

## Halotolerancia y síntesis enzimática en *Pseudomonas* cf. *fluorescens* aislada de las piscinas de Ecuasal, provincia de Santa Elena, Ecuador

Halotolerance and enzymatic synthesis by *Pseudomonas* cf. *fluorescens* isolated from Ecuasal salt ponds, province of Santa Elena, Ecuador

Jaime Santos<sup>1,2,\*</sup> & José Villalta<sup>2,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Docente de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil

<sup>2</sup> Investigador, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador, Teléfono +593 04 3080777 Ext. 218

Recibido 6 de mayo 2015; recibido en forma revisada 16 de mayo 2015, aceptado 8 de junio 2015  
Disponibile en línea 30 de junio 2015

### Resumen

El objetivo de la presente investigación es determinar la halotolerancia y síntesis enzimática de *Pseudomonas* cf. *fluorescens*. Para evaluar la halotolerancia, se cuantificó el crecimiento celular en 2 M, 3 M y 4 M NaCl a 30°C. También se evaluó la síntesis enzimática extracelular proteolítica, amilolítica y lipolítica mediante halos de producción. Se determinó que el tratamiento a 4 M a 30 °C fue el mejor en los ensayos de halotolerancia, con una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) 0.048 h<sup>-1</sup>, tiempo de duplicación (td) 14.55 h y a una densidad celular de 5 906 666 ± 305 505 cel/mL. La síntesis proteolítica fue la más alta (halo de 30±0.82 mm), seguida por la producción de amilasas (halo de 22.5±1.73 mm), no se observó actividad lipolítica.

**Palabras claves:** Amilasa, halotolerancia, lipasa, proteasa, *Pseudomonas* cf. *fluorescens*, síntesis enzimática.

### Abstract

The goal of this research is to determine the halotolerance and enzymatic synthesis of *Pseudomonas* cf. *fluorescens*. To evaluate halotolerance, cell growth was quantified in 2 M, 3 M and 4 M NaCl at 30°C. Also, the extracellular proteolytic enzyme synthesis, amylolytic and lipolytic was evaluated by halos of production. The treatment of 4 M to 30°C was the best Halotolerance assay, with a growth rate ( $\mu$ ) 0.048 h<sup>-1</sup>, doubling time (td) 14.55 h and a cell density of 5 906 666 ± 305 505 cell/mL. Proteolytic synthesis was the highest (halo 30 ± 0.82 mm), followed by the production of amylases (halo of 22.5±1.73 mm), the lipolytic activity was not observed.

**Keywords:** Amylase, enzymatic synthesis, halotolerant, lipase, protease, *Pseudomonas* cf. *fluorescens*, substrate.

## Introducción

Para el aprovechamiento de la síntesis proteica o de las actividades celulares que realizan los microorganismos, cuyos productos de interés sirvan para el uso a nivel industrial, es necesario aislar y caracterizar los biovares presentes en sus ambientes nativos. Este proceso de aislamiento permite una selección estricta de aquellos microorganismos adaptados a su medio y que pueden ser candidatos potenciales en aplicaciones biotecnológicas (Saxena, 2015).

Las enzimas provenientes de la fracción extracelular de microorganismos halófilos extremos y de halófilos

moderados, son muy estables y funcionales en presencia de concentraciones salinas elevadas, en estas condiciones, la mayoría de las enzimas no halófilas sufren agregación y adoptan una conformación no funcional (Ventosa, Nieto & Oren, 1998). En consecuencia, crece el interés por conocer la diversidad enzimática de microorganismos halófilos (Bertus, 2003).

Las enzimas hidrolíticas producidas por microorganismos halófilos son utilizadas en la industria farmacéutica para la elaboración de algunos medicamentos como antibióticos, hormonas y pesticidas (Joshi *et al.*, 2000; Sudge, Bastawde, Gokhale, Kalkote & Ravindranathan,

Correspondencia de autores:

\* E-mail: j.santos2387@gmail.com

\*\* E-mail: villalta.josedavid@gmail.com



2015 Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil. Este obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional

1998), también han sido usadas para el tratamiento de superficies marinas contaminadas con petróleo (Stosz, Weiner & Coyne, 1995).

El descubrimiento de nuevas especies extremófilas y la especificación de las secuencias de sus genomas proveen una ruta para la caracterización de nuevas enzimas, lo que potencialmente podría conducir a aplicaciones tecnológicas novedosas (Gupta, *et al.*, 2005). Una de las aplicaciones más importantes y actuales en biotecnología consiste en la producción de enzimas hidrolíticas, tales como celulasas, amilasas, lipasas, proteasas, nucleasas y pululanases, estables en condiciones extremas.

Entre las bacterias halófilas, las moderadas representan el grupo más común. En ambientes hipersalinos se encuentran en mayor frecuencia representantes de bacterias Gram negativas, anaerobios facultativos o aerobios, incluyendo a los géneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Aeromonas* y *Vibrios* (Martínez, Quesada, Martínez & Béjar, 2004).

La característica principal de las bacterias halófilas es su dependencia al NaCl, donde las concentraciones salinas óptimas para su crecimiento varían entre las distintas especies, desde 0.5 M a 5 M de NaCl, habiéndose determinado que tal requerimiento es directamente dependiente del aumento de la temperatura y la concentración de nutrientes presentes en el medio (Cánovas, Vargas, Csonkja, Ventosa & Nieto, 1996).

*Pseudomonas fluorescens* es un bacilo recto o ligeramente curvado, aerobio estricto y móvil gracias a los flagelos polares que posee, con reacción positiva a la actividad de oxidasa (Brenner, Krieg & Staley, 2005). El presente trabajo tuvo como objeto determinar la halotolerancia y la síntesis enzimática extracelular de *P. cf. fluorescens*, aislada de las lagunas de Ecuasal, en la provincia de Santa Elena, Ecuador.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Las muestras utilizadas en el presente estudio fueron colectadas de las lagunas de Ecuasal, en la estación Pacoa. Se encuentran localizadas en la provincia de Santa Elena, en el suroeste del Ecuador, a menos de 200 m de la línea costera del Océano Pacífico (Latitud 02°13.807 y longitud 080°57.748). Estas piscinas están ubicadas en un área semi-desértica (Red Hemisférica de Reservas para Aves Playeras [RHRAP], 2009) y son de origen artificial.

Las muestras colectadas en la estación Pacoa (n= 6), fueron tomadas del suelo de las piscinas evaporadoras empleando nucleadores esterilizados, posteriormente se transportaron en hieleras temperadas a 4°C hasta el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil.

### Aislamiento e identificación

Se suspendieron 20 g de suelo en 100 mL de agua de mar filtrada y esterilizada, se tomaron 100 µL de esta suspensión para ser sembrados por desgaste en placas con agar King B: Agar 20.0 g; Peptona 15.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 1.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; glicerol 15.0 mL y 1000 mL H<sub>2</sub>O, suplementado con la solución de sales: NaCl 205.2 g; 36 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 52 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.8 g CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O; 5.2 g KCl; 0.2 g NaHCO<sub>3</sub>; 0.6 g NaBr; 2.5 mL FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O al 0.5% (p/v); 1000 mL H<sub>2</sub>O (Rodríguez, 1993) al 5% (p/v) y 30% (p/v), con pH 7 e incubado a 30°C.

Para determinar la especie, se realizaron las siguientes pruebas: Crecimiento a 37°C y 42°C, licuefacción de la gelatina, arginina dihidrolasa, oxidación de la glucosa, oxidación de la lactosa, oxidación del manitol, motilidad, prueba de indol, citrato Simmons y citocromo oxidasa, las cuales han sido descritas para *P. fluorescens* (Forbes, Sahn & Weissfeld, 2009; Cowan, 1974). Se realizaron cinco réplicas de cada prueba y un testigo (sin inóculo), ajustándose a una salinidad de 70 ppt NaCl.

### Ensayo de Halotolerancia

La prueba de halotolerancia se realizó mediante una cinética de crecimiento en 30 mL de medio King B suspendido con NaCl a 2 M, 3 M y 4 M por triplicado con un inóculo inicial de 600 000 células/mL para cada réplica. Se realizó un control negativo para cada uno de los tratamientos con el mismo volumen final y en ausencia de inóculo.

El conteo celular para los tratamientos se lo realizó cada seis horas hasta la declinación del número de células utilizando la cámara de Neubauer.

Una vez obtenidos los resultados de la cinética se procedió al análisis estadístico mediante la prueba de varianza de Kruskal-Wallis no paramétrico utilizando los programas estadísticos Simfit 7.0 y SPSS 19.

### Síntesis enzimática

Se utilizó el medio de cultivo starch agar con almidón soluble al 1 % (p/v) para la producción de amilasas, skim milk agar con leche descremada al 1 % (v/v) para la producción de proteasas y para la producción de lipasas el agar sierra al 1 % de tween 80 (v/v).

Se prepararon cinco placas de cada medio a pH7 y 70 ppt de NaCl, cuatro de las cuales fueron sembradas con el aislado bacteriano y una designada como control negativo (sin inóculo). La siembra de las colonias fue realizada con un asa de platino en el centro de las placas (9.20 mm de diámetro) y posteriormente incubados a 30°C durante cinco días.

La presencia o ausencia de degradación de los sustratos por la producción de enzimas, se determinó mediante la medición de un halo consumo-sustrato cada 24 horas; con el fin de revelar el halo en agar de almidón se colocó lugol al 10 % v/v.

## Resultados

### Aislamiento e identificación

Se logró obtener aislados de *Pseudomonas* spp. en el agar King B suplementado con la solución de sales al 5 % (Fig. 1). Además, las pruebas bioquímicas realizadas determinaron que el aislado es muy cercano a *Pseudomonas fluorescens* (Tabla 1).

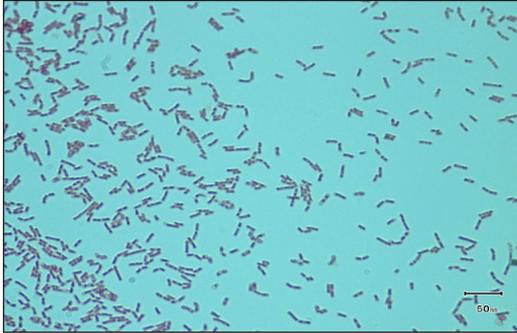


Figura 1. Tinción de Gram (negativo) del aislado de *P. cf. fluorescens* aislada de las salinas de Ecuasal (10X).

Tabla 1. Resultado de las pruebas bioquímicas de *P. cf. fluorescens*.

Test	Resultado
Crecimiento a 37°C	+
Crecimiento a 42°C	-
Licuefacción de la gelatina	+
Arginina dihidrolasa	+
Oxidación de la glucosa	+
Oxidación de la lactosa	d+
Oxidación del manitol	+
Motilidad	+
Prueba de indol	d-
Citrato Simmons	+
Citocromo Oxidasa	+

d+ = 90% positivo; d- = 90% negativo

### Prueba de Halotolerancia

El cultivo realizado a 2 M NaCl llegó a un número máximo de  $4\,133\,333 \pm 285\,346$  cel/mL a las 36 horas con una velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.054\text{ h}^{-1}$  y una tasa de duplicación ( $td$ ) 12.93 h. En 3 M NaCl el número máximo fue de  $5\,680\,000 \pm 105\,830$  cel/mL a las 48 horas con un  $\mu = 0.047\text{ h}^{-1}$  y un  $td = 14.80$  h y para 4 M NaCl el número máximo fue  $5\,906\,666 \pm 305\,505$  cel/mL a las 48 horas, con un  $\mu = 0.048\text{ h}^{-1}$  y un  $td = 14.54$  h. (Fig. 2).

El análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis determinó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos 2 M, 3 M y 4 M de NaCl con un  $p > 0.05$  siendo  $H = 1.723$  (Tabla 2).

También se observó que entre las medias de crecimiento no se encontraron diferencias significativas (Fig. 3); sin embargo, los tratamientos a 3 M y 4 M NaCl fueron los que presentaron la mayor densidad celular.

Tabla 2. Análisis estadístico de Kruskal Wallis no paramétrico en la prueba de halotolerancia.

Fuente	Tamaño muestral	Rango medio	Coefficiente H	p-Valor
2 M	10	12.55	1.723	0.423
3M	10	17.35		
4M	10	16.6		

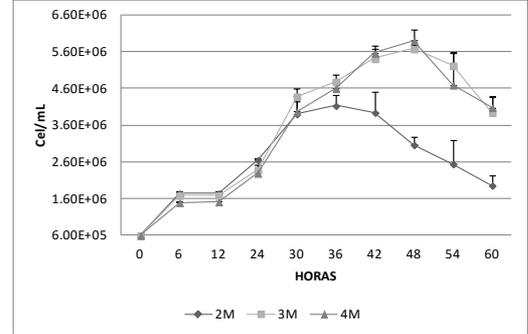


Figura 2. Medias de la cinética de crecimiento con desviación estándar a distintas concentraciones de NaCl para *P. cf. fluorescens*.

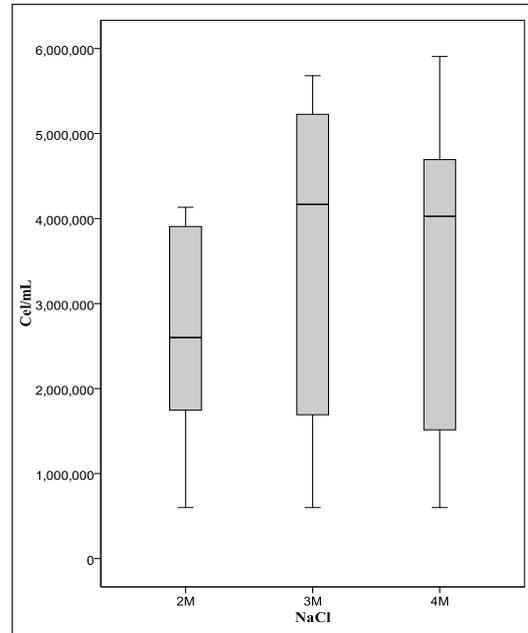


Figura 3. Diagrama de cajas y bigotes en los tratamientos de halotolerancia para *P. cf. fluorescens*.

### Síntesis enzimática

Se observaron halos enzimáticos en los sustratos de leche descremada y almidón soluble demostrando la producción de enzimas proteolíticas y amilolíticas, mientras que el sustrato para obtener lipasas no presentó halo de producción enzimática (Fig. 4).

La síntesis enzimática alcanzó su mayor producción luego de 96 horas de haber sido inoculadas (Fig. 5), siendo la enzima proteasa cuyo sustrato fue leche

descremada la que obtuvo el mejor resultado, con un halo de  $30 \pm 0.82$  mm de diámetro, mientras, el sustrato utilizado para producir amilasas con una base de almidón soluble fue el segundo de mayor producción con un diámetro de halo de  $22.5 \pm 1.73$  mm.

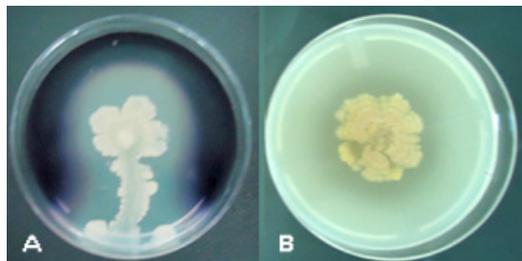


Figura 4. Halos enzimáticos producidos por *P. cf. fluorescens*. A) Agar de almidón con lugol para detección de actividad amilolítica. B) Agar de leche descremada para detección de actividad proteolítica.

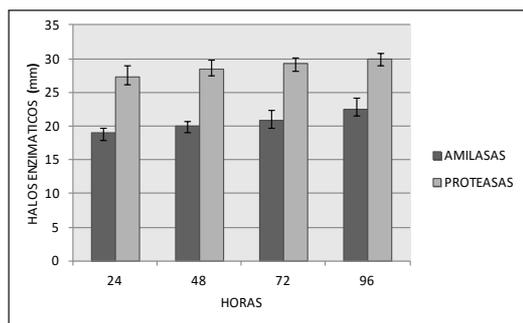


Figura 5. Medias de los diámetros de halos enzimáticos (mm) con su desviación estándar para amilasas y proteasas producidos diariamente por *P. cf. fluorescens*.

## Conclusiones

Los resultados de la presente investigación son similares a los de Narváez (2007), que también determinó la actividad proteolítica para el género *Pseudomonas* aislada de las salinas de Ecuasal, donde presentó halos de diámetros cercanos a los resultados obtenidos en este trabajo para proteasas, las cuales también fueron las de mayor actividad hidrolítica.

Las pruebas bioquímicas aplicadas al aislado de las salinas de Ecuasal coinciden en un 90 % con las pruebas de identificación para *Pseudomonas fluorescens* descritas por Cowan (1974) y Forbes *et al.* (2009), siendo esta la razón por lo que se denomina a esta especie aislada como *Pseudomonas cf. fluorescens*.

El tiempo de duplicación de  $14.09 \pm 1.3$  h y la velocidad de crecimiento de  $0.050 \pm 0.004$  h<sup>-1</sup> observados entre los tratamientos realizados a *P. cf. fluorescens* son muy cercanos a los previamente reportados para *P. fluorescens* (11.19 h y  $0.062$  h<sup>-1</sup>, respectivamente; en Márquez, Piramanrique, Carrascal, Clavijo & Quevedo, 2007). Esta similitud en el crecimiento demuestra la normalidad en la división celular de *P. cf. fluorescens* a 2 M, 3 M y 4 M de NaCl.

Los datos obtenidos a partir de la prueba de halotolerancia a 3 M y 4 M de NaCl registraron los mayores valores de velocidad de crecimiento, siendo la concentración de 4 M de NaCl el mejor tratamiento, al registrar el menor tiempo de duplicación y la mayor densidad celular. Consecuentemente, el aislado de *P. cf. fluorescens* es una bacteria halófila extrema al encontrarse en el rango de salinidad óptimo para este grupo de bacterias (2.5-5.2 M de NaCl; según Kuhsner & Kamekura, 1988).

*P. cf. fluorescens* produce en mayor proporción enzimas proteolíticas utilizando leche descremada como sustrato y en menor proporción amilasas en sustrato de almidón soluble en una concentración de 70 ppt de NaCl a 30 °C y no produce enzimas lipasas utilizando tween 80 como sustrato.

## Recomendaciones

Realizar la caracterización molecular de la cepa *Pseudomonas cf. fluorescens* para obtener una confirmación definitiva de su identidad taxonómica.

Evaluar la producción de enzimas de *P. cf. fluorescens* en altas concentraciones de temperatura y salinidad.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias Naturales y sus autoridades por permitir la realización de esta investigación en el Laboratorio de Biotecnología; y al Prometeo Adolfo Borges Ph.D, por su ayuda en la elaboración de este documento.

## Referencias

- Bertus, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. IMenz. *Bioengineering BV. Elsevier Science Ltd.* The Netherlands.
- Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005). *The Proteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2C* (2<sup>nd</sup> edition). pp. 1388. New York, US: Springer publishing.
- Cánovas, D., Vargas, C., Csonkja, L., Ventosa, A. & Nieto, J. (1996). Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol.* 178, pp.7221-7226.
- Cowan, S. (1974). *Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria* (2<sup>nd</sup> edition). pp.26-27. Cambridge: Cambridge University Press.
- Forbes, B., Sahn, D. & Weissfeld, A. (2009). *Bailey y Scott Diagnóstico microbiológico* (12<sup>a</sup> edición). pp.340-344. Editorial panamericana.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R., Singh, S., Khare S. & Gupta, M. (2005). One step purification and characterization of an alkaliphilic protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *J. Chromatogr A.* 1075 (1-2): pp.103-108.
- Joshi, R., Ravindranathan, T., Bastawade, K., Gkhale, D., Kalkote, U., & Sudge, S. (2000). Halophilic *Pseudomonas* strain having accession no. NCIM 5209 (ATCC 55940) and a process for preparing D(-) N-carbamoylphenylglycine using said strain. Patent US6121024.
- Kuhsner, D. & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez, F. (ed) *Halophilic bacteria*, vol 1. pp109-138. Boca Raton: CRC Press.

- Márquez, C., Piramanrique, K., Carrascal, A., Clavijo, B. & Quevedo, B. (2007). Determinación cuantitativa de proteasas de bacterias psicrotróficas aisladas de leche cruda. *Nova-publicación científica*. 5: pp.14-24.
- Martínez, M., Quesada, E., Martínez, F. & Béjar, V. (2004). A taxonomica study to establish the relationship between exopolysaccharide producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *Curr Microbiol.* 48: pp.348-353.
- Narváez, V. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias aerobias halófilas con actividad proteolítica procedentes de piscinas de la industria de sal ECUASAL localizada en Santa Elena-Ecuador*. (Tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica del Ejército. Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/580/1/T-ESPE-025287.pdf>
- Red hemisférica de reservas para aves playeras (RHRAP). (2009). Western Hemisphere Shorebird Reserve Network. Recuperado de: <http://www.whsrn.org/es/perfil-de-sitio/lagunas-de-ecuasal>
- Rodríguez, F. (1993). Introduction to saline environments. In: Vreeland, R. & Hochstein, L. (Eds.). *The Biology of Halophilic Bacteria*. pp.1-23. Boca Raton: CRC Press.
- Saxena, S. (2015). *Applied Microbiology*. New York, US: Springer publishing. DOI: 10.1007/978-81-322-2259-0
- Statgraphics Plus Version 5.1. (2000). Satitiscal Graphics Corp. Magnugistics, Inc. Rockville, MD.
- Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Version 19. (2010). International Business Machines Corp. Armonk, US.
- Stosz, S., Weiner, R., & Coyne, V. (1995). Agarase system from *Alteromonas* strain 2- 40. Patent U85418156.
- Sudge, S., Bastawde, K., Gokhale, D., Kalkote, U. & Ravindranathan, T. (1998). Production of D-hydantoinase by halophilic *Pseudomonas* sp. NCIM 5109. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: pp.594-599.
- Ventosa, A., Nieto, J. & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62: pp.504- 544.