

## **Aislamiento de microorganismos halófilos con potencial biotecnológico y análisis de parámetros fisicoquímicos en suelos costeros**

Isolation of halophilic microorganisms with biotechnological potential and analysis of physicochemical parameters in coastal soils

Mario Alcarraz C.<sup>1</sup>, George Vásquez D.<sup>1</sup>

### **RESUMEN**

El control y tratamiento biológico de los contaminantes requiere de microorganismos adaptados a condiciones extremas con capacidades enzimáticas especiales, razón por la cual se buscan microorganismos aislados de diversas fuentes naturales que presenten dicho potencial biotecnológico. El presente trabajo se basa en el aislamiento de microorganismos de un ambiente árido y altamente salino ubicadas en las zonas costeras de la capital del país. El aislamiento dio como resultado una gran variedad de formas (bacilos, cocos) y grupos microbianos (bacterias, hongos, actinomicetos) tolerantes a niveles bajos de actividad de agua, que al ser evaluados enzimáticamente presentaron importantes capacidades amilolíticas, proteolíticas y lipolíticas, potencialmente aplicables en el tratamiento de contaminantes; dando a conocer la gran importancia de la bioprospección microbiana.

**Palabras clave:** Biotecnología; aislamiento; microorganismos halófilos; ambientes extremos; capacidad enzimática.

### **ABSTRACT**

Control and biological treatment of contaminants requires microorganisms adapted to extreme conditions with special enzymatic capabilities, therefore seek microorganisms isolated from various natural sources, with biotechnological potential. This work is based on the isolation of microorganisms from an arid environment and highly saline in coastal areas of the capital of our country. Isolation resulted in a variety of forms (bacilli, cocci) and microbial groups (bacteria, fungi, actinomycetes) tolerant to low levels of water activity, that when we evaluated enzymatically, this presented significant capabilities lipolytic, amylolytic and proteolytic; revealing the importance of microbial bioprospecting.

**Key words:** Biotechnology; isolation; halophilic microorganisms; extreme environments; enzymatic capacity.

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioprocesos Industriales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Perú.

## INTRODUCCIÓN

Durante décadas se han acumulado en el medio ambiente complejos derivados de productos químicos sintéticos, efluentes industriales de origen alimentario, y contaminantes derivados del petróleo. Durante algún tiempo se han utilizado tratamientos convencionales, tales como la incineración, la detoxificación, el almacenamiento o reciclado, pero estos pueden ser costosos y de por sí pueden perturbar el medio ambiente.

La experiencia ha demostrado que es muy complicado lograr un manejo adecuado de los residuos peligrosos, incluso en países industrializados donde ya existe una infraestructura legal de protección del medio ambiente que facilita tomar las acciones necesarias. En el caso de los países en desarrollo, como el nuestro, el esfuerzo ha sido posterior.

Los efluentes salinos por lo general se encuentran asociados a procesos industriales de fabricación y manufactura de conservas de productos marinos y vegetales. La industria química genera efluentes altamente salinos durante el proceso de producción de pesticidas/herbicidas, peróxidos orgánicos, productos farmacéuticos, entre otros. Grandes cantidades de salmuera también se producen durante las operaciones de recuperación de gasolina y aceites (Castillo, 1995).

En comparación a otros grupos de microorganismos extremófilos como termófilos y alcalófilos, los halófilos de todos los dominios han sido relativamente poco explorados en procesos biotecnológicos, con notables excepciones, como la bacteriorodopsina de *Halobacterium* y la ectoína de *Halomonas* (Castillo-Carbajal, 2011); a pesar de que existe una gran diversidad de microorganismos halófilos sólo se han aislado y estudiado un pequeño porcentaje. Los microorganismos halófilos tienen ciertas características fisiológicas y metabólicas que les permite adaptarse y crecer a condiciones de salinidad muy por encima de las que un microorganismo normal puede soportar: la membrana citoplasmática constituye una barrera que la separa del ambiente externo en el

que puede producirse cambios en las concentraciones de sales, el tipo de fosfolípidos y ácidos grasos sufren modificaciones debido al estrés osmótico (Pittelkow, 2011).

El amplio rango de concentración de NaCl, el cual varía entre el 5 % y 30 % es su característica más importante y a las vez más atractiva para investigaciones en biotecnología para el tratamiento de efluentes salinos.

La tecnología de la biorremediación constituye un método no perturbador, eficaz en función a su costo y muy eficiente para la destrucción de muchos contaminantes dispersos en todo el medio ambiente. El uso de microorganismos extremófilos como son los que resisten concentraciones de salinidad alta, resulta una posibilidad atractiva ante los problemas de contaminación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de muestreo:

El área de estudio se encuentra aproximadamente a 11°50'15.50''S 77°10'52.12''O en el AA.HH. Pachacútec, perteneciente al distrito de Ventanilla en la Provincia Constitucional del Callao (US Dept of State Geographer); este terreno se caracteriza por tener un clima desértico y suelo de tipo arenoso que rodea las playas del distrito. Este suelo presenta en gran parte del área grandes expansiones de sal que se encuentran como capas gruesas o finas a una profundidad variable con respecto a la superficie.

El área está comprendida entre los 80 a 100 msnm. Las muestras fueron tomadas en el mes de Octubre del 2013. (Fig. 1)

Determinación de la temperatura del suelo

Con el uso de un termómetro analítico se midió la temperatura en cada punto muestral. Se tomó la temperatura a 10 y a 20 centímetros por debajo de la superficie, registrándola en un cuaderno de campo. Se dejó el termómetro por lo menos 3 minutos en el punto señalado para que la temperatura indicada en la pantalla digital se estabilice (Villaseca, 1990).

Determinación del porcentaje humedad del suelo

Se tomaron muestras a 10 y a 20 centímetros por cada punto muestral, por debajo de la superficie del suelo con la ayuda de pequeñas palas de jardinería, desinfectadas previamente. Las muestras fueron almacenadas en bolsas herméticas rotuladas con la fecha y la profundidad.

Una vez llevadas al laboratorio se repartieron 30 gr de cada bolsa en pequeños platos de acero cuyos pesos también estaban registrados. Luego se llevaron al horno a una temperatura de 100 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo calcular el porcentaje de humedad con respecto al peso seco (Instituto Mexicano del Petróleo, 2006).

Determinación del pH del suelo

Se tomaron 10 gr de muestra y se dejó secar a temperatura ambiente por un promedio de 2 horas. Pasado este tiempo se agregó la muestra en 20 ml de agua destilada y se mezcló por un promedio de 10 minutos. Se dejó reposar durante 10 minutos más. Pasado este tiempo, se midió el pH con el uso de un potenciómetro (Instituto Mexicano del Petróleo, 2006).

Aislamiento y recuento de microorganismos

Para este procedimiento se tomaron 5 gramos de cada uno de los 10 puntos muestrales, agrupadas con respecto a la profundidad (superficie, 10 cm y 20 cm) y luego se procedió al análisis.

Se tomaron 45 gr de la mezcla y fueron diluidas en 45 ml de Solución de Recuperación Máxima tal que la primera dilución sea 1 : 2. Luego se tomaron 2 ml y añadirla a 5 ml del mismo diluyente para alcanzar la dilución  $10^{-1}$ . Se continuó con el procedimiento hasta la dilución  $10^{-4}$ . Con el uso de una pipeta estéril se tomó 0.1 ml de cada dilución y por el método de diseminación en placa se esparció el inóculo a placas con Agar Halobacteria a diferentes concentraciones de cloruro de sodio con el uso de una espátula de Drigalsky. Con respecto a la dilución 1 : 2 mediante el mismo método de diseminación se inoculó 0.1 ml sobre placas con Agar Rodriguez Valera (Schneegurt, 2012) para el posible aislamiento de Arqueas. Luego se incubó a 30°C. El tiempo de incubación está

comprendido en 3 días a 3 semanas en el caso de halófilos moderados y 2 meses para el aislamiento de arqueas.

El recuento se realizó en placas de Agar Halobacteria contando el número de colonias por placa a una dilución determinada.

Se seleccionaron las colonias aisladas, reconociendo sus características culturales y además fueron observadas al microscopio mediante coloración Gram (en el caso de colonias bacterianas); por otro lado para el reconocimiento de las colonias fúngicas y actinomicetales se procedió a la técnica del microcultivo en agar czapek modificado, incubado a 30 °C de 3 a 5 días para los hongos y a 37 °C de 5 a 7 días para actinomicetos. Las colonias seleccionadas fueron repicadas a tubos de Agar MH en plano inclinado (Schneegurt, 2012) (anotando la concentración salina a la cual se ha aislado) con la finalidad de mantener los microorganismos aislados en un cepario.

Evaluación enzimática

Las cepas fueron reactivadas en caldo Halobacteria. Los diferentes microorganismos aislados se probaron en distintos medios con la finalidad de evaluar sus capacidades enzimáticas (Sánchez-Porro, 2003).

Actividad proteolítica: Tomar una asada del caldo de cultivo con la cepa correspondiente e inocular a una placa con Agar Leche Salino. Se incubaron a 37 °C por 48 horas a 1 semana o hasta observar crecimiento, seleccionar las colonias con halos transparente.

Actividad amilolítica: Se tomó una asada del caldo de cultivo con la cepa correspondiente y se inoculó a una placa con Agar Almidón salino. Se incubaron 37 °C por 48 horas a 1 semana o hasta observar crecimiento, luego añadir una gota de lugol para observar el halo de hidrólisis de almidón.

Actividad lipolítica: Se tomó una asada del caldo de cultivo con la cepa correspondiente y se inoculó en una placa con Agar base salino + Tween 80 (1%). Se incubó a 37°C por 48 horas

a la semana o hasta observar crecimiento. Se seleccionaron colonias con halo transparente.

## RESULTADOS

Determinación de la temperatura:

Las actividades de campo se iniciaron desde las 10 am hasta aproximadamente 1 pm. Este rango de horario es importante de considerar pues en ese periodo la temperatura ambiental varió desde los 17.2 °C (10 am) hasta los 20.5 °C (1 pm), con lo que el valor de temperatura del suelo pudo variar proporcionalmente. Se registró un mínimo de 19.7 °C y un máximo de 21.2 °C a 20 cm de profundidad y un mínimo de 20.4 °C y un máximo de 24.4 °C a 10 cm de profundidad.

Determinación del porcentaje humedad del suelo:

El 100 % de los valores de humedad fueron inferiores al 1 %, siendo el valor mínimo de 0.14% y un máximo de 0.33% a 20 cm de profundidad y un mínimo de 0.12% y un máximo de 0.51% a 10 cm de profundidad.

Determinación del pH del suelo:

El valor mínimo es de 7.9 y un máximo de 8.8 a una profundidad de 10 cm y un mínimo de 7.3 y un máximo de 8.5 a una profundidad de 20 cm, por lo tanto es clasificado como un suelo moderadamente alcalino. (Fig.2)

Aislamiento y recuento microbiano

Se obtuvieron colonias bien aisladas en la mayor dilución (1:2) con un conteo menor de 50 UFC/g. Los aislamientos en las distintas placas muestran el aislamiento de microorganismos halófilos moderados (8 y 15 % de NaCl) y halófilos extremos (20 % de NaCl).

En cuanto a la diversidad microbiana las placas incubadas a 37 °C mostraron colonias bacterianas con morfología y pigmentación diversa (Fig. 3), además de la presencia de formas actinomicetales; mientras que las placas incubadas a 30 °C mostraron colonias bacterianas y además un significativo número de colonias fúngicas. En total se identificaron 74 colonias bacterianas que fueron vistas al microscopio mediante coloración Gram identificando formas bacilares esporuladas

(Fig.4) y no esporuladas, formas cocoides y cocobacilares.

En el caso del microcultivo en actinomicetales se observa la formación y agrupación de cristales de halita en toda la estructura bacteriana.

Actividad proteolítica:

El 17.3 % (14/83) de los aislados mostraron halos de hidrólisis que varían en tamaño siendo el mínimo de 2 mm y el máximo de 7 mm. (Fig. 5)

Actividad amilolítica:

El 27.7 % (23/83) de los aislados mostraron halos de hidrólisis que varían en tamaño. Los diámetros varían desde 1 mm a 6 mm. (Fig. 6).

Actividad lipolítica:

Sólo 2.4 % de los aislados (2/83) mostraron halos de hidrólisis para este sustrato. El halo solo alcanzó los 2 mm. Cabe resaltar que los microorganismos que tienen esta actividad fueron aislados a una concentración de 12% de NaCl.

## DISCUSIÓN

Los suelos arenosos en climas desérticos se caracterizan por una pobre retención de agua y una temperatura media que se eleva a medida que el día avanza (sobre todo en épocas de verano). En el caso de suelos arenosos que están cercanos a las costas la presencia de salinidad es notable. Todas estas características corroboran los resultados de los análisis físicoquímicos de las muestras colectadas en Ventanilla. Un porcentaje de humedad por debajo del 1%, y un pH considerado como básico según la clasificación de la USDA (United States Department of Agriculture), nos hacen dar cuenta de que nos encontramos en un ambiente extremo, propicio para el aislamiento de microorganismos halófilos.

La diversidad microbiana es evidente encontrando casi todos los grupos microbianos estudiados (hongos, bacilos, cocos, actinomicetos) esto prueba que a pesar de ser un

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que los suelos costeros de Ventanilla presentan una gran variedad de microorganismos halófilos distribuidos en distintos grupos y que en relación a los parámetros fisicoquímicos evaluados nos llevan a la conclusión de que estamos frente a un ambiente extremo (pobre humedad y pH básico). Los microorganismos más preponderantes son los bacilos Gram +, esporulados o no, los cocobacilos y los actinomicetos. Finalmente, las características metabólicas evaluadas fueron similares a investigaciones ya reportadas empleando diversos sustratos (almidón, caseína y tween 80). De todos los microorganismos aislados y evaluados, cerca del 30% muestran alguna actividad enzimática, la cual puede ser aprovechable para la biorremediación industrial, principalmente la industria de la curtiembre. En cuanto a los actinomicetos se debe destacar su importancia en la cristalización de sales un proceso que aún se encuentra en estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castanier S, Perthuisot JP, Matrat M, Morvan JY (1999). The salt ooids of Berre salt works (Bouches du Rhône, France): the role of bacteria in salt crystallization. *J. Sed. Geol.* Vol. 125, pp: 9-21.
- Castillo-Carvajal L, Blanca E. Barragán-Huerta B (2011) Aplicaciones Biotecnológicas de Microorganismos Halófilos. *Rev. Sist. Amb.*, Vol. 4, pp:45–54.
- Castillo P, Bezanilla J, Amieva J, Jácome A, Tejero I (1995). Depuración de agua residual de salinidad variable empleando un proceso de biodiscos (RBC). *Rev. Ingeniería del Agua.* Vol. 2, pp. 25-30.
- Chookietwattana K. (2003). Diversity of Halophilic bacteria in saline soil at Nong bo Reservoir, Mahasarakham Province. Tesis para optar el grado de PhD en Biología ambiental. Thailand Suranaree University of Technology.
- Google Earth, (2013) US Dept of State Geographer.
- Enache M, Kamekura M. (2010) Hydrolytic enzymes of Halophilic microorganisms and their economic values. *Rom J. Biochem.* Vol. 47 pp: 47:59.
- Instituto Mexicano del Petróleo (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicados a la remediación de sitios contaminados. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Moreno M, Pérez D, García MT, Mellado E. (2013) Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *J. Life.* Vol. 3 pp: 38-51.
- Piña LC, Gallegos ACF, Vidal AR, González MÁA, González CNA, Herrera RR. (2011) Aislamiento y caracterización de microorganismos Halófilos de suelos salinos de cuatro ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* Vol. 3, pp: 33-43.
- Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, Ventosa A. (2003) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. of Appl. Mic.* Vol. 94, pp: 295-300.
- Schneegurt MA. (2012) Media and conditions for the growth of Halophilic and Halotolerant bacteria and Archaea. In: *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms.* USA: Springer. pp. 35-58.
- Villaseca S. (1990) Temperatura del suelo. *Rev. Agr. Téc.*; Vol.50, pp: 155-160.

### Correspondencia

Mario Alcarraz C.  
geo.vasq187@gmail.com

ANEXOS



Figura 1. Toma de muestras para los análisis en laboratorio

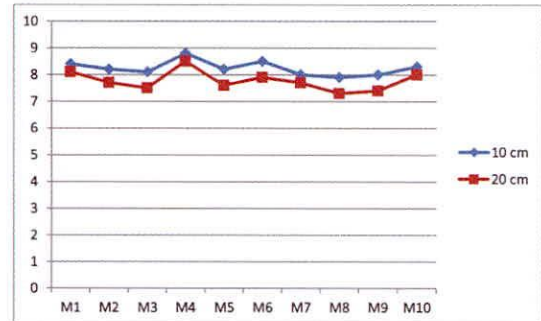


Figura 2. Gráfico de pH de los 10 puntos muestrales divididos según la profundidad

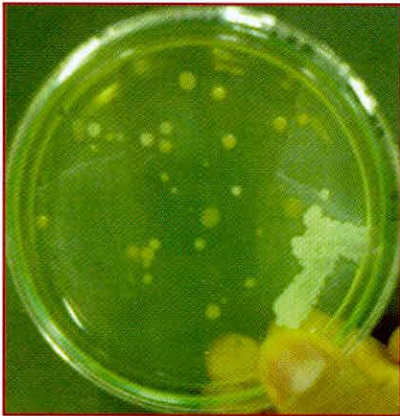


Figura 3. Aislamiento de halófilos. En la foto se puede observar una amplia variedad de colonias que difieren en forma, color y tamaño

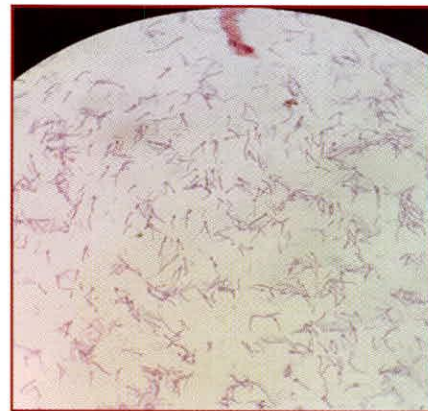


Figura 4. Bacilos Gram + esporulados



Figura 5. Halos de hidrólisis en Agar Leche Salino

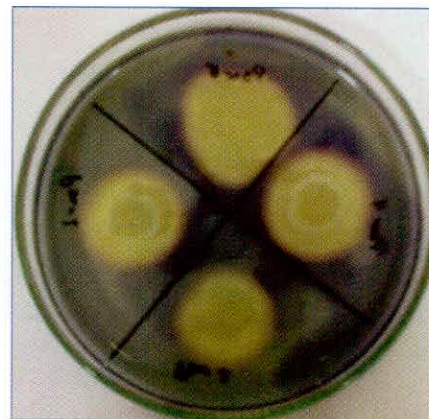


Figura 6. Halos de hidrólisis en Agar Almidón Salino