cerrar y poner en el horno de hibridación por una a dos horas.

#### 6.5.1.4 Lavado.

Luego de la hibridación, los portaobjetos son cuidadosamente removidos del tubo y enjuagados inmediatamente con el buffer de lavado, pipeteando una pequeña cantidad del mismo suavemente sobre el portaobjetos.

Preparación del Buffer de Lavado (volumen total de 50mL).

NaCl	(5M-autoclavado)	2150 $\mu\text{L}$ (para 20% de formamida)
Tris/HCl	(1M-autoclavado)	1mL
Agua Milli-Q	(autoclavada)	43.8 mL
SDS	(10% no autoclavado)	50 $\mu\text{L}$
Volumen total		50mL

**Tabla 5.** Cantidad de NaCl Y EDTA necesarios para la preparación del Buffer de lavado, de acuerdo al porcentaje de formamida utilizado en el Buffer de Hibridación.

Hibridación 46°C % Formamida	NaCl (M)	Z µL NaCl	µL 0.5M EDTA Para más de 20% de Formamida
0	0.900	9000	-
5	0.636	6300	-
10	0.450	4500	-
15	0.318	3180	-
20	0.225	2150	500
25	0.159	1490	500
30	0.112	1020	500
35	0.080	700	500
40	0.056	460	500
45	0.040	300	500
50	0.028	180	500
60	0.020	120	500

$$(\text{NaCl}) (\text{mM}) (0.5 \times (\% \text{FA})) = -16.6 \log (\text{Na}^+)$$

**Fuente:** BLACKALL, L. Fluorescence *in situ* hybridisation FISH. Apuntes de cátedra. Advanced Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.

Preparar el buffer de lavado en un tubo Falcon nuevo, añadir el SDS al final de la preparación y mezclar. Se debe incubar este buffer a 48°C durante el tiempo en que se lleve a cabo la hibridación. Se utilizan tubos nuevos para el lavado, luego éstos son usados para la siguiente vez que se realice la hibridación según el protocolo. Los tubos usados para la hibridación son luego desechados e incinerados al igual que los portaobjetos y todo el material que haya contenido formamida en una cabina especial para incinerar.

Luego de la hibridación, el portaobjetos es cuidadosamente removido del tubo Falcon donde se encontraba y una pequeña cantidad de tampón de lavado es pipeteado sobre el mismo, eliminando todo el desecho que caiga, luego el tubo Falcon y el desecho deben ser incinerados. El portaobjetos es puesto en el tubo Falcon que contiene el buffer de lavado y puesto en el Baño María a 48°C durante 10-15 minutos. La transferencia del portaobjetos debe ser realizada de una forma rápida, esto evita que el mismo se enfríe, evitando que se forme una unión no específica de las sondas con el rRNA en las muestras procesadas.

Luego del lavado, el portaobjetos es removido y se desecha el tampón de lavado, se guarda el tubo Falcon para reutilizarlo. Se debe lavar el portaobjetos gentilmente con Agua MilliQ, la misma debe inundar los pocitos del portaobjetos. Deben lavarse ambos lados del portaobjetos, para remover todas las sales que puedan producir auto fluorescencia. Luego del lavado, asegúrese de que no queden gotas de agua en los pocitos, las sondas pueden disociarse y abandonar las células debido a la presión osmótica ejercida por la misma. Los portaobjetos deben ser secados en posición vertical.

#### **6.5.1.5 Montaje de los portaobjetos.**

Cuando los portaobjetos ya estén secos, se debe montar el Citifluor (es tóxico, así que debe ser utilizado con guantes), poniendo una capa muy fina del mismo, encima se pone el cubreobjetos y se debe lograr que el Citifluor cubra totalmente todos los pocitos del portaobjetos. Para la vista al microscopio, el Citifluor no debe estar en contacto con el aceite de inmersión que se utilice.

#### **6.5.1.6 Vista al microscopio de los portaobjetos.**

Ver y sacar fotografías el día en el que se realizó todo el procedimiento. Pero se puede observar los portaobjetos al día siguiente si son guardados a 4°C o a -20°C, si el Citifluor es removido con agua, de forma cuidadosa.

Al terminar todo el procedimiento se deben desechar los portaobjetos, debido a que la formamida y el Citifluor son tóxicos, los mismos deben ser incinerados.

## 7. Resultados y Discusión.

### 7.1 Colección de las Muestras.

Se colectaron muestras de geisers ubicados en el Parque Nacional Sajama, departamento de Oruro, Bolivia. Al momento de la toma de muestra se determinó el pH y la temperatura de cada geiser, se tomó muestra de lodo de las paredes del geiser y también de agua. Las muestras fueron colectadas en botellas térmicas las cuáles mantuvieron la temperatura de la muestra para su transporte hasta el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, donde se tenían medios de cultivo selectivos preparados con anterioridad, para la inoculación inmediata de las muestras después de su llegada al laboratorio.



**Figura 1.** Toma de muestra en los geisers seleccionados.

**Fuente:** Equipo de trabajo para la toma de muestra, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.



**Tabla 6.** Lugar de procedencia de las muestras, se muestra el pH inicial y la Temperatura a la cual se realizó la toma de muestra.

<b>Código de Muestra</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Temperatura inicial</b>
GS-1	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	6	80°C
GS-2	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	6	85°C
GS-3	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	6	85°C
GS-4	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	6	87°C
GS-5	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	6	85°C
GS-6	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	6	35°C
GS-7	Sajama	18°05,877'S 69°04,701'O	5	74°C

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a la anterior tabla, se realizó la inoculación de las muestras obtenidas en medios de cultivo selectivos, obteniendo los datos de los siguientes consorcios y las nuevas siglas que se manejan para el procesamiento de las muestras.

**Tabla 7.** Condiciones del medio de cultivo para el tratamiento de las muestras para su aislamiento primario.

<b>Consortio</b>	<b>Procedencia</b>	<b>pH de cultivo</b>	<b>Características del medio de cultivo.</b>	<b>Temperatura de Cultivo</b>	<b>Actividad Enzimática</b>
HMA-1	GS-6	7	NaCl 6%	T° Amb (20°C)	Amilasa
HMA-2	GS-4	7	NaCl 6%	T° Amb (20°C)	Amilasa
HMB-1	GS-6	7	NaCl 6%	37°C	Amilasa
HMB-2	GS-7	7	NaCl 6%	37°C	Amilasa
HMB-3	GS-2	7	NaCl 6%	37°C	Amilasa
C-1	GS-1	7	NaCl 6%	37°C	Proteasa
C-2	GS-2	7	NaCl 6%	37°C	Proteasa
C-3	GS-3	7	NaCl 6%	37°C	Proteasa
E-1p	GS-4	7	----	80°C	Proteasa
E-2p	GS-5	7	----	80°C	Proteasa
E-3p	GS-1	6	----	80°C	Proteasa
E-4p	GS-7	5	----	80°C	Proteasa
E-5p	GS-1	6	NaCl 6%	80°C	Proteasa
E-6p	GS-7	5	NaCl 6%	80°C	Proteasa

E-3 <sup>a</sup>	GS-1	6	----	80°C	Amilasa
E-4 <sup>a</sup>	GS-7	5	----	80°C	Amilasa
E-5 <sup>a</sup>	GS-1	6	NaCl 6%	80°C	Amilasa
E-6 <sup>a</sup>	GS-7	5	NaCl 6%	80°C	Amilasa

Las siglas utilizadas para identificar los consorcios microbianos se las asignó de acuerdo a las características que el medio de cultivo selectivo posee, como se explica a continuación: HMA: Halófilo Mesófilo Ambiental. HMB: Halófilo Mesófilo Crecimiento a 37°C. C-1-C-3: Halófilo Mesófilo Crecimiento 37°C. E-1p – E-6p: Extremófilo con crecimiento a 80°C, selectivo para proteasas. E-3<sup>a</sup>-E-6<sup>a</sup>: Extremófilo con crecimiento a 80°C, medio selectivo para amilasas.

**Fuente:** Elaboración Propia.

Para la realización de una selección de los consorcios anteriores, se realizaron diluciones seriadas de los mismos de la siguiente manera:  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$ ,  $\frac{1}{128}$ ,  $\frac{1}{256}$ ,  $\frac{1}{512}$  y  $\frac{1}{1024}$ ; y de esta forma aumentar la actividad enzimática a medida que se provoca aislamiento de los microorganismos y observar si de esta forma la actividad enzimática incrementa de una forma significativa; seleccionando sólo aquellos que tienen mayor actividad enzimática para continuar con el trabajo.

Los consorcios seleccionados para continuar con el paso de aislamiento debido a la alta actividad enzimática que presentan son los siguientes:

**Tabla 8.** Consorcios microbianos seleccionados para continuar con el Aislamiento Microbiano.

<b>Consortio Microbiano</b>	<b>Características</b>
HMA-2	Actividad Amilolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a temperatura ambiente. Formación de biofilm.
HMB-1	Actividad Amilolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a 37 °C.
HMB-2	Actividad Amilolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a 37 °C.
HMB-3	Actividad Amilolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a 37 °C.
C-1	Actividad proteolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a 37 °C.
C-2	Actividad proteolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a 37 °C.
C-3	Actividad proteolítica. Consorcio halófilo, crecimiento a 37 °C.
E-1p	Actividad proteolítica. Consorcio termófilo, crecimiento a 80 °C.
E-2p	Actividad proteolítica. Consorcio termófilo, crecimiento a 80 °C.
E-3p	Actividad proteolítica. Consorcio termófilo, crecimiento a 80 °C.
E-4p	Actividad proteolítica. Consorcio termófilo, crecimiento a 80 °C.
E-5p	Actividad proteolítica. Consorcio termófilo, crecimiento a 80 °C.
E-6p	Actividad proteolítica. Consorcio termófilo, crecimiento a 80 °C.

**Fuente:** Elaboración propia.

## 7.2 Aislamiento Microbiano.

Después de realizada la técnica para el aislamiento de microorganismos anaerobios, como ser los *Tubos Roller* y el *Cultivo Bifásico*, se recuperaron las colonias obtenidas; se las inoculó en un medio líquido, realizándose posteriormente una tinción Gram, observando que el crecimiento en consorcio permanecía a pesar de haber recuperado solo una colonia, se observan varias formas microbianas, además de la presencia de un biofilm formado sobre el almidón parcialmente soluble, para el caso del consorcio HMA-2.

En el caso de los consorcios extremófilos E-1p-E-6p y E-3<sup>a</sup>-E-6<sup>a</sup> se observó crecimiento de colonias tipo swarming, tanto en el medio de cultivo de tubos Roller como en la fase sólida del cultivo bifásico; el cual impedía la recuperación de una sola colonia. Además se presentaron dificultades para el mantenimiento de un medio sólido a la temperatura óptima de crecimiento del consorcio microbiano, a 80 °C. Es por esto que se decidió que la temperatura de crecimiento para la realización de esta técnica sea de 60 °C, aún de esta manera se observó crecimiento en forma de colonia tipo swarming.

**Tabla 9.** Observación de la tinción Gram, después de la recuperación de una sola colonia de los tubos roller y cultivo bifásico.

Consorcio Microbiano	Tinción Gram
HMA-2	Cocos (G (+)), bacilos (G(+ y -)), presencia de biofilm que une las bacterias.
HMB-1	Cocos (G(+)), bacilos (G(-)), bacilos largos (G(-)).
HMB-2	Cocos (G(+)), bacilos(G(-)).
HMB-3	Cocos (G(+)), diplococos (G(+)).
C-1	Cocos (G(+)), diplococos (G(+)).
C-2	Cocos (G(+)), bacilos(G(+) y G(-)).
C-3	Cocos (G(+)), bacilos largos(G(-)).
E-1p	Imposible recuperar colonias.
E-2p	Imposible recuperar colonias.
E-3p	Imposible recuperar colonias.
E-4p	Imposible recuperar colonias.
E-5p	Imposible recuperar colonias.
E-6p	Imposible recuperar colonias.

Fuente: Elaboración propia.

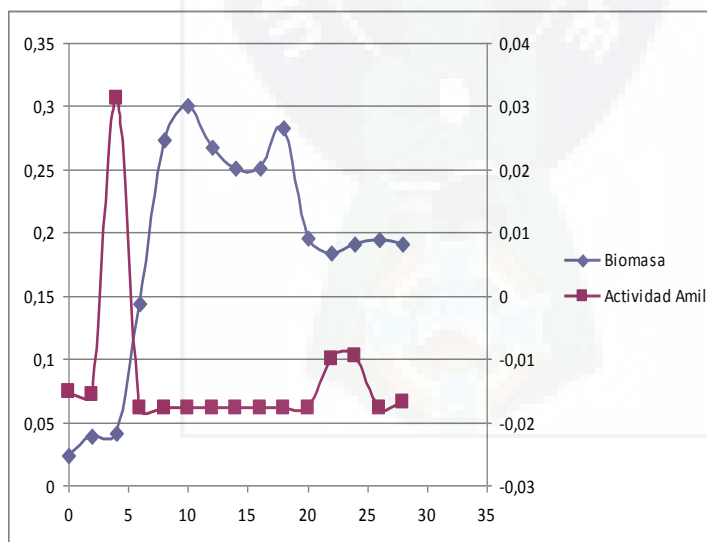
Luego de observar los resultados obtenidos, para cada uno de los consorcios, se decidió realizar diluciones del consorcio elegido anteriormente y trabajar solamente con las que presenten mayor actividad enzimática en ambos casos. Es por esto que para el consorcio productor de amilasas se trabajó con el consorcio inicial HMA-2 y para la producción de proteasas escogiendo la dilución 1/10000 del consorcio E-1p.

### 7.3 Determinación de Biomasa Microbiana Vs Actividad Enzimática.

#### 7.3.1 Consorcios productores de Amilasas.

Los gráficos están elaborados en función a una prueba de 30 días, con determinaciones cada 48 horas, se grafica Tiempo en las abscisas y en las ordenadas Biomasa y Actividad Amilolítica.

En las gráficas que se presentan en todos los casos, se observa que la determinación de la biomasa es variable, esto debido a que el crecimiento microbiano se realiza como consorcio, observando gráficas que no son parecidas a las que se observan cuando se hace la determinación de la biomasa para una bacteria pura.

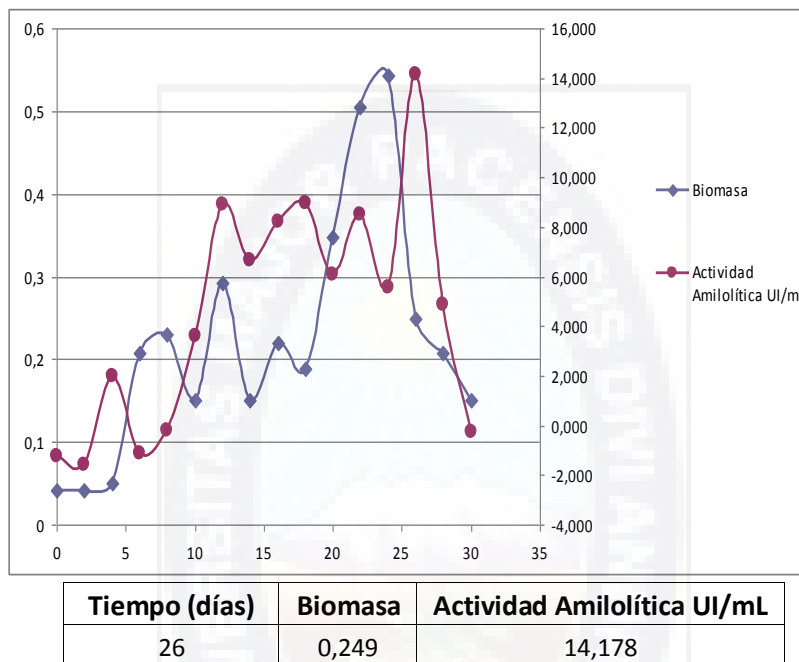


Tiempo (días)	Biomasa	Actividad Amilolítica UI/mL
4	0,041	0,031189084

**Figura 2.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Amilolítica del consorcio HMA-1, productor de enzimas amilolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.

Fuente: Elaboración Propia

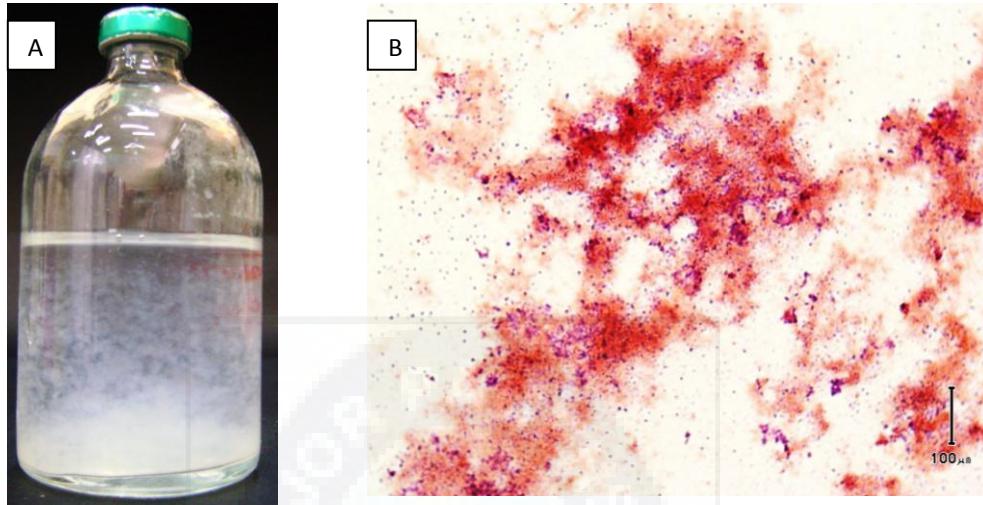
El consorcio HMA-1, expresado en la figura, muestra que la producción enzimática no es significativa, debido a que solo hay un punto de actividad alta, el cual no es estable ni repetitivo en las siguientes determinaciones.



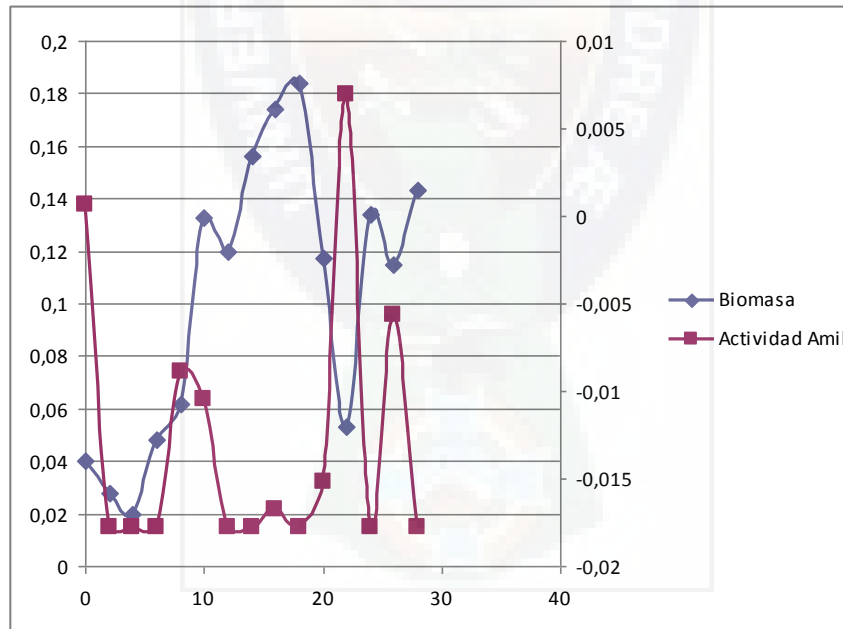
**Figura 3.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Amilolítica del consorcio HMA-2, productor de enzimas amilolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.

**Fuente:** Elaboración Propia.

Como se puede observar en la figura 8, del consorcio HMA-2, la actividad enzimática es bastante estable desde el día 10 hasta el día 28, así mismo la biomasa microbiana es bastante inestable, debido a la formación de un biofilm a partir del día 6 de cultivo, en el cual se observa a los microorganismos del consorcio embebidos en el mismo al realizar una tinción Gram. En la figura 4 se observa la conformación macroscópica y microscópica del consorcio microbiano, siendo claramente un fenómeno de “biofiling”.



**Figura 4.** Imagen de la formación del biofilm del consorcio HMA-2. **A.** en el medio de cultivo y **B.** Vista al microscopio del mismo, en la que se pueden ver las formas microbianas embebidas en el mismo, que corresponde a la nube de sustancias poliméricas extracelulares que se observan en la fotografía, observando formas de cocos Gram(+), Gram(-) y bacilos Gram(-).



Tiempo (días)	Biomasa	Actividad Amilolítica UI/mL
22	0,053	0,00695432

**Figura 5.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Amilolítica del consorcio HMB-1, productor de enzimas amilolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.

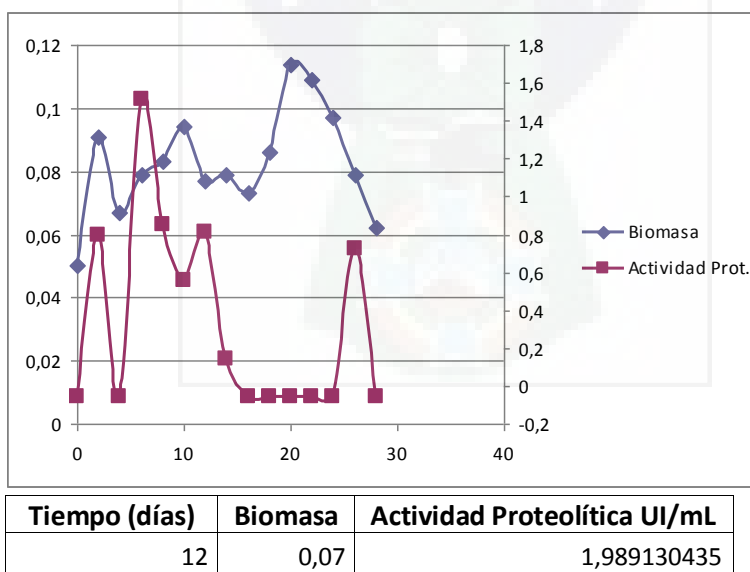
**Fuente:** Elaboración Propia

Observamos que el consorcio microbiano HMB-1 sólo presenta algunos picos de actividad amilolítica alta, presentando la mayor actividad el día 22 de cultivo, sin embargo la misma no es estable a través del tiempo.

Luego de todos los resultados obtenidos de la evaluación de 14 consorcios microbianos productores de amilasas, en distintas condiciones, todos con características extremófilas, se decidió escoger el consorcio HMA-2, como el mejor productor de amilasas, procediendo con la elaboración de un Diseño Factorial y la posterior identificación molecular del consorcio.

### 7.3.2 Consorcios productores de Proteasas.

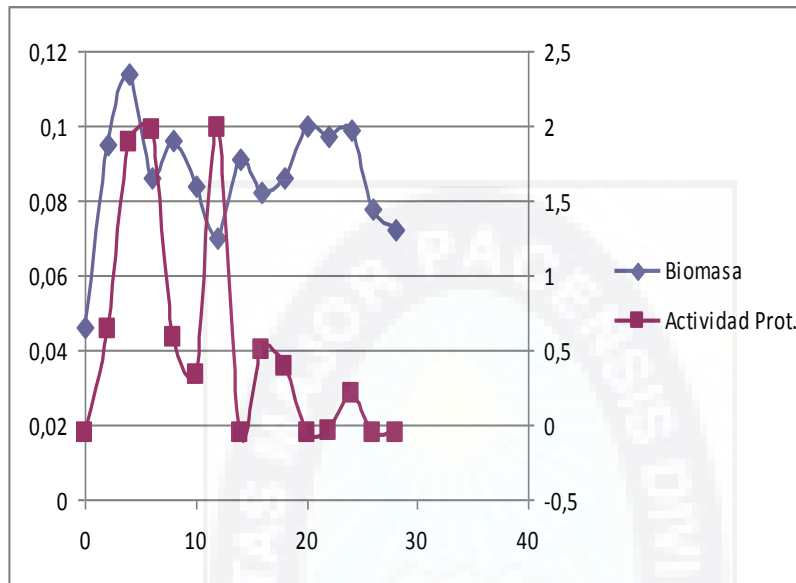
Se presentan las gráficas obtenidas para las determinaciones de Biomasa, Actividad Proteolítica en función del tiempo de cultivo del consorcio microbiano, las determinaciones se realizaron cada 48 horas por un período de 30 días debido a que los consorcios a ser evaluados, presentaban un crecimiento lento, la temperatura de incubación para este ensayo fue de 80°C.



**Figura 6.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-1p, productor de enzimas proteolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.

Fuente: Elaboración Propia.

La figura 6 muestra que si bien se presentan varios picos de actividad proteolítica alta, esta no es estable a través del tiempo.



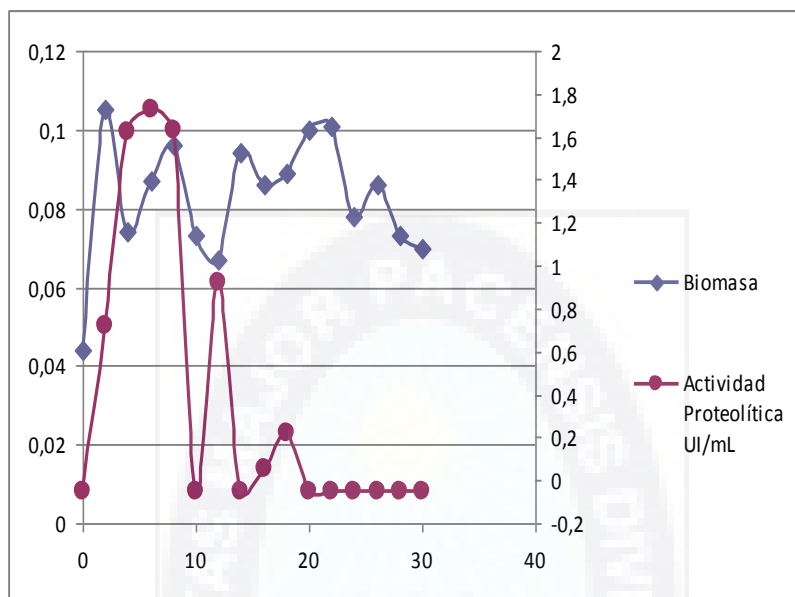
Time (days)	Biomasa	Actividad Proteolítica UI/mL
6	0,079	1.515217391

**Figura 7.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-2p, productor de enzimas proteolíticas. Determinaciones realizadas cada 48 horas.

**Fuente:** Elaboración Propia

Se advierte que la actividad proteolítica del consorcio microbiano E-2p, no es estable, a pesar de mostrar tres picos de actividad alta, no es la suficiente, como la presentada por otros consorcios microbianos evaluados. Además, los puntos no son estables a través del tiempo.



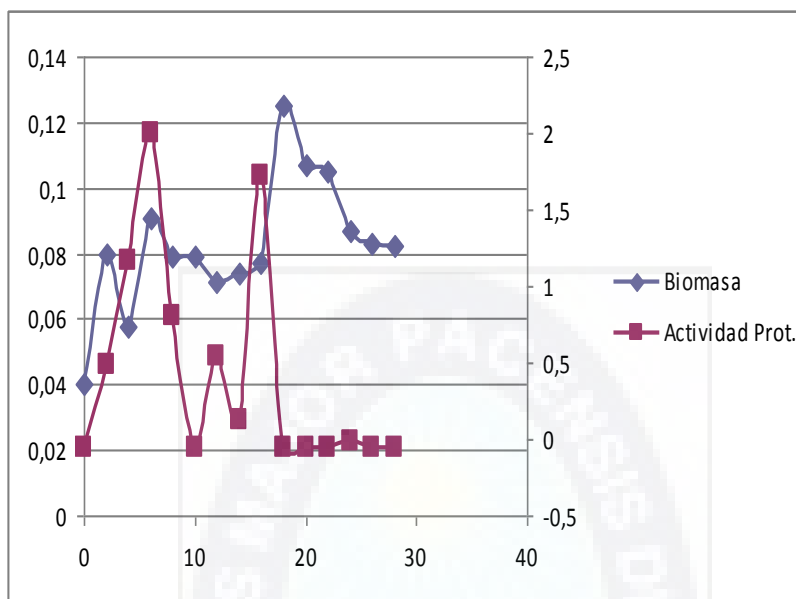


Tiempo (días)	Biomasa	Actividad Proteolítica UI/mL
4	0,074	1,626086957
6	0,087	1,726086957
8	0,096	1,630434783

**Figura 8.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ , productor de enzimas proteolíticas.

**Fuente:** Elaboración Propia.

La figura 8 expone el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ , presenta una actividad proteolítica alta a comparación de los otros consorcios evaluados, además que se mantiene estable en 3 puntos, esto quiere decir que en seis días de determinación la actividad proteolítica se mantiene estable.



Tiempo Días	Biomasa	Actividad Proteolítica UI/mL
6	0,091	1,995652174

**Figura 9.** Cinética de crecimiento de Biomasa y Actividad Proteolítica del consorcio E-2p dilución  $10^{-4}$ , productor de enzimas proteolíticas.

**Fuente:** Elaboración Propia.

Se observan claramente dos picos de actividad, bastante altos e inestables a través del tiempo.

Debido a los resultados obtenidos y las determinaciones realizadas para 14 consorcios microbianos productores de proteasas, todos con características termófilas con una temperatura de crecimiento de  $80^{\circ}\text{C}$ , incluyendo entre los mismos las diluciones realizadas previamente para provocar el aislamiento microbiano, se decidió continuar con el Diseño Factorial y la Identificación Molecular con el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ , gracias a la estabilidad de la actividad proteolítica en 3 determinaciones, una característica que no presentó ninguno de los consorcios evaluados. Se concluyó que la actividad proteolítica podía ser mejorada, adaptando las condiciones del medio de cultivo para generar un estrés en el consorcio microbiano que provoque un aumento en la actividad proteolítica,

optimizando de esta manera la producción de proteasas para el aprovechamiento de las mismas en distintas aplicaciones biotecnológicas.

En ambos casos, amilasas y proteasas, respectivamente, se decidió realizar un diseño factorial, debido a que los consorcios bacterianos elegidos presentaban alta actividad enzimática, mostrando que era posible optimizar las condiciones del medio de cultivo provocando un estrés en los microorganismos para obteniendo así mayor actividad enzimática, es por esto que se cambian las condiciones del medio de cultivo, sabiendo que las enzimas producidas por los microorganismos son extracelulares debido a que presentan alta actividad en el sobrenadante del medio de cultivo

#### **7.4 Diseño Factorial.**

El diseño factorial presentado para ambos casos, fue realizado en un período de 30 días, realizando determinaciones cada 48 horas. Los datos obtenidos al final del experimento, se analizaron con el programa STATISTICA 8, realizando un análisis de Anova Factorial para cada uno de los casos presentados.

##### **7.4.1 Consorcio HMA-2 productor de Amilasas.**

Se realizó un diseño factorial para el consorcio HMA-2 el cual presenta la formación de un biofilm a medida que el medio de cultivo tiene más días, además el consorcio elegido es el que tiene mayor producción de enzimas amilolíticas. Se utilizaron altas concentraciones de Cloruro de Sodio debido a que el consorcio presenta crecimiento halófilo, debido a que crece a una concentración de cloruro de sodio de 60 g/L. Se modificó el pH de crecimiento para observar si desaparece la formación del biofilm y al mismo tiempo aumenta la actividad amilolítica.

Se realizó un diseño factorial de  $4^2$  en el cual se utilizaron como variables la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) y el pH del medio de cultivo.

El diseño factorial resultante es:

**Tabla 10.** Diseño Factorial propuesto, modificaciones en el medio de cultivo. Variables independientes: pH y concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Amilolítica.

Experimento	pH	Concentración NaCl (g/L)
1	5	20
2	5	40
3	5	60
4	5	80
5	7	20
6	7	40
7	7	60
8	7	80
9	9	20
10	9	40
11	9	60
12	9	80
13	11	20
14	11	40
15	11	60
16	11	80



**Figura 10.** Se presentan todos los medios de cultivo utilizados en el diseño factorial propuesto.

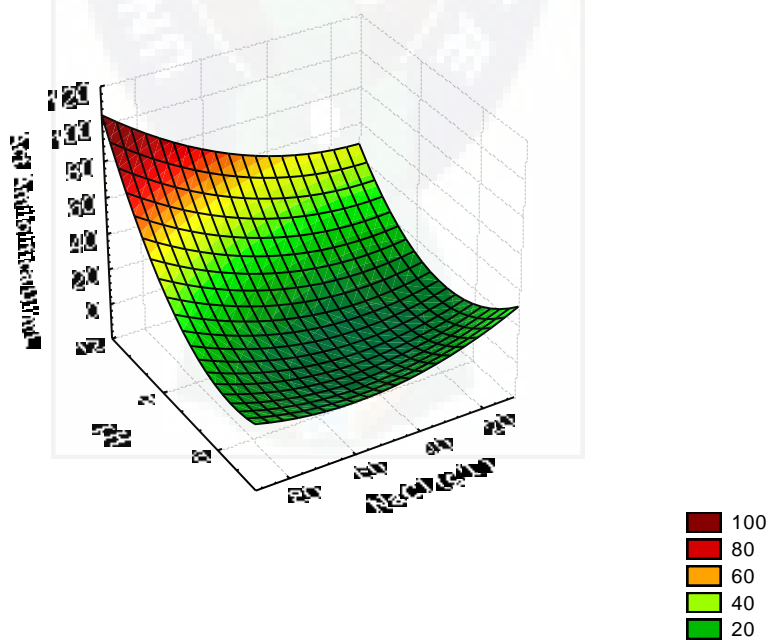
Como se puede observar en la siguiente tabla, los datos analizados con el programa STATISTICA 8, nos muestra el siguiente análisis estadístico.

**Tabla 11.** Análisis estadístico de datos, obtenidos del diseño factorial para el consorcio HMA-2, con el programa STATISTICA 8.

Regression Summary for Dependent Variable: Act amilolitica UI/ml (Spreadsheet1) R= .80893449 R<sup>2</sup>= .65437501 Adjusted R<sup>2</sup>= .60120194 F(2,13)=12.307 p<.00100 Std.Error of estimate: 12.687

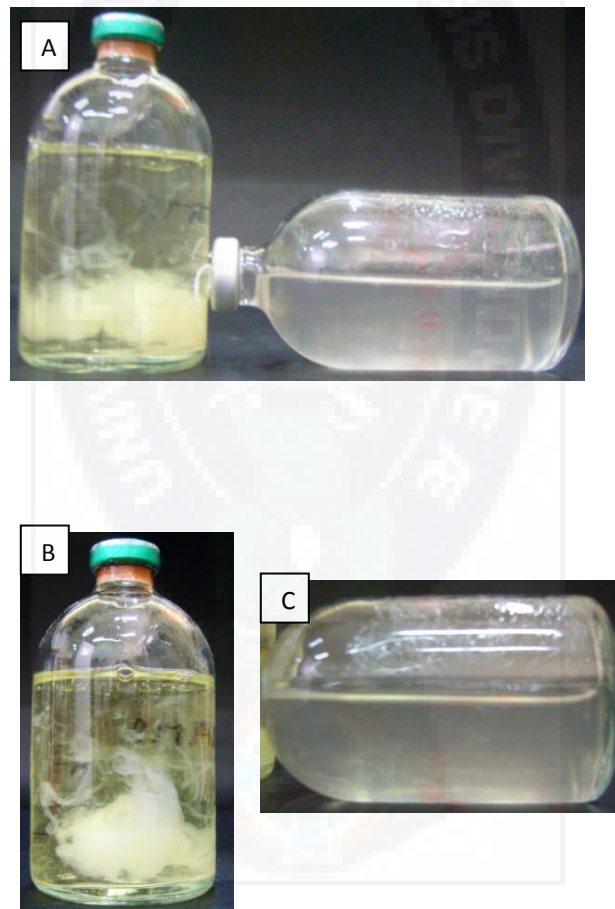
	Beta	Std. Err. De Beta	B	Std. Err. De B	t (13)	Nivel-p
Intercepto			-45.8642	13.75235	-3.33501	0.005373
pH	0.746946	0.163054	6.4979	1.41845	4.58098	0.000515
NaCl	0.310558	0.163054	0.2702	0.14184	1.90464	0.079191

Como revela la tabla 11, el valor p es menor a 0.00100, mostrando en la tabla siguiente que el pH es estadísticamente significativo al obtener un valor de 0.000515; esto quiere decir que la mayor producción de Amilasas se da a pH 11 con un aumento en la producción de las mismas que es altamente significativo. Llegando a obtener una producción óptima a dicho pH, sin embargo la concentración de NaCl no es estadísticamente significativa para la producción de proteasas, pudiendo utilizar cualquier concentración de las propuestas para su producción.

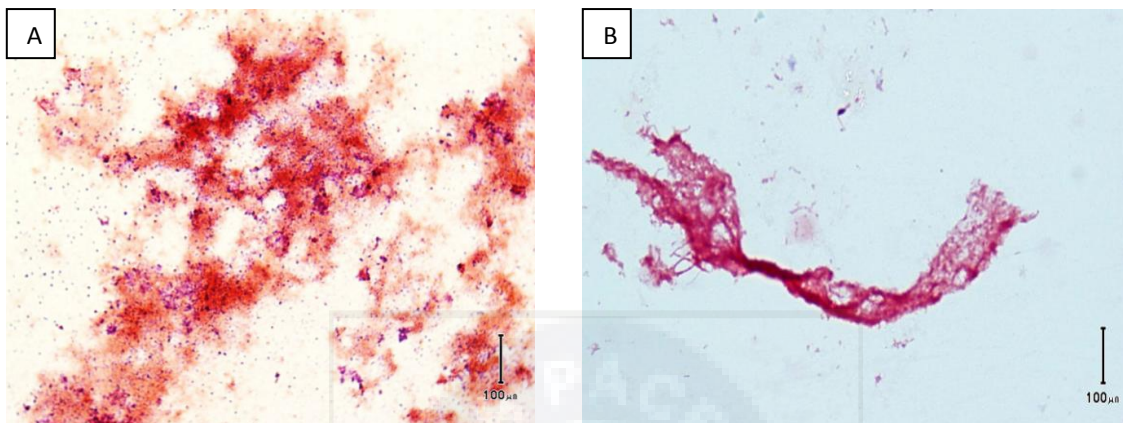


**Figura 11.** Se presenta la superficie de respuesta del diseño factorial. Variables independientes: pH y Concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Amilolítica.

En la Figura 11 podemos observar la superficie de respuesta obtenida del análisis de los datos. Se revela que el aumento de la actividad amilolítica se da a pH 11 con 40g/L de NaCl. Además esta condición a la cual el consorcio tiene mejor actividad muestra un cambio en la formación del biofilm que inicialmente es producido. El biofilm microbiano se encuentra pegado al vidrio en el cual es preparado el medio de cultivo como se presenta en la siguiente figura comparativa. Observando también un cambio en la morfología microscópica del biofilm.



**Figura 12.** A. Cambio en la forma macroscópica del biofilm microbiano. B. Se observa el biofilm producido por el consorcio inicial HMA-2. C. Biofilm pegado al vidrio, a pH 11 y 40g/L de NaCl.



**Figura 13.** Cambio en la morfología microscópica del biofilm, **A.** Fotografía de la Tinción Gram del que muestra el biofilm formado por el consorcio HMA-2 **B.** Se presenta la fotografía del biofilm formado a pH 11 y 40g/L de NaCl.

El hecho de que el consorcio microbiano empleado para este estudio forme un biofilm, lo vuelve mucho más interesante debido a que este campo de investigación está comenzando a desarrollarse. El uso de microorganismos productores de biofilm es importante para el diseño de biorreactores a gran escala, puesto que el mismo se convierte en un soporte para los microorganismos evitando el uso de soportes extraños como piedras y telas que aumentan los costos de producción de los mismos.

#### **7.4.2 Consorcio E-1p dilución $10^{-4}$ productor de Proteasas.**

##### **7.4.2.1 Primer Diseño Factorial.**

Se utilizó el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ . Debido a que el mismo presenta una zona estable para la producción de proteasas en el experimento previo (Figura 12), en la cual se observa una zona estable alta actividad proteolítica, durante 3 determinaciones.

Se realizó un diseño factorial de  $2^2$  en el cual se utilizaron como variables la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) y el pH del medio de cultivo.

Se presenta el siguiente diseño factorial:

**Tabla 12.** Diseño Factorial propuesto, modificaciones en el medio de cultivo. Variables independientes: pH y concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Proteolítica.

Experimento	pH	Concentración NaCl (g/L)
1	7	1.5
2	7	20
3	9	1.5
4	9	20

Es necesario señalar que la determinación de la respuesta observada en función de la forma en la que se afecta la biomasa, no es determinante porque el medio de cultivo presenta mucho precipitado, por la alta concentración de sales en el mismo y a la temperatura a la que fue sometido: 80°C, como se observa en la Figura 18.

Se realiza directamente el análisis de la respuesta del cambio de condiciones en el medio de cultivo en relación a la Actividad Proteolítica del consorcio microbiano extremófilo E-1p dilución  $10^{-4}$ .



**Figura 14.** Medio de cultivo control con la misma turbidez que un medio de cultivo inoculado con 30 días de incubación.



Luego de realizado el experimento y las determinaciones se analizaron los datos obtenidos con el programa STATISTICA 8, se realizó un análisis de tipo ANNOVA factorial, obteniendo los siguientes datos estadísticos.

**Tabla 13.** Análisis de los datos estadísticos obtenidos para el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$  con ayuda del programa STATISTICA 8.

Regression Summary for Dependent Variable: Act. proteolitica UI/mL (Spreadsheet1) R= .55300693 R<sup>2</sup>= .30581667 Adjusted R<sup>2</sup>= .15155371 F(2,9)=1.9824 p<.19348 Std.Error of estimate: .82916

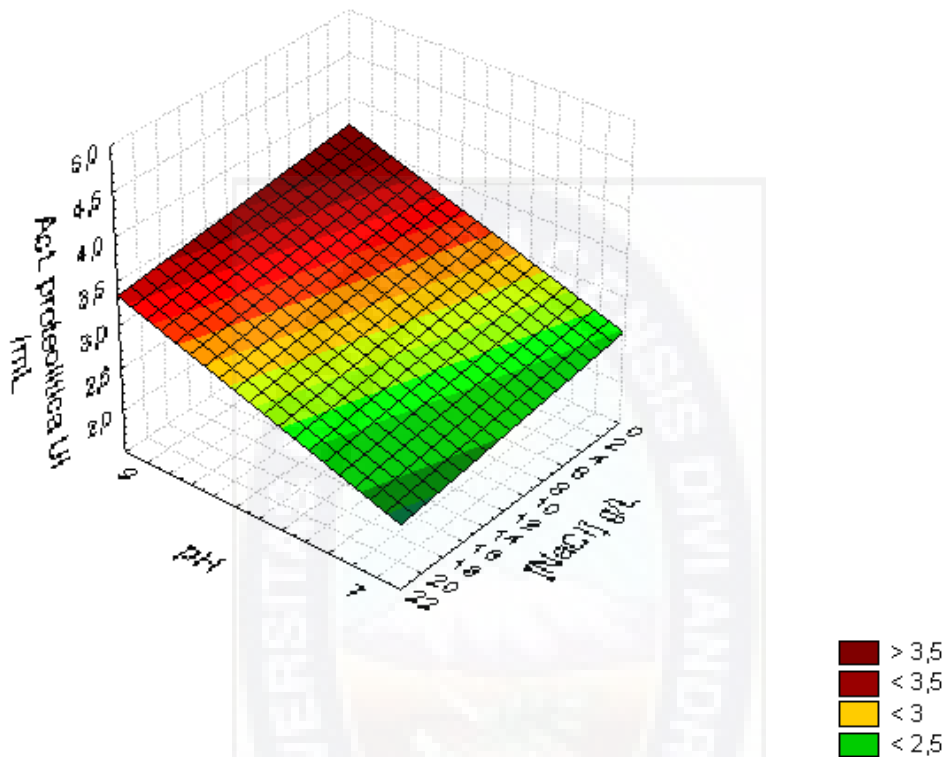
	<b>Beta</b>	<b>Std. Err. De Beta</b>	<b>B</b>	<b>Std. Err. De B</b>	<b>t (9)</b>	<b>Nivel-p</b>
Intercepto			-0.497982	1.949704	-0.255414	0.804145
pH	0.527162	0.277726	0.454333	0.239357	1.898141	0.090156
NaCl	-0.167083	0.277726	-0.015568	0.025876	-0.601612	0.562279

La tabla revela que los datos obtenidos en el análisis realizado no son estadísticamente significativos, porque se presenta un valor p de 0.090156 y ninguna de las variables analizadas presenta un valor igual o menor al mismo. Sin embargo, se observa una buena respuesta del consorcio microbiano incrementando la actividad proteolítica a medida que el pH se incrementa y la concentración de Cloruro de Sodio no es determinante en este momento para la misma.

En la Figura 15 podemos observar la superficie de respuesta del consorcio microbiano hacia las dos variables modificadas en el medio de cultivo, pH y concentración de NaCl.

La actividad proteolítica es mayor a medida que se aumenta el pH del medio de cultivo, por lo cual se obtiene como consorcio altamente productor de proteasas el que tiene una condición de pH 9 y una concentración de NaCl de 1.5 g/L, demostrando que la concentración de NaCl no es significativa para el aumento de la actividad proteolítica. Siguiendo una tendencia a aumentar la actividad proteolítica a medida que se incrementa el pH del medio de cultivo, de acuerdo con estudios anteriores realizados por otros

autores que demuestran que las proteasas son producidas en gran cantidad por consorcios microbianos alcalófilos.



**Figura 15.** Superficie de respuesta de variables pH y concentración de Cloruro de Sodio, NaCl, sobre la Actividad Proteolítica.

Podemos observar que la actividad proteolítica está en función al cambio de pH que se realiza. No es significativo en cuanto a la concentración de NaCl.

Debido a que los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos, se decidió realizar un diseño factorial adicional, aumentando modificaciones en el medio de cultivo, siguiendo la tendencia que nos muestra este primer diseño factorial, lo cual quiere decir que a mayor pH, la actividad proteolítica incrementa, incrementando las variables independientes como el pH en valores mayores que el pH 7 en el cual el consorcio inicial crece, además de observar si la concentración de NaCl no es influyente en la producción de proteasas añadiendo un valor intermedio a los que se probaron en este experimento.

### 7.4.2.2 Segundo Diseño Factorial.

Se realizó un segundo diseño factorial aumentando la cantidad de experimentos, con el objetivo de obtener resultados estadísticamente significativos y siguiendo la tendencia que el anterior diseño factorial mostró.

Un diseño factorial de  $2^3$  en el cual se utilizaron como variables la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) y el pH del medio de cultivo. Las variables analizadas fueron las siguientes:

**Tabla 14.** Diseño Factorial propuesto, modificaciones en el medio de cultivo. Variables independientes: pH y concentración de NaCl (g/L). Variable dependiente: Actividad Proteolítica.

Experimento	pH	Concentración NaCl (g/L)
1	7	1.5
2	7	10
3	7	20
4	9	1.5
5	9	10
6	9	20
7	11	1.5
8	11	10
9	11	20



**Figura 16.** Se presentan todos los medios de cultivo utilizados en el diseño factorial propuesto para el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ .

En la siguiente tabla podemos observar los datos obtenidos a lo largo del diseño factorial y analizados estadísticamente.

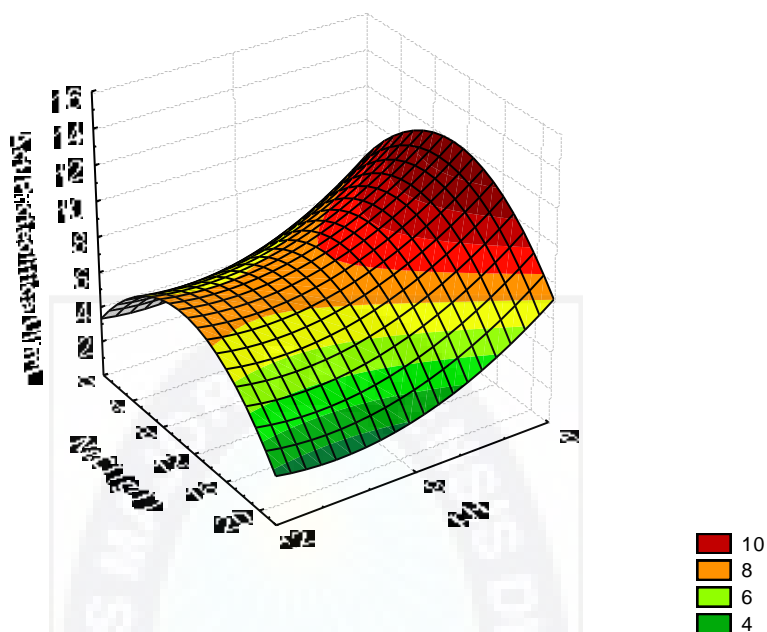
**Tabla 15.** . Análisis estadístico de datos, obtenidos del diseño factorial para el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ , con el programa STATISTICA 8.

Regression Summary for Dependent Variable: Act proteolitica UI/ml (Spreadsheet1) R= .43990895  
 $R^2 = .19351988$  Adjusted  $R^2 = \text{-----}$   $F(2,6) = .71987$   $p < .52454$  Std.Error of estimate: 3.0132

	<b>Beta</b>	<b>Std. Err. De Beta</b>	<b>B</b>	<b>Std. Err. De B</b>	<b>t (6)</b>	<b>Nivel-p</b>
Intercepto			13.12686	5.796226	2.26473	0.064131
pH	-0.435636	0.366624	0.73083	0.615057	-1.18824	0.279637
NaCl	-0.061163	0.366624	-0.02216	0.132840	-0.16683	0.872986

El diseño factorial propuesto muestra una respuesta mucho más clara y favorable, se observa que la mejor condición para la producción de proteasas es a pH 7 y 10g/L de concentración de Cloruro de Sodio. Por los datos analizados se muestra un valor p de 0.52454, comparando el mismo con el valor del intercepto (significancia estadística en la interacción de las variables) este es altamente significativo, con un valor p de 0.064131 y el valor p de la variable independiente pH con 0.279637 que es significativo.

Con estos valores presentados podemos decir que la interacción entre las dos variables independientes: pH y concentración de NaCl sobre la variable dependiente: Actividad Proteolítica, es estadísticamente significativa, como se observa en la superficie de respuesta observa en la siguiente figura.



**Figura 17.** Superficie de respuesta de variables pH y concentración de Cloruro de Sodio, NaCl, sobre la Actividad Proteolítica

Se observa en la figura 17, que la respuesta del consorcio microbiano es mucho más clara a las condiciones ya indicadas, y a comparación del diseño factorial anterior, mostrando a la condición pH 7 y concentración de NaCl 10 g/L una Actividad Proteolítica máxima de 13,908 UI/mL, incrementando en 6 veces la Actividad Proteolítica de las condiciones iniciales del consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ . Realizando una comparación de esta actividad con estudios realizados por Sanchez, T. (43) que muestra un resultado máximo de Actividad Proteolítica en una bacteria aislada de efluentes marinos de 10.37 UI/mL, y el estudio propuesto por SUN-OG (44) en el cual se observa una actividad proteasa máxima de 8.2 UI/mL de una *Pseudoalteromonas cepa A28*.

La producción de proteasas con actividades altas es importante en la industria debido a la gran cantidad de aplicaciones que presentan. Entre ellas es posible citar la industria de detergentes, que incorpora enzimas proteolíticas de microorganismos extremófilos en los productos, por la gran resistencia y tolerancia que éstas presentan en medios que contienen detergentes y solventes orgánicos.

Así también la industria del cuero, que trabaja en condiciones ácidas, observando que las proteasas de los extremófilos son estables a un amplio rango de pH sin perder actividad de manera significativa.

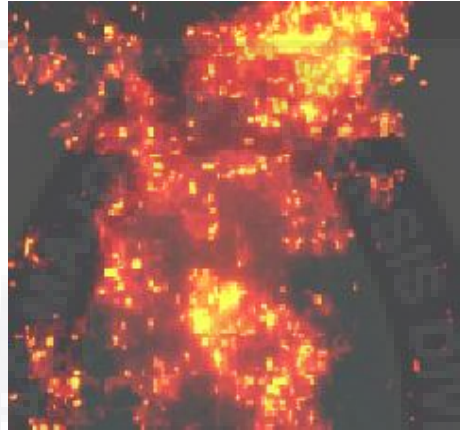
En la biorremediación de suelos contaminados con altas concentraciones de proteínas o en caso de lixiviados de desechos de basura los cuáles tienen alta carga proteica, como es el caso del “Botadero Municipal de Alpacoma” en la ciudad de La Paz, en el cual se observa alta concentración proteica que no puede ser degradada, añadiendo que la temperatura a la cual se trabaja, es de 4°C aproximadamente. Las enzimas proteolíticas estudiadas presentan actividad proteolítica alta, hasta esta temperatura y pueden ser aplicadas a los lixiviados dando una respuesta ecológica y efectiva ante este problema. Según los datos obtenidos por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

En los últimos años se realizan estudios acerca del uso de proteínas y enzimas de microorganismos extremófilos como biosensores para tener herramientas de diagnóstico más sensibles y certeras, en todo tipo de enfermedades debido a su alta estabilidad en distintas condiciones, como temperatura, pH, concentraciones salinas extremas, estabilidad prolongada a determinada temperatura, estabilidad ante concentraciones de solventes orgánicos y detergentes, otros, que hacen de las extremozimas importantes herramientas de estudio (59).

#### **7.5 Identificación de consorcios productores de Amilasas y Proteasas por Hibridación Fluorescente *in situ*.**

El análisis molecular fue realizado para los consorcios sometidos al diseño factorial, tomando en cuenta solo aquellos que presentan variaciones de actividad enzimática y un comportamiento diferente para el caso del consorcio HMA-2 con la producción de biofilm de forma diferente.

**Tabla 16.** . Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) para los resultados más relevantes del diseño factorial propuesto para microorganismos productores de amilasas, del consorcio HMA-2. (siguiente página)



**Figura 18.** Se muestra una fotografía del análisis del consorcio HMA-2, con la sonda para eubacterias EUB marcado con CY3; se observan cocos y esporas libres, también el biofilm en el que se encuentran las bacterias.

**Tabla 16.** Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) para los resultados más relevantes del diseño factorial propuesto para microorganismos productores de amilasas, del consorcio HMA-2

Nombre de la Sonda	Consortio Inicial HMA-2 (pH 7 NaCl 60 g/L)		HMA-2 (pH 9 NaCl 80 g/L)		HMA-2 (pH 11 NaCl 20g/L)		HMA-2 (pH 11 NaCl 40g/L)		HMA-2 (pH 11 NaCl 60g/L)		HMA-2 (pH 11 NaCl 80g/L)	
	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
<b>EUB</b>	Cocos, diplococos	Diplococos, bacilos largos	Cocos, diplococos, esporas libres.	Estreptobacilos, esporas libres.	Cocos, diplococos, esporas libres.	Esporas libres (+++)	Cocos.	Esporas libres.	Cocos, diplococos, esporas libres.	Esporas libres.	Cocos, esporas libres.	Esporas libres.
<b>ALPHA proteobacterias</b>		Cocos		Cocos		Cocos		Cocos		Cocos		Cocos
<b>BETA proteobacterias</b>		Cocos, diplococos		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.
<b>GAMMA proteobacterias</b>		Cocos, diplococos, cocobacilos		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.
<b>DELTA proteobacterias</b>		Cocos		Cocos		Cocos		Cocos		No se observa ninguna forma bacteriana.		No se observa ninguna forma bacteriana.
<b>MSMX860</b>	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos, diplococos.	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos
<b>MX825</b>	Cocos, diplococos, cocobacilos	Cocos	Cocos (++)	Cocos, diplococos.	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos, esporas libres.	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos
<b>MG1200b</b>	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos, diplococos.	Cocos, diplococos (++)	Cocos	Cocos	Cocos, esporas libres.	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos
<b>MC504</b>	Diplococos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos, estreptococos.	Cocos	Cocos	No se observa ninguna forma bacteriana	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos
<b>DSS658</b>	Diplococos, bacilo	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos, esporas libres.	Cocos	Cocos
<b>DSB985</b>	Diplococos, bacilo	Cocos	Cocos, esporas libres.	Cocos, esporas libres.	Cocos, esporas libres.	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos
<b>DFM228</b>	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos

Las variantes al medio de cultivo siguientes: HMA-2 pH 9 NaCl 80g/L, HMA-2 pH 11 NaCl 20g/L, HMA-2 pH 11 NaCl 40g/L, HMA-2 pH 11 NaCl 60g/L y HMA-2 pH 11 NaCl 80g/L. Todas las muestras fueron procesadas para ambos tipos de bacterias: Gram (+) y Gram (-). Las sondas que fueron analizadas para tal efecto son las siguientes: **EUB** = Sonda específica para Eubacterias. **ALFA**= alfaproteobacterias. **BETA**=betaproteobacterias. **GAMMA**=gammaproteobacterias **DELTA**=deltaproteobacterias **MSMX860** = Methanosarcinales (Methanosarcina y Methanosaeta). **MX825** = Sonda específica para Methanosaeta. **MG1200b**=Methanosarcinales. **MC504**=Methanosarcinales. **DSS658**=Desulfosarcina spp., Desulfofaba sp., Desulfococcus spp., Desulfofrigus spp. **DSB985**= Desulfobacter spp., Desulfobacula spp. **DFM228**= Desulfobacter spp



El análisis de FISH sobre el consorcio HMA-2 productor de amilasas nos muestra que el consorcio inicial que se desarrolla a una concentración de NaCl de 60g/L y pH 7, está compuesto de microorganismos que hibridan con todas las sondas probadas, especialmente los cocos, en este caso particular podríamos decir que esta morfología de microorganismo observada pertenece al grupo de las Archaeas, debido a que evolutivamente son ancestros de las bacterias, teniendo fragmentos de DNA similares a los de las bacterias, pero no idénticos, las diferencias en los mismos son mínimas, es por esto que la sonda hibrida de todas formas, porque tiene la mayor cantidad de nucleóticos similares a los de la sonda bacteriana; aunque las mismas sean específicas para un grupo de bacterias.

Las otras formas microbianas observadas como los diplococos, pertenecen al grupo de las bacterias sulfato-reductoras específicamente de la especie *Desulfosarcina*, *Desulfobaba*, *Desulfococcus*, *Desulfofrigus*, *Desulfobacter* y *Desulfobácula*. Como podemos observar las sondas probadas no son específicas para un tipo de microorganismo debido a la similitud de los fragmentos conservados de RNA r 16S en el que se basa la técnica, la porción de rRNA 16S con el que hibridan las sondas de DNA utilizadas para FISH es un fragmento muy conservado para muchos grupos de bacterias, siendo diferenciadas por algunos nucleótidos, en muchos casos solo uno de ellos, lo cual nos muestra que la técnica nos sirve para identificar grupos de bacterias, pero si quisiéramos identificar bacterias de forma individual deberíamos aislar las bacterias y hacer una extracción de DNA para una identificación específica con ayuda de una secuenciación o utilizar la técnica de DGGE (Electroforesis de DNA en Gradiente Desnaturalizante), que nos permite el análisis de DNA de consorcios microbianos.

Analizando los resultados de la Tabla 16, podemos observar que a medida que se cambian las condiciones del medio de cultivo, la población microbiana cambia por el aumento del pH del medio de cultivo, y como claro ejemplo de ello, podemos ver que con las sondas BETA Y GAMMA no se observan formas bacterianas en las modificaciones de pH en las

cuales se realizó el análisis de FISH y no se observa ninguna forma bacteriana en los pozos que tenían la sonda de GAMMA proteobacterias en el caso de pH 11 con 60 y 80g/L de NaCl respectivamente.

Se debe destacar la presencia de esporas libres que hibridan con las sondas correspondientes al grupo de microorganismos sulfato-reductores, en los cuáles podemos destacar dos sondas, DSB 985, correspondiente a *Desulfobacter spp.* y *Desulfobacula spp.* Concordando con la tinción Gram en la cual se observa bacilos Gram (-) con esporas terminales, las cuales son liberadas al medio de cultivo.

Podemos decir que los consorcios sometidos a la prueba molecular de FISH están compuestos por bacterias del grupo de las Arqueas metanogénicas y de los microorganismos sulfato-reductores, de acuerdo al patrón de hibridación de las sondas probadas para cada caso.

La presencia de formas cocoides con la mayoría de las sondas utilizadas, nos indica que este grupo de microorganismos puede pertenecer al grupo de las Arqueas, es por eso que es necesario realizar el análisis con sondas específicas para Arqueas.

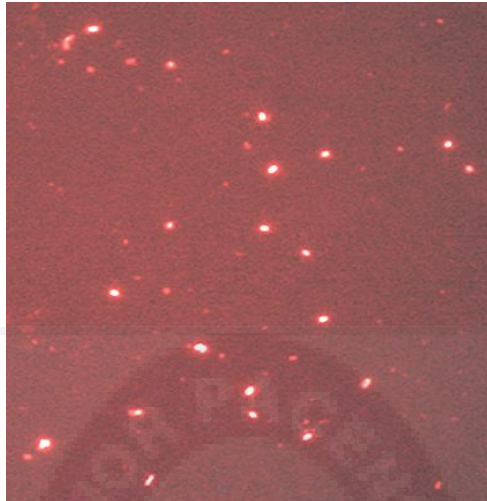
**Tabla 17.** Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) para los resultados más relevantes del primer diseño factorial propuesto para el consorcio productor de proteasas, E-1p dilución  $10^{-4}$  (siguiente página)

**Tabla 17.** Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) para los resultados más relevantes del primer diseño factorial propuesto para el consorcio productor de proteasas, E-1p dilución  $10^{-4}$

SONDA	E-1p $10^{-4}$ pH 9 NaCl 20 g/L		E-1p $10^{-4}$ pH 9 NaCl 1,5g/L		E-1p $10^{-4}$ pH 7 NaCl 20 g/L		E-1p $10^{-4}$ Consortio Inicial pH 7 NaCl 1,5 g/L	
	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
<b>EUB</b>	Cocos, diplococos, cocobacilos	Cocos, diplococos, bacilos	Cocos, dilpococos, bacilos esporulados.	Cocos, dilpococos, bacilos esporulados.	Diplococos, cocos, bacilos esporulados	Diplococos, bacilos esporulados	Bacilos esporulados, cocos, diplococos	Cocos, bacilos
<b>ALFA</b>		Cocos		Cocos.		Diplococos, cocos		Cocos
<b>BETA</b>		Cocos, cocobacilos		Cocos.		Cocos		Cocos
<b>GAMMA</b>		Cocos, diplococos, bacilos		Cocos.		Cocos, diplococos		Cocos
<b>DELTA</b>		Cocos, bacilos		Bacilos esporulados.		Cocos, diplococos, bacilos		Largos
<b>MSMX860</b>	Cocos	Cocos	Cocos.	Cocos.	Cocos, bacilos	Cocos, diplococos	Cocos	Cocos
<b>MX825</b>	Cocos	Diplococos, cocos, sarcinas	Cocos.	Cocos.	Cocos, diplococos	Cocos	Cocos	Cocos, diplococos
<b>MG1200b</b>	Cocos	Cocos, diplococos	Diplococos.	Cocos.	Cocos	Cocos	Esporas libres, cocos, diplococos	Cocos, diplococos
<b>MC504</b>	Diplococos, cocobacilos	Cocos, diplococos, bacilos	Cocos.	Cocos.	Cocos, bacilos	Cocos	Cocos	Cocos
<b>DSS658</b>	Cocos	Cocos	Esporas libres.	Cocos.	Cocos	Cocos (pocos)	<b>Esporas libres, bacilos.</b>	Cocos
<b>DSB985</b>	Cocos	Cocos	Diplococos.	Cocos.	<b>Cocos, bacilos</b>	Diplococos, Cocos	Diplococos	Cocos, diplococos
<b>DFM228</b>	Cocos	Cocos	Cocos.	Cocos.	<b>Cocos</b>	Cocos	Cocos	-----

Las variantes al medio de cultivo, para el diseño factorial propuesto que son las siguientes: E-1p  $10^{-4}$  pH 9 NaCl 20 g/L, E-1p  $10^{-4}$  pH 9 NaCl 1.5 g/L, E-1p  $10^{-4}$  pH 7 NaCl 20 g/L y E-1p  $10^{-4}$  pH 7 NaCl 1.5 g/L , consorcio inicial. Las sondas utilizadas para este análisis son las siguientes:

**EUB** = Sonda específica para Eubacterias. **ALFA**= alfaproteobacterias **BETA**=betaproteobacterias. **GAMMA**=gammaproteobacterias. **DELTA**=deltaproteobacterias. **MSMX860** = Methanosarcinales (Methanosarcina y Methanosaeta). **MX825** = Sonda específica para Methanosaeta. **MG1200b**=Methanosarcinales. **MC504**=Methanosarcinales. **DSS658**=Desulfosarcina spp., Desulfofaba sp., Desulfococcus spp., Desulfotrigus spp. **DSB985**= Desulfobacter spp., Desulfobacula spp. **DFM228**= Desulfobacter spp



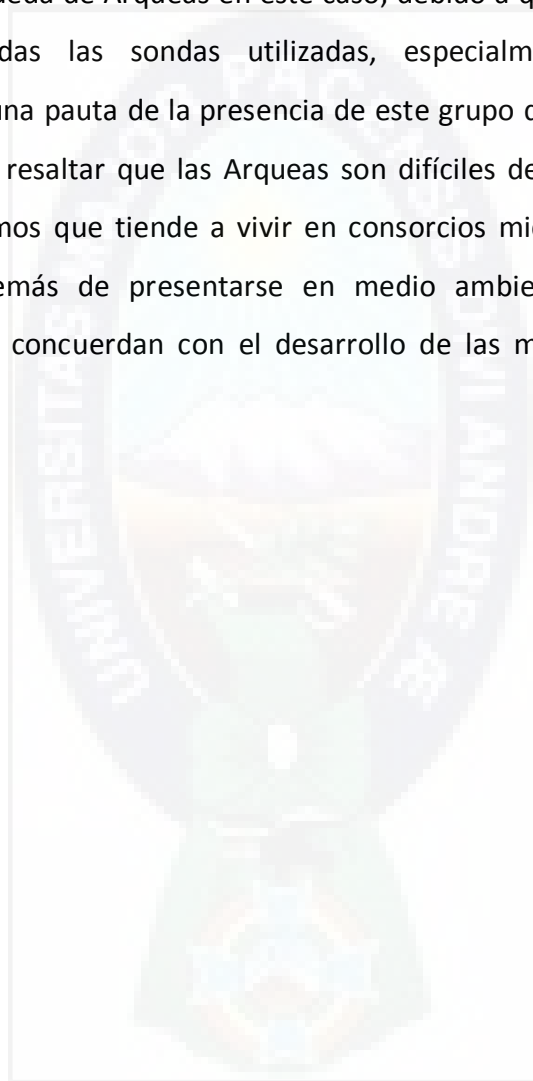
**Figura 19.** Fotografía del análisis FISH del consorcio E-1p, se observan cocos y esporas libres. Marcados con la sonda de eubacterias EUB marcado con CY3.

Para el consorcio termófilo E-1p dilución  $10^{-4}$  se realizó la técnica de identificación molecular en todas las variables que se realizaron para el diseño factorial, para observar si existía algún cambio en la población bacteriana al variar las condiciones del medio de cultivo.

Se observó la presencia de esporas libres en 3 variantes del medio de cultivo pertenecientes al diseño factorial, menos en el medio de cultivo que presenta un pH 9 y NaCl 20g/L. Los mismos hibridan específicamente con la sonda de Delta proteobacterias y posteriormente con la sonda DSS658, correspondiente a *Desulfosarcina spp.*, *Desulfofaba sp.*, *Desulfococcus spp.*, *Desulfofrigus spp.* Lo que muestra que este consorcio posee bacterias correspondientes al grupo de las bacterias sulfato-reductoras además de la presencia de arqueas metanogénicas debido a la hibridación de las sondas correspondientes al grupo de las Arqueas Metanogénicas: MSMX860, MX825, MG1200B Y MC504, en las cuales se observó un cambio de la población en los experimentos del diseño factorial, es así que se observan diplococos, cocos y esporas libres; en los consorcios con pH 9 y NaCl 20g/L, pH 7 y NaCl 20g/L, pH 7 y NaCl 1.5 g/L; siendo que en el consorcio con pH 9 NaCl 1.5 g/L solo se observan cocos, produciendo la mayor actividad

enzimática, entonces se puede afirmar que este cambio en la población microbiana resultó beneficioso para la producción de enzimas proteolíticas.

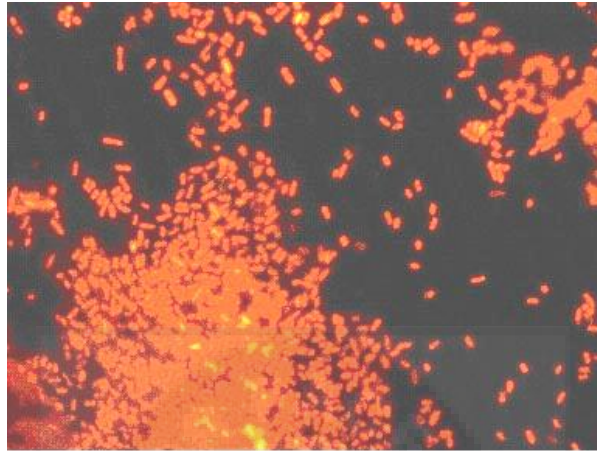
Los resultados nos muestran que este consorcio posee microorganismos del grupo de las bacterias sulfato-reductoras y además de las Arqueas extremófilas, es necesario continuar con el análisis y la búsqueda de Arqueas en este caso, debido a que la presencia de cocos, que hibridan con todas las sondas utilizadas, especialmente con las Arqueas metanogénicas nos da una pauta de la presencia de este grupo de microorganismos en el consorcio, es necesario resaltar que las Arqueas son difíciles de cultivar, porque son un grupo de microorganismos que tiende a vivir en consorcios microbianos que contienen también bacterias, además de presentarse en medio ambientes con características extremófilas, las cuales concuerdan con el desarrollo de las mismas en los medios de cultivo propuestos.



**Tabla 18.** Resultados del Análisis de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) para los resultados más relevantes del segundo diseño factorial propuesto para el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$  productor de proteasas.

Nombre de la Sonda	Consortio inicial E-1p $10^{-4}$ pH 7 NaCl 1.5 g/L		Consortio E-1p $10^{-4}$ pH 7 NaCl 10 g/L	
	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
<b>EUB</b>	Cocos, diplococos, estreptococos, esporas libres.	Cocos, diplococos, esporas libres.	Cocos, diplococos, esporas libres.	<b>Esporas libres.</b>
<b>ALFA proteobacterias</b>		Cocos		Cocos (+++)
<b>BETA proteobacterias</b>		Cocos (+), diplococos.		No se observa ninguna forma bacteriana.
<b>GAMMA proteobacterias</b>		Cocos		No se observa ninguna forma bacteriana.
<b>DELTA proteobacterias</b>		Cocos (+++), diplococos, estreptococos, bacilos alargados.		Cocos.
<b>MSMX860</b>	Cocos	Cocos	Cocos en poca cantidad.	Cocos (+)
<b>MX825</b>	Cocos	Cocos (+++), diplococos.	Cocos (++) diplococos.	Cocos (+), diplococos.
<b>MG1200b</b>	Cocos	Cocos, diplococos.	Cocos (++)	Cocos (++)
<b>MC504</b>	Cocos.	Cocos (+), diplococos.	Cocos, diplococos.	Cocos en poca cantidad.
<b>DSS658</b>	Diplococos, estreptococos, esporas libres.	Cocos.	<b>Esporas libres (+).</b>	<b>Esporas libres.</b>
<b>DSB985</b>	Cocos, diplococos, esporas libres.	<b>Esporas libres.</b>	<b>Esporas libres (+).</b>	Cocos, <b>esporas libres.</b>
<b>DFM228</b>	Cocos, diplococos.	No se observa ninguna forma bacteriana.	Cocos (+++)	No se observa ninguna forma bacteriana.

Se presentan los resultados del consorcio inicial E-1p dilución  $10^{-4}$  y las variantes al medio de cultivo, para el primer diseño factorial propuesto que son las siguientes: E-1p  $10^{-4}$  pH 7 NaCl 1.5 g/L o el consorcio inicial y E-1p  $10^{-4}$  pH 7 NaCl 10 g/L. Todas las muestras fueron procesadas para ambos tipos de bacterias: Gram (+) y Gram (-). Las sondas utilizadas para este análisis son las siguientes: **EUB** = Sonda específica para Eubacterias. **ALFA**= alfa proteobacterias **BETA**=beta proteobacterias. **GAMMA**=gamma proteobacterias. **DELTA**=delta proteobacterias. **MSMX860** = Methanosarcinales (Methanosarcina y Methanosaeta). **MX825** = Sonda específica para Methanosaeta. **MG1200b**=Methanosarcinales. **MC504**=Methanosarcinales. **DSS658**=Desulfosarcina spp., Desulfofaba sp., Desulfococcus spp., Desulfofrigus spp. **DSB985**= Desulfobacter spp., Desulfobacula spp. **DFM228**= Desulfobacter spp



**Figura 20.** Fotografía del consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ , análisis FISH del mismo se observan esporas libres, marcadas con la sonda DSB 985, que corresponde a *Desulfobacter* spp. y *Desulfobacula* spp.

En el segundo diseño factorial propuesto, se analizaron molecularmente solo dos muestras, las más significativas para el mismo, siendo las escogidas, el consorcio proteolítico inicial con características de cultivo a pH 7 y 1,5 g/L de NaCl y el consorcio que mostró un aumento significativo en la actividad proteolítica, a pH 7 y 10 g/L de NaCl.

Una vez más y concordando con el experimento anterior, se observaron formas microbianas, en forma de cocos, que hibridan con la mayoría de sondas propuestas. De los cuales se puede sospechar que pertenecen al grupo de las Arqueas. Debido a que hibridaron en gran cantidad con las sondas correspondientes al grupo de las Arqueas Metanogénicas, se observa también que las sondas correspondientes a las bacterias sulfato-reductoras hibridan con esporas libres, presentes en gran cantidad en ambos casos, concordando con la Tinción Gram, en la cual se observa bacilos Gram (-) con esporas terminales.

La sonda correspondiente a *Desulfobacter* spp., presenta un cambio en la población con la que hibrida en el consorcio inicial, desapareciendo una población correspondiente a diplococos, que nos muestra que la desaparición es favorable para la producción de enzimas proteolíticas.

En este momento del análisis no podemos emitir un juicio acerca de cual es la población que presenta la producción de enzimas proteolíticas y cual de todas ellas es la que vive a expensas de la hidrólisis y los productos metabólicos hidrolizados por las enzimas, sino que este tipo de análisis nos ayuda a saber el tipo de nutrientes que son necesarios para mantener el tipo de microorganismos presentes, la forma de mantenerlos y las condiciones óptimas para el desarrollo de más actividad proteolítica por parte del mismo.

Es importante el establecimiento de esta técnica debido a que se puede comenzar a dar un mejor manejo a los consorcios microbianos, al saber cuales son los microorganismos que los componen, siendo un parámetro importante en muchos casos.





## 8. Conclusiones.

Se realizó la colecta de muestras de consorcios microbianos termófilos, de geissers ubicados en el Parque nacional Sajama, Departamento de Oruro, Bolivia.

A pesar de todo el esfuerzo y tiempo dispuesto en el aislamiento de cepas bacterianas, por medio de métodos tradicionales para bacterias anaerobias como los Tubos Roller y el Cultivo bifásico, no se aislaron cepas microbianas extremófilas productoras de proteasas y amilasas debido a la forma de crecimiento que presentan estos consorcios, colonias tipo swarming y a la producción de biofilm del consorcio HMA-2, impidiendo la separación de las cepas por sí solas; manteniendo las mismas en consorcio microbiano para las siguientes determinaciones.

Se realizó la determinación de las cinéticas de crecimiento, Actividad Enzimática Vs tiempo, por un periodo de 30 días; de 14 consorcios productores de proteasas y 14 consorcio productores de amilasas, respectivamente, haciendo determinaciones de las mismas cada 48 horas. Se seleccionó solo un consorcio productor de amilasas, HMA-2; y un consorcio productor de proteasas E-1p dilución  $10^{-4}$ , como los mejores productores de enzimas en cada caso, continuando con ellos la optimización del medio de cultivo por medio de un diseño factorial y para el posterior análisis molecular de los mismos.

Se observó la formación de un biofilm, en el medio de cultivo que contiene almidon, por el consorcio HMA-2, el cual facilita la producción de amilasas en distintas características de cultivo. El mismo, presenta una diferencia macroscópica y microscópica al cambiar las condiciones del medio de cultivo.

Se realizó el diseño factorial  $4^2$  para el consorcio microbiano productor de amilasas, teniendo como variables independientes el pH y la concentración de NaCl, manteniendo las características halófilas del consorcio HMA-2. Como resultado estadísticamente significativo se observa que la producción de amilasas aumenta a pH 11, en esta condición

de cultivo del consorcio microbiano se observa un cambio macroscópico y microscópico en la formación del biofilm formado inicialmente por el consorcio microbiano, siendo el fenómeno benéfico para la producción de enzimas amilolíticas.

Se realizó la caracterización molecular por FISH del consorcio productor de amilasas HMA-2, con una temperatura de crecimiento de 20°C, que presenta morfologías microbianas de cocos, diplococos y bacilos largos con la sonda específica para eubacterias (EUB), llegando a la conclusión que el mismo está conformado por microorganismos del grupo de las sulfato-reductoras, además de presentar microorganismos del grupo de las Arqueas metanogénicas. Y teniendo la sospecha de que muchos de los microorganismos del consorcio microbiano pertenecen al grupo de las Arqueas halófilas.

Se realizaron dos Diseños Factoriales para el consorcio E-1p dilución  $10^{-4}$ ,  $2^2$  y  $2^3$ , respectivamente, concluyendo que la interrelación (intercepto) de las variables independientes (pH y concentración de NaCl) es estadísticamente significativo, concluyendo que la mejor condición para una alta producción de enzimas proteolíticas es a pH 7 y 10g/L de NaCl, que ofrece la actividad más alta a lo largo de los dos diseños factoriales.

Se realizó la caracterización molecular del consorcio productor de proteasas E-1p  $10^{-4}$ , consorcio termófilo, temperatura de crecimiento 80°C, en todos los casos del primer diseño factorial y solo en los casos significativos para el segundo diseño factorial, en este caso, pH 7 1.5 g/L NaCl, pH 7 10 g/L NaCl; se observaron esporas libres, correspondientes a bacilos Gram (-) con esporas terminales, que corresponden al grupo de bacterias sulfato-reductoras, que hibridan con la sonda específica DSS658 correspondiente al grupo: *Desulfosarcina spp.*, *Desulfofaba sp.*, *Desulfococcus spp.*, *Desulfofrigus spp.* Observando también cocos, que hibridan con todas las sondas probadas para Arqueas metanogénicas. Concluyendo que el consorcio E-1p posee microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias sulfato-reductoras y a las Arqueas metanogénicas.

## 9. Recomendaciones.

Realizar un estudio más profundo del biofilm formado por el consorcio HMA-2 y los cambios estructurales que sufre el mismo al cambiar las condiciones del medio de cultivo.

Estudiar las aplicaciones potenciales de las enzimas estudiadas, Amilasas y Proteasas, evaluando la posibilidad de una purificación enzimática, si es que el caso lo amerita.

Para la identificación molecular, se recomienda utilizar sondas selectivas para la identificación de Arqueas, con las sondas: ARCH, CREN, EURY marcadas con FITC o CY 3 como marcadores fluorescentes, para diferenciar el grupo al que pertenecen las misma, Euryarqueota, Crenarqueota, Korarchaeota o Nanoarchaeota.

La implementación de un método de cuantificación bacteriana en el caso del método FISH para observar las proporciones y porcentajes de los distintos microorganismos en el consorcio microbiano. Pudiendo de esta manera observar la interacción que estos poseen.

## 10. Referencias Bibliográficas

1. ROTHSCHILD L. y MANCINELLI R. Life in extreme environments. 2001
2. SCHELEGEL H. G. y JANNASCH H. W. The Prokariotes. Prokariotes and their Habitats. Chapter 1.6. pag. 141
3. <http://www.boliviaenlared.com/html/parque-nacional-sajama.html>
4. JAENICKE R. y STERNER R. The Prokariotes. Life at High Temperatures. Chapter 1.7. Pag. 197.
5. SANTOS H., DA COSTA M. S.: Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environmental Microbiology* 2002, 4: 501-509.
6. DE CASTRO R., MAUPIN-FURLOW J., y colaboradores. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina and Department of Microbiology and Cell Science University of Florida, Gainesville, FL, USA. *FEMS Microbiol Rev* 30 (2006) 17–35.
7. POSADA *et al.* Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un material termomineral de Paipa (Boyacá). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. VI, No. 2. Diciembre 2004. 90-100.
8. TURNER P., MAMO G., NORDBERG KARLSSON E. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories* 2007, 6:9.
9. KRISTJANSSON JK., STETTER KO.: Thermophilic bacteria. In thermophilic bacteria. Edited by: Kristjansson JK. London: CRC Press Inc: 1992: 1-18.
10. BROCK T. D., FREEZE H.: *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology* 1969. 98: 289-297.
11. SATYANARAYANA T., RAGHUKUMAR C., SHIVAJI S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science* 2005, 89:78-90.
12. RÍOS MANRÍQUEZ, N. Aislamiento de cepas anaerobias termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas, implicadas en la producción de etanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales. Tesina de Grado. IIFB-UMSA. La Paz - Bolivia. 2008.
13. MILLER T., WOLLIN M. J., A serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Applied Microbiology*, May 1974, p.985-987, Vol.27, No. 5.
14. FUJIWARA S: Extremophiles: Developments of their special functions and potencial resources. *Journal of bioscience and Bioengineering* 2002, 94: 518-525.

15. PODAR M., REYSENBACH AL: New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current opinion in Biotechnology*. 2006, 17:250-255.
16. Söderhäll, K.; UNESTAM, T. Properties of extracellular enzymes from *Amphanomyces astaci* and their relevance in the penetration process of crayfish cuticle. *Physiol. Plant.*, 35: 140-146, 1975.
17. FERRERO MA, CASTRO GR, ABATE CM, BAIGORI MD, SIÑERIZ F. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29 isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996;45:327–32.
18. KUMAR CG, TAKAGI H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv* 1999;17:561–94.
19. MASAHIRO KAMEKURA y HIROSHI ONISHI. Protease Formation by a Moderately Halophilic *Bacillus* Strain. *APPLIED MICROBIOLOGY*, Apr. 1974, Vol. 27, No. 4 p. 809-810.
20. NOMOTO, M., and Y. NARAHASHI. 1956. A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*. L Purification of a protease of *S. griseus*. *J. Biochem.* 46:653-667.
21. HUANG, G., YING, T, Huo, P. and JIANG, Y.Z. (2006). Purification and characterization of a protease from thermophilic *Bacillus* strain HS08. *Afric. J. Biotech.*, 5: 2433-2438.
22. GHOSE T. K. Measurement of Cellulase Actyivities. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY APPLIED CHEMISTRY DIVISION. COMMISSION ON BIOTECHNOLOGY. Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, India.
23. BERNFELD. P. *Methods of enzymology*. P. 149-150.
24. AYALA BORDA P. Aislamiento, caracterización parcial y perfil de producción enzimática de bacterias halófilas y halotolerantes de la laguna Chaikota, Potosí – Bolivia.
25. CRESPO MELGAR C. Diversidad Microbiana: Selección, aislamiento e identificación de microorganismos anaerobios termófilos productores de etanol. Tesis para optar al grado de Magister Scientiarum 2009, 92p.
26. SANDHYA C., NAMPOOTHIRI M., PANDEY A., *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Chapter 10. Ed. Jose Luis Barredo. 2005.
27. BROCK et al. *Biología de los Microorganismos*. Capítulo 6. Pag 148.
28. LUQUE CABRERA J., HERRÁEZ SÁNCHEZ A., *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid. España. Ed. Harcourt. 469p.
29. AMANN R., FUCHS B., BEHRENS S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, 12:231-236.

30. BLACKALL, L. Fluorescence *in situ* hybridisation, FISH, Introduction. Apuntes de cátedra. Advanced Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.
31. BLACKALL, L. What is FISH? Apuntes de cátedra. Advanced Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.
32. BLACKALL, L. FISH-Theory Molecular Biology. Apuntes de cátedra. Advance Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.
33. BLACKALL, L. Fluorescence *in situ* hybridisation FISH. Apuntes de cátedra. Advanced Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.
34. BLACKALL, L. Fluorescence *in situ* hybridisation, FISH, How to do FISH. Apuntes de cátedra. Advanced Wastewater Management Centre. The University of Queensland, Queensland, Australia.
35. [www.porquebiotecnologia.com.ar](http://www.porquebiotecnologia.com.ar)
36. ZWIGLMAIER, K. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) – the next generation. FEMS Microbiology Letters. 246. 2005. 151-158.
37. HOUGH, D. Extremozymes. Current Opinion in Chemical Biology. 1999, 3:39-46.
38. DEMIRJIAN, D. Enzymes from extremophiles. Current Opinio in Chemical Biology. 2001, 5:144-151.
39. VAN DEN BURG, B., VRIEND, G., VELTMAN, OR., VENEMA, G., EIJSINK, VG. Engineering an enzyme to resist boiling. Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95:2056-2060.
40. ANNUK, H., MORAN, A. Microbial biofilm-related polysaccharides in biofiling and corrosion. Chapter 39. Biological relevance of microbial glycosilated components. Microbial Glycobiology. Elsevier Inc. 781-801.
41. NELSON, D., COX, M. Lehninger Principles of Biochemistry. Tercera Edición. Ed. Omega. Capítulo 5. Pag. 143. 2000.
42. BERTOLDO C., ANTRANIKIAN G. Starch-hydrolizing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Current Opinion in Chemical Biology. 2002. 6:151-160.
43. SANCHEZ, T., LEÓN, J., WOOLCOTTZ, J. y ARAUCO, K. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. peru. biol.* 11(2): 179-186 (2004).

44. SUN-OG LEE, JUNICHI KATO, NOBORU TAKIGUCHI, AKIO KURODA, TSUKASA IKEDA, ATSUSHI MITSUTANI, AND HISAO OHTAKE. Involvement of an Extracellular Protease in Algicidal Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 2000, p. 4334–4339.
45. DE CHAMPDORE', M., STAIANO M., ROSSI M., y D'AURIA S. Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. Journal of the Royal Society. Interface (2007) 4, 183–191.



## ANEXO 1.

### Medios de Cultivo.

#### Medio de Cultivo Selectivo para el Aislamiento de Microorganismos con Actividad Proteasa

NaCl	1.5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.15 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0.06 g/L
MgCl <sub>2</sub>	0.01 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g/L
NaSO <sub>4</sub>	1.5 g/L
Cisteina	0.25 g/L
Gelatina	6 g/L
Caseina	6 g/L

#### Soluciones auxiliares Medio 11.

Solución 2	1 mL/L
Fe Cl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	1,5 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60 mg
HCl (25%)	6,5 mL
Co Cl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	120 mg
Mn Cl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
Na Mo O <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	25 mg
Ni Cl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	25 mg
Zn Cl <sub>2</sub>	60 mg
Cu Cl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	15 mg
H <sub>2</sub> O destilada	Csp 100 mL

Solución 3	1 mL/L
Na <sub>2</sub> Se O <sub>3</sub>	3 mg
Na OH	0.5g
H <sub>2</sub> O destilada	Csp 100 mL

Solución 7	1 mL/L
Biotina	1 mg
PABA	5 mg
Vit B12	5 mg
Tiamina	10 mg
H <sub>2</sub> O destilada	Csp 100 mL



**Medio de Cultivo Selectivo para el aislamiento de  
Microorganismos con Actividad Amilasa.**

Na Cl	60 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/L
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1 mg/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200 mg/L
CaCl <sub>2</sub>	1mg/L
HBO <sub>3</sub>	10 µg/L
MnSO <sub>4</sub>	10 µg/L
MoO <sub>3</sub>	10 µg/L
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	50 µg/L
ZnSO <sub>4</sub>	39 µg/L
Almidón Soluble	6 g/L

**Soluciones auxiliares Medio 11.**

Solución 2	1 mL/L
Fe Cl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	1,5 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60 mg
HCl (25%)	6,5 mL
Co Cl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	120 mg
Mn Cl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
Na Mo O <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	25 mg
Ni Cl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	25 mg
Zn Cl <sub>2</sub>	60 mg
Cu Cl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	15 mg
H <sub>2</sub> O destilada	Csp 100 mL

Solución 3	1 mL/L
Na <sub>2</sub> Se O <sub>3</sub>	3 mg
Na OH	0.5g
H <sub>2</sub> O destilada	Csp 100 mL

Solución 7	1 mL/L
Biotina	1 mg
PABA	5 mg
Vit B12	5 mg
Tiamina	10 mg
H <sub>2</sub> O destilada	Csp 100 mL

## ANEXO 2.

### Preparación de Reactivos para la determinación de Actividades Enzimáticas.

#### **Tampón Fosfato 50 mM pH 7.**

Pesar 0.3846g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0.3124  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para 100mL de disolución.

#### **Solución de Caseína 1%.**

Pesar 1 g de caseína y diluir en 100mL de Tampón Fosfato pH 7. Ajustar el pH. Guardar en un vial estéril a 4°C.

#### **Solución de Ácido Tricloro Acético (ATA).**

Pesar 10 gramos de ATA y diluir con 100mL de agua destilada. Guardar en un frasco de vidrio a 4 °C.

#### **Tampón Fosfato 0.02M pH 6,95.**

Pesar 0.275g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.1466 de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Para un volumen final de 150mL de solución, diluir con agua destilada.

#### **Sustrato para Determinación de Actividad Amilolítica.**

Pesar 1g de Almidón soluble de papa, para 100mL de Tampón Fosfato pH 6,95.

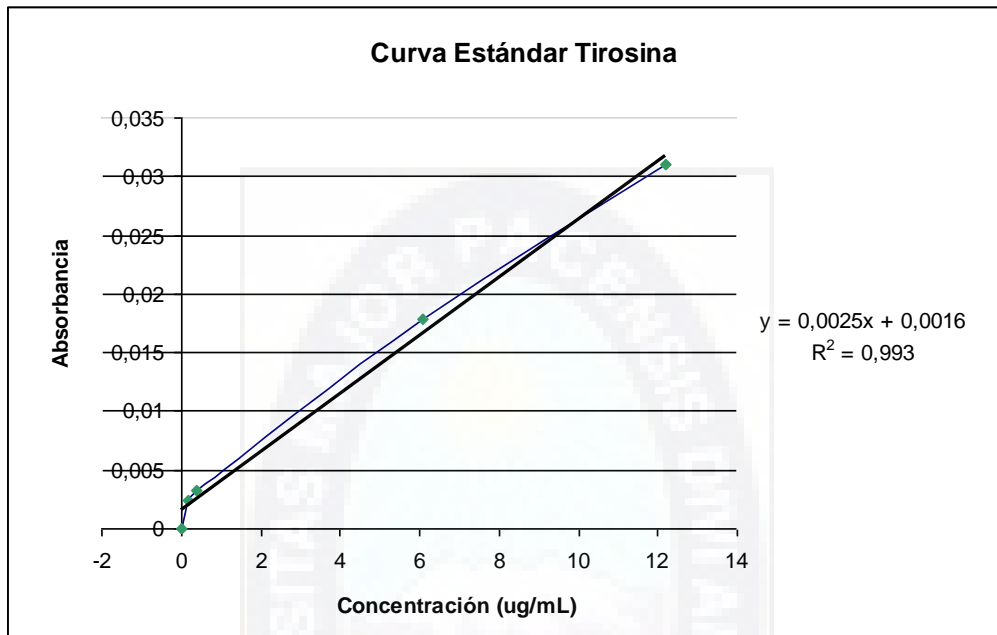
#### **Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).**

Disolver 10g de Hidróxido de Sodio y 0.5g de Sulfato de Sodio.

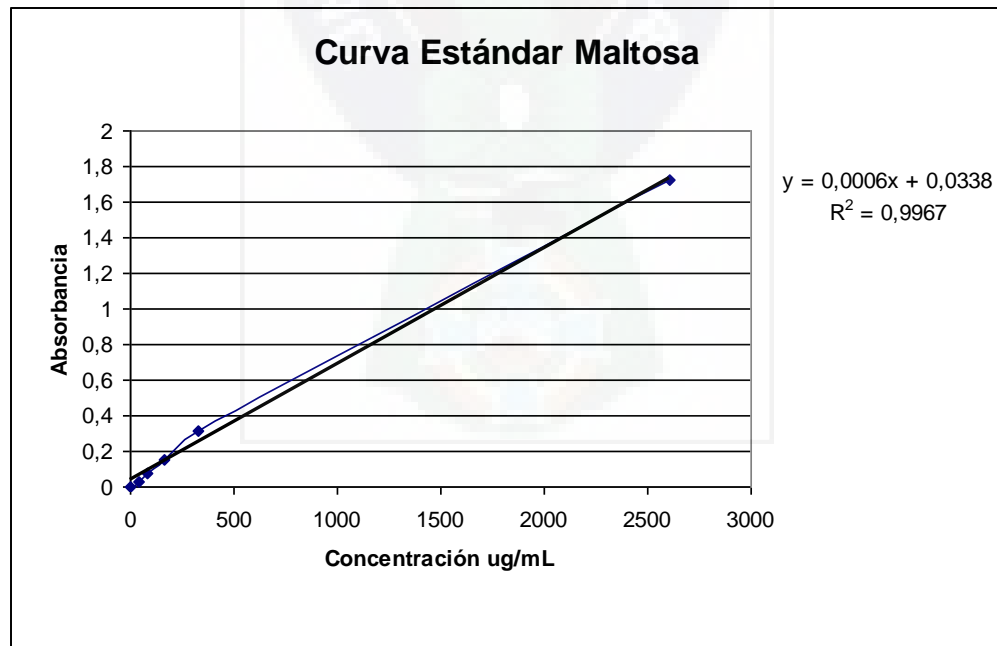
Añadir 0.2g de Fenol y añadir 200g de Tartrato de Sodio y Potasio, finalmente añadir 10g de Ácido 3.5-Dinitrosalicílico (DNS), para un volumen final de 1L.

### ANEXO 3.

#### Curva Estándar para la Determinación de Actividad Proteasa



#### Curva Estándar para la Determinación de Actividad Amilasa.



## ANEXO 4

### DESARROLLO MICROBIANO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS

**Consortio HMA-2.** A la izquierda, el medio de cultivo control, a la derecha el consorcio después de 30 días de incubación y la formación de biofilm en el mismo.



**Consortio E-1p dilución  $10^4$ .** A la izquierda el medio de cultivo control y a la derecha el medio de cultivo inoculado con el consorcio microbiano después de 30 días de incubación.



## ANEXO 5

### DESCRIPCIÓN DE LAS SONDAS UTILIZADAS PARA FISH

Sonda	EUB 338
<b>Especificidad</b>	Para la mayoría de las bacterias Cobertura/ unión a grupos objetivo: 90% / 169389 (dominio bacteria) Unión a grupos no objetivos: 0
<b>Categoría de la Sonda</b>	Altos niveles taxonómicos
<b>Molécula target</b>	16 S rRNA
<b>Secuencia</b>	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'
<b>Longitud</b>	18
<b>Contenido G+C</b>	66.7
<b>Tm (°C)</b>	55
<b>delta Gs (Kcal/mol)</b>	$\Delta G_1$ : -24.86; $\Delta G_2$ : -1.59; $\Delta G_{12}$ : -23.22
<b>MW (g/mol)</b>	5487
<b>Formamida (%)</b>	0-50
<b>Referencia</b>	Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. and Stahl D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919-1925.
<b>Observaciones</b>	Use la sonda en una mezcla equimolecular junto con las sondas EUB338II y EUB338III para detectar todas las bacterias.
<b>Otras versiones de la Sonda</b>	EUB338 III (SBACT V 338) EUB338 II (SBACT P 338)

Sonda	MSMX860
<b>Especificidad</b>	Methanosarcinales (all Methanosarcina and Methanosaeta)
<b>Categoría de la Sonda</b>	Archaea Metanogénica
<b>Molécula target</b>	16S rRNA
<b>Secuencia</b>	5'- GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT -3'
<b>Longitud</b>	21
<b>Contenido G+C</b>	66.7
<b>Tm (°C)</b>	60
<b>MW (g/mol)</b>	6321
<b>Formamida (%)</b>	45
<b>Referencia</b>	Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B. R., Stahl D.A. (1994). Group-specific 16SrRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Appl. Env. Microbiol. 60:1232-1240

Sonda	MX825
Especificidad	Methanosaeta spp.
Categoría de la Sonda	Archaea Metanogénica
Molécula target	16S rRNA
Secuencia	5'- TCG CAC CGT GGC CGA CAC CTA GC -3'
Longitud	23
Contenido G+C	69.6
Tm (°C)	64
delta Gs (Kcal/mol)	$\Delta G_1$ : -30.98; $\Delta G_2$ : -0.4; $\Delta G_{12}$ : -30.31
MW (g/mol)	6966
Formamida (%)	50
Referencia	Raskin L., Stromley J. M., Rittmann B. E. and Stahl D. A. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1232-1240.

Sonda	MG1200b
Especificidad	Muchos Methanomicrobiales
Categoría de la Sonda	Archaea Metanogénica
Molécula target	16S rRNA
Secuencia	5'- CRG ATA ATT CGG GGC ATG CTG -3'
Longitud	21
Contenido G+C	52.4
Tm (°C)	54
MW (g/mol)	6167
Formamida (%)	20
Referencia	Crocetti G., Murto M. and Björnsson L. (2006). An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). J. Microbial Methods 65: 194-201

Sonda	MC504
Especificidad	Methanocaldococaceae
Categoría de la Sonda	Archaea Metanogénica
Molécula target	16S rRNA
Secuencia	5'- GGC TGC TGG CAC CGG ACT TGC CCA -3'
Competidor	5'- GGC TGC TGG CAC CGA ACT TGC CCA -3'
Longitud	24
Contenido G+C	70.8
Tm (°C)	66
MW (g/mol)	7324
Formamida (%)	55
Referencia	Crocetti G., Murto M. and Björnsson L. (2006). An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ

	hybridisation (FISH). J. Microbial Methods 65: 194-201
<b>Observaciones</b>	El competidor es conocido también como cMC504.

<b>Sonda</b>	<b>DSS 658</b>
<b>Especificidad</b>	Desulfobacteraceae y otras bacterias
<b>Categoría de la Sonda</b>	Microbios sulfato-reductores
<b>Molécula target</b>	16S rRNA
<b>Secuencia</b>	5'- TCC ACT TCC CTC TCC CAT -3'
<b>Longitud</b>	18
<b>Contenido G+C</b>	55.6
<b>Tm (°C)</b>	50
<b>delta Gs (Kcal/mol)</b>	$\Delta G_1$ : -24.35; $\Delta G_2$ : 10.01; $\Delta G_{12}$ : -24.35
<b>MW (g/mol)</b>	5283
<b>Formamida (%)</b>	60
<b>Referencia</b>	<p>Manz W., Eisenbrecher M., Neu T. R. and Szewzyk U. (1998). Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. FEMS Microbiol. Ecol. 25: 43-61.</p> <p>Mussmann, M., Ishii, K., Rabus, R. and Amann, R. (2005) Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. Environ Microbiol, 7, 405-18.</p>

<b>Sonda</b>	<b>DSB 985</b>
<b>Especificidad</b>	Desulfobacter, Desulfobacula, Desulfospira, y Desulfotignum
<b>Categoría de la Sonda</b>	Microbios sulfato-reductores
<b>Molécula target</b>	16S rRNA
<b>Secuencia</b>	5'- CAC AGG ATG TCA AAC CCA G -3'
<b>Longitud</b>	19
<b>Contenido G+C</b>	52.6
<b>Tm (°C)</b>	51
<b>delta Gs (Kcal/mol)</b>	$\Delta G_1$ : -17.9; $\Delta G_2$ : -0.61; $\Delta G_{12}$ : -17.09
<b>MW (g/mol)</b>	5788
<b>Formamida (%)</b>	20
<b>Referencia</b>	<p>Manz W., Eisenbrecher M., Neu T. R. and Szewzyk U. (1998). Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. FEMS Microbiol. Ecol. 25: 43-61.</p>

<b>Otras versiones de la Sonda</b>	DSB 986
------------------------------------	---------

<b>Sonda</b>	<b>DFM 228</b>
<b>Especificidad</b>	Desulfotomaculum spp.
<b>Categoría de la Sonda</b>	Microbios sulfato-reductores
<b>Molécula target</b>	16S rRNA
<b>Secuencia</b>	5'- GGG ACG CGG AYC CAT -3'
<b>Longitud</b>	15
<b>Contenido G+C</b>	66.7
<b>Tm (°C)</b>	47
<b>delta Gs (Kcal/mol)</b>	$\Delta G_1$ : -17.42 - -19.08; $\Delta G_2$ : -0.31 - -0.39; $\Delta G_{12}$ : -16.81 - -18.41
<b>MW (g/mol)</b>	4309
<b>Formamida (%)</b>	No determinado
<b>Referencia</b>	Daly K., Sharp R. J. and McCarthy A. J. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. <i>Microbiology</i> . 146: 1693-1705.
<b>Otras versiones de la Sonda</b>	DFMI227a DFMI227b

### Glosario.

**Nombre:** (Alm et al., 1996). Probe designation according to Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Appl Environ Microbiol* 62: 3557-9

**Secuencia:** Secuencia en el código IUPAC: R=G/A, Y=T/C, M=A/C, K=G/T, S=G/C, W=A/T, H=A/C/T, B=G/T/C, V=G/C/A, D=G/A/T, N=G/A/T/C.

**T<sub>m</sub>.** Temperatura de disociación de acuerdo a:  $T_m = 64.9 + 41 \times ((G + C - 16.4)/\text{length})$ .

**delta Gs.** deltaG's:  $\Delta G_1$  y  $\Delta G_2$  son energías libres estándar, cambios por sonda/rRNA formación del dúplex y el plegamiento de la sonda, respectivamente.  $\Delta G_{12}$  es un parámetro de energía libre combinada obtenida de un equilibrio químico usando  $\Delta G_1$  y  $\Delta G_2$  (i.e., es en la afinidad termodinámica de la sonda para un sitio target hipotético, totalmente accesible). Todos los valores son calculados de acuerdo a Yilmaz and Noguera (2006). Making all Parts of the 16S rRNA of Escherichia coli accessible in situ to single DNA oligonucleotides. *Appl Environ Microbiol* 72: 733-744.

**Formamida.** Porcentaje de formamida en el buffer de hibridación para condiciones óptimas de hibridación en experimentos de FISH.



## **Glosario.**

**Microorganismo extremófilo:** es aquel que tiene la capacidad de crecer bajo condiciones extremas, éstas pueden ser condiciones físicas (temperatura, radiación, presión) o geoquímicas (deseccación, salinidad, pH, especies de oxígeno o potencial redox).

**Consortio Microbiano:** Grupo de bacterias de distintos tipos, formas, metabolismo que viven en asociados y son interdependientes unos de otros.

**Enzima:** Proteína con actividad catalítica.

**Proteasa:** Enzima proteolítica, es decir que actúa clivando proteínas en distintos lugares de la molécula, generando péptidos y aminoácidos libres.

**Amilasa:** Enzima amilolítica, actúa clivando la molécula de almidón a nivel de los enlaces alfa o beta glucosídicos, de forma específica.

**Anoxigénico:** En ausencia de oxígeno.

**Microaerofílico:** Medio ambiente en el cual hay una presencia de 10-20% de CO<sub>2</sub>.

**Termoestabilidad:** Estabilidad a altas temperaturas.

**Proceso de Biostoning:** Proceso que se realiza para la decoloración de telas por el uso de enzimas específicas producidas de microorganismos como hongos y bacterias.

**Biofilm:** Formación de un polímero de macromoléculas que los microorganismos forman cuando son estresadas de alguna forma, alterando el metabolismo de las mismas, también formados por consorcios microbianos.