



**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA PROCEDENTE DE  
AGUA MARINA ANTÁRTICA UTILIZANDO MICROBIOLOGÍA  
CONVENCIONAL**

**PROYECTO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
BACTERIÓLOGO Y LABORATORISTA CLÍNICO**

**ESTUDIANTES:**

**SARA GABRIELA TORRES CORTÉS  
YULY VANESSA AVENDAÑO OSORIO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, 2019**



**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA PROCEDENTE DE  
AGUA MARINA ANTÁRTICA UTILIZANDO MICROBIOLOGÍA  
CONVENCIONAL**

**PROYECTO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
BACTERIÓLOGO Y LABORATORISTA CLÍNICO**

**ESTUDIANTES:**

**SARA GABRIELA TORRES CORTÉS  
YULY VANESSA AVENDAÑO OSORIO**

**ASESOR:**

**LIGIA CONSUELO SANCHEZ LEAL M.Sc.**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, 2019**

## DEDICATORIA

A:

A Dios por la vida, salud y ponerme en el camino todas estas personas que  
mencionaré a continuación:

A mis padres, por ellos estoy en la capacidad de escribir estas palabras, porque me  
han brindado lo mejor de ellos y han sido mi motor de vida siempre dándome sus  
manos para seguir adelante.

A mis hermanos, Nano y Camila, y a familiares que siempre estuvieron en mi  
proceso de aprendizaje, dando consejos y su grata compañía.

A mi novio por su paciencia y comprensión en todo este proceso, darme energía y  
gananas para siempre seguir y ser más fuerte.

A mis amigas Natalia y Tania por ser las compañeras leales que la vida me dio,  
estar en todas juntas aportando siempre su granito de arena.

A mis compañeros de estudio por ser tan buenas personas, amigos, confidentes y  
de gran ayuda en cada semestre que estuvimos juntos.

**Sara Gabriela Torres Cortés**

A Dios por la vida.

A mis padres por su esfuerzo, comprensión, apoyo y amor que me han brindado  
incondicionalmente, han sido mi mayor motivación en toda mi formación  
profesional.

A mis hermanas por ser mis inseparables compañeras de vida.

A mi familia, que constantemente me dieron su apoyo para lograr culminar una  
etapa más en mi vida.

A mis amigos, mis futuros colegas, que han estado conmigo durante todo este  
recorrido formativo.

**Vanessa Avendaño Osorio**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Edison Tello de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana, porque gracias a su asesoría incondicional, su conocimiento, su disponibilidad y sus relaciones con la Armada Nacional de Colombia pudimos contar con las muestras para llevar a cabo nuestro proyecto.

A nuestra profesora Ligia Consuelo Sánchez por brindar siempre sus conocimientos y su valioso tiempo para hacer posible esta investigación.

Al grupo Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por permitirnos participar en este proyecto de la Antártida y facilitarnos, muestras, materiales y equipos para la realización del proyecto.

A la comunidad universitaria de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por permitir los espacios para la ejecución y los que aportaron su granito de arena.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b>	
<b>2.1. Biodiversidad microbiana de la Antártida.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Metabolismo bacteriano.....</b>	<b>11</b>
- Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano.....	<b>12</b>
<b>2.3. Bacterias psicrófilas.....</b>	<b>13</b>
- Importancia de las bacterias psicrófilas como productoras de sustancias de interés biológico.....	<b>14</b>
<b>2.4. Bacterias psicrótrofas.....</b>	<b>15</b>
<b>2.5. Bacterias halófilas.....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Enzimas.....</b>	<b>17</b>
- Generalidades e importancia de enzimas bacterianas extracelulares.....	<b>18</b>
<b>2.7. Tipos de enzimas</b>	
- <b>Peptidasas.....</b>	<b>19</b>
- <b>Amilasas.....</b>	<b>20</b>
- <b>Nitrogenasas.....</b>	<b>20</b>
<b>2.8 Actividad enzimática</b>	
- <b>Amilolítica.....</b>	<b>21</b>
- <b>Proteolítica.....</b>	<b>21</b>
- <b>Actividad enzimática del ciclo del Nitrógeno.....</b>	<b>22</b>

• Fijación de Nitrógeno.....	22
• Nitrificación.....	22
• Desnitrificación.....	23
2.9. Actividad y aplicación de enzimas psicrófilas y psicrotrofas.	23
<b>3. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	
3.1. Universo, población y muestra.....	25
3.2. Hipótesis, Variables e indicadores.....	25
3.3. Técnicas y procedimientos.....	27
<b>FASE 1: Recuperación de microorganismos bacterianos de agua marina Antártica.</b>	
- Obtención de agua marina Antártica.....	27
- Recuperación de bacterias cultivables procedentes de agua marina Antártica.....	27
<b>FASE 2: Aislamiento de microorganismos bacterianos cultivables procedentes de agua marina Antártica.</b>	
- Preparación de Medio de cultivo.....	29
- Aislamiento de cepas bacterianas que lograron crecer en fase de recuperación.....	29
<b>FASE 3: Actividad enzimática de bacterias cultivables aisladas de agua marina Antártica.</b>	
- Actividad proteolítica.....	29
- Actividad amilolítica.....	30
- Fijación de nitrógeno.....	30
- Desnitrificación.....	30
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Aislamiento de microorganismos bacterianos cultivables procedentes de agua marina Antártica.....	32
4.2. Actividad enzimática de bacterias cultivables aisladas de agua marina Antártica.....	34

<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo Biogeoquímico del Nitrógeno.....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Cantidad de aislamientos bacterianos según actividad proteolítica, amilolítica, fijación de nitrógeno y desnitrificación.....	<b>53</b>
<b>Figura 3.</b> Cantidad de aislamientos bacterianos según concentración de NaCl.....	<b>54</b>
<b>Figura 4.</b> Cantidad de aislamientos bacterianos según dilución en material de enriquecimiento.....	<b>55</b>
<b>Figura 5.</b> Cantidad de aislamientos bacterianos según temperatura de incubación a las que estuvieron sometidas.....	<b>56</b>
<b>Figura 6.</b> Cantidad de aislamientos bacterianos según morfología observada en la tinción de Gram.....	<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Variables e indicadores de la investigación.....	<b>26</b>
<b>Tabla 2.</b> Características de crecimiento de los dieciocho aislamientos bacterianos.....	<b>32</b>
<b>Tabla 3.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 1 aislada de agua marina antártica.....	<b>35</b>
<b>Tabla 4.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 2 aislada de agua marina antártica.....	<b>36</b>
<b>Tabla 5.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 3 aislada de agua marina antártica.....	<b>37</b>
<b>Tabla 6.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 4 aislada de agua marina antártica.....	<b>38</b>
<b>Tabla 7.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 5 aislada de agua marina antártica.....	<b>39</b>
<b>Tabla 8.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 6 aislada de agua marina antártica.....	<b>40</b>
<b>Tabla 9.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 7 aislada de agua marina antártica.....	<b>41</b>
<b>Tabla 10.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 8 aislada de agua marina antártica.....	<b>42</b>
<b>Tabla 11.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 9 aislada de agua marina antártica.....	<b>43</b>
<b>Tabla 12.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 10 aislada de agua marina antártica.....	<b>44</b>
<b>Tabla 13.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 11 aislada de agua marina antártica.....	<b>45</b>
<b>Tabla 14.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 12 aislada de agua marina antártica.....	<b>46</b>

<b>Tabla 15.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 13 aislada de agua marina antártica.....	<b>47</b>
<b>Tabla 16.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 14 aislada de agua marina antártica.....	<b>48</b>
<b>Tabla 17.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 15 aislada de agua marina antártica.....	<b>49</b>
<b>Tabla 18.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 16 aislada de agua marina antártica.....	<b>50</b>
<b>Tabla 19.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 17 aislada de agua marina antártica.....	<b>51</b>
<b>Tabla 20.</b> Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 19 aislada de agua marina antártica.....	<b>52</b>



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA PROCEDENTE DE**  
**AGUA MARINA ANTÁRTICA UTILIZANDO MICROBIOLOGÍA**  
**CONVENCIONAL**

**RESUMEN**

Las condiciones especiales del ecosistema de la Antártida son propicias para encontrar diversidad microbiana con potencial para ser utilizada en bioprospección. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad microbiana procedente de agua marina de la Antártida, que fue tomada por la Armada Nacional de Colombia en la expedición 2017, con el fin de establecer la capacidad enzimática utilizando microbiología convencional. La metodología incluyó estimular el crecimiento de las bacterias en temperaturas de 5, 10 y 20 °C con diferentes concentraciones de NaCl para su recuperación, determinación de la actividad enzimática de las bacterias que crecieron en los medios de cultivo y conservación de los microorganismos a -70 °C. Se aislaron 18 cepas, entre psicrófilas y psicrótrofas. El 22,2 % crecieron a temperatura de 5 °C; 5,5 % a 10 °C y 72,2 % a 20 °C. El 27,7 % de las bacterias aisladas fueron halófilas moderadas (6 % - 15 % de NaCl) y el 72,2 % halófilas leves (<6% de NaCl). El 44,4 % presentaron estructura de cocobacilos Gram negativos, el 38,8% bacilos Gram negativos y el 16,6 % cocos Gram positivos. El 61,1 % demostraron actividad enzimática amilolítica, el 22,2 % fijadora de nitrógeno, el 22,2 % desnitrificantes y ninguna presentó actividad proteolítica.

Se concluye que existe una diversidad bacteriana con actividad enzimática que podría ser utilizada en bioprospección. A futuro se espera evaluar otras capacidades enzimáticas a las bacterias congeladas y hacer escalamientos para obtener biomasa que pueda ser utilizada en bioprospección.

**Palabras Clave:** Agua marina Antártica, microbiología convencional, actividad enzimática.

**Estudiantes:** Sara Gabriela Torres Cortés

Yuly Vanessa Avendaño Osorio

**Docente:** Ligia Consuelo Sánchez Leal

**Fecha:** Agosto 2018

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la biosfera de la Tierra es fría (por ejemplo, el 90 % de las aguas del océano tienen una temperatura  $< 5^{\circ}\text{C}$ ), lo que mantiene una amplia diversidad de vida microbiana. La extensión y diversidad de los ecosistemas que albergan vida psicrófila así como, la capacidad funcional de los microorganismos que habitan en la biosfera fría, es igualmente diversa. Como resultado, los microorganismos psicrófilos proporcionan un enorme recurso natural de enzimas que funcionan eficazmente en el frío, y estas enzimas adaptadas al frío han sido seleccionadas por su potencial para bioprospección (1). La amplia diversidad de plantas, animales y microorganismos existentes en la Antártida, también han sido objeto de estudio importante por parte de la comunidad científica, especialmente lo referente a la industria. Distintos sectores han mostrado interés en los estudios antárticos como fuente de nuevas enzimas, y por ende nuevas funciones y aplicaciones (2).

La capacidad de los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos para sobrevivir y proliferar a bajas temperaturas, implica que han superado barreras para adaptarse a ecosistemas permanentemente fríos, como en la Antártida. Algunas de las principales barreras que estos microorganismos han superado, incluyen la reducción de la actividad enzimática, disminución de la fluidez de la membrana, disminución de la transcripción, traducción y la división celular, desnaturalización de enzimas y formación de hielo intracelular (3).

Se ha demostrado que las comunidades bacterianas pueden encontrarse en muchas condiciones adversas, como temperatura, pH y salinidad, entre otras, estos microorganismos son llamados extremófilos, y poseen características bioquímicas y metabólicas que les permiten vivir en hábitats extremos, resultando ser microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos en la bioprospección. Las bacterias halófilas, al pertenecer al grupo

de los extremófilos capaces de vivir en ambientes salinos, ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la bioprospección (4).

El objetivo del presente trabajo es aislar diversidad bacteriana a través de microbiología convencional en condiciones de salinidad y temperatura similares a las que tienen los microorganismos bacterianos donde originalmente se tomaron las muestras, en consideración a recuperar microorganismos con posibilidades de bioprospección. Adicionalmente, se definió alguna actividad enzimática con medios de cultivo específicos y finalmente se conservó la diversidad microbiana aislada a través del proceso físico-químico de congelación que permite conservar microorganismos viables por un tiempo sin sufrir cambios fenotípicos.

La presente investigación puede realizarse gracias a “El Tratado Antártico” firmado y entrado en vigor en 1961, menciona en el Artículo 2 “Libertad de investigación científica en la Antártida y continuidad de la cooperación como en el Año Geofísico Internacional de 1957” y en el Artículo 3 “Compromiso de intercambio de información sobre los proyectos de programas científicos en la Antártida, personal científico y libre disponibilidad de las observaciones y resultados científicos” (5).

Para complementar esta investigación, estudiantes de Bacteriología del grupo Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca realizaron dos trabajos de grado “Estudio metagenómico de muestras de suelo y agua marina procedentes de la isla Livingston, Antártida” enfocado en el uso de la metagenómica para la identificación de las bacterias procedentes de la misma muestra, que se utilizó en el presente trabajo y “Estudio de la microbiota cultivable en dos zonas de la Antártida” con muestras de suelo procedentes de dos zonas, Isla Livingston e Isla Deception.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la diversidad bacteriana procedente de agua marina Antártica por medio de métodos microbiológicos convencionales.

### **Específicos**

- Aislar la diversidad bacteriana procedente de agua marina Antártica, en condiciones de temperatura y salinidad propicias para bacterias de este ecosistema.
- Determinar actividad enzimática proteolítica, amilolítica, fijación de nitrógeno y desnitrificación de las bacterias recuperadas a través de medios selectivos.

## 1. ANTECEDENTES

Recientemente los investigadores han estado buscando compuestos activos en microorganismos que viven en ambientes inexplorados o extremos, el estudio de estos ecosistemas se constituye en un reto, debido a la gran posibilidad de descubrir nuevos microorganismos, los cuales a su vez pueden ser productores de nuevos compuestos bioactivos.

Junke K, y cols en 1998 (6), realizaron el primer reporte que se conoce de tres aislamientos e identificación por 16s y análisis filogenético de bacterias Gram positivas psicrófilas del hielo marino en la Antártida. Los análisis filogenéticos, junto con la caracterización fenotípica, indicaron que una de las cepas está más estrechamente relacionada con el género *Planococcus* para la cual se propone una especie nueva, *P. mcmeekinii*. Las otras dos cepas, son miembros de las bacterias Gram positivas más estrechamente relacionadas con los géneros *Arthrobacter* y *Brachybacterium*. Este estudio reporta la primera evidencia filogenética de que las bacterias Gram-positivas residen en el hielo marino.

Lokendra, S., en 1998 (7), determinaron a partir de bacterias psicrófilas colectadas de diferentes lugares de Schirmacher Oasis (Antártida), producción de enzimas hidrolíticas de los tipos: proteolíticas, lipolíticas y amilolíticas; estas demostraron una temperatura óptima de crecimiento de 25 – 28 °C, pero las enzimas de mayor producción, que fueron proteasas ácidas y esterases, la temperatura óptima fue de 40 °C.

Sánchez P et al., en 2003 (8), en relación con la actividad proteolítica que se evaluó en este estudio, determinó que las bacterias del género *Pseudomonas* reveló una alta actividad de enzimas proteolíticas, como se describen en trabajos realizados en España y Perú. En España, se aisló y caracterizó una

serie de bacterias halófilas moderadas que manifiestan actividad proteasa provenientes de salinas de Huelva, Cádiz y Almería. Las cepas identificadas correspondieron a los géneros *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* y *Bacillus*. En un proyecto posterior, se seleccionó una cepa bacteriana halófila moderada proveniente de una salina de la Isla Cristina (Huelva). La cepa seleccionada tiene actividad proteasa, y se caracterizó taxonómicamente, tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico, determinado que pertenecía al género *Pseudoalteromonas*.

Ramírez et al., en el año 2004 (9) en su estudio, presentaron una extensa revisión sobre las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas basados en aspectos relacionados con su ecología en los ambientes hipersalinos y sus características como microorganismos extremófilos y sus diversas e importantes aplicaciones y potencialidades en la industria y en la biotecnología dada su alta estabilidad en condiciones extremas, y se determinó que son útiles en la producción de enzimas, polímeros, solutos compatibles y en la biodegradación de residuos, así como en la producción de alimentos fermentados incluso para aprovecharlas como fábricas celulares alternativas a *Escherichia coli*, para la producción de proteínas recombinantes.

Soria, V. et. al., en 2009 (10), evaluó la producción de enzimas lipolíticas de cinco cepas bacterianas antárticas crecidas en medio aceite de oliva durante 36 a 74 horas, a su temperatura óptima de crecimiento (cepas: 27a y 173d de 20 – 25 °C, para 7Ab de 25 – 30 °C, para 19b de 15 – 20 °C y para 134d de 10 – 15 °C). Las cinco cepas crecieron bien y se detectó actividad lipolítica y/o estereolítica en todas las cepas.

Mojib N, y cols en 2010 (11), describió la actividad antimicobacteriana de dos pigmentos, violaceína, un pigmento violeta púrpura de *Janthinobacterium* sp. y la flexirubina, un pigmento amarillo-naranja de *Flavobacterium* sp. Estos

pigmentos se aislaron de las cepas bacterianas encontradas en los lagos de agua dulce de Schirmacher Oasis, este de Antártida. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de estos pigmentos para micobacterias virulentas y avirulentas fueron determinadas por la Microplaca Alamar Blue Assay (MABA) y Nitrate Reductase Assay (NRA). Las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de estos pigmentos para las micobacterias virulentas y avirulentas se determinaron mediante MABA y NRA. Los resultados indicaron que las MICs de J-PVP y F-YOP eran de 8,6 y 3,6 lg/mL para *Mycobacterium smegmatis* avirulento mc2155; 5 y 2,6 lg/mL para *Mycobacterium tuberculosis* avirulento mc26230. Los resultados indican que estos pigmentos aislados de bacterias antárticas podrían ser valiosos compuestos como nuevos antimicobacterianos.

Rosado, A. y Arroyo, M.F., en 2010 (12), obtuvieron 15 cepas de bacterias marinas con actividad proteolítica que fueron aisladas de muestras de agua obtenidas de Punta Fort William, Antártida. La actividad proteolítica de la cepa EAT 19 (*Pseudomonas sp.*) fue de 17,85 U/mg a las 72 horas, la cepa EAT 17 (*Alcaligenes spp.*) fue de 11,67 U/mg y de las tres cepas de *Aeromonas sp.* (EAT15, EAT16 y EAT 18) presentaron valores de 11,36; 9,85 y 10,23 U/mg respectivamente.

Antony R, y cols en 2016 (13), determinaron la diversidad y capacidades funcionales de los microorganismos de 3 regiones de la Antártida Oriental detectaron un conjunto diverso de bacterias (Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Planctomycetes, Verrucomicrobia), Archaea (Euryarchaeota) y Eucarya (Basidiomycota, Ascomycota, Cryptomycota y Rhizaria) mediante métodos de cultivo y métodos independientes. Aunque las comunidades microbianas observadas en las tres muestras de nieve eran claramente distintas, todos los aislados ensayados produjeron una o más de las siguientes enzimas: lipasa, proteasa, amilasa, beta-galactosidasa, celulasa y enzima modificadora de lignina. Lo que

confirma que se pueden encontrar microorganismos con posible uso en bioprospección.

Zhenzhen Xu, *et. al.*, en el 2017 (14) investigaron la viabilidad de un grupo de psicrótrofos filtrados que se aplicaban al tratamiento de aguas residuales a baja temperatura. Las cepas psicrótrofas cribadas son capaces de crecer en un amplio intervalo de temperatura de 0 °C a 40 °C y exhiben una actividad de enzimática preferible a baja temperatura (4 °C a 10 °C). Este estudio proporciona evidencia de que la intensificación microbiana con psicrótrofos fue una estrategia factible para mejorar la eficiencia del proceso convencional de tratamiento de aguas residuales a baja temperatura.

En las últimas décadas, ha surgido un creciente interés por el conocimiento y aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno y por el estudio de su efecto sobre el crecimiento vegetal. Las bacterias fijadoras de nitrógeno han sido el objetivo de numerosos estudios, en diversos cultivos de importancia agronómica, estas se han utilizado para aumentar la germinación y crecimiento (15).

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1. Biodiversidad microbiana en la Antártida

Las condiciones extremas hacen de la Antártida un hábitat donde solo los más fuertes pueden sobrevivir. A pesar de esta condición especial, se ha convertido en una interesante región para investigaciones científicas en el campo de la microbiología. La adaptación al frío es a menudo combinada con otras adaptaciones como, altas concentraciones de sales, presión osmótica e hidrostática regulada, disponibilidad de nutrientes, resistencia a la radiación ultravioleta, entre otras. A pesar de estos retos, la vida se desarrolla en estos entornos con una gran biodiversidad microbiana, principalmente de bacterias y hongos (16).

Estudios realizados (Asociación civil ANTARKOS 1988) confirman la presencia de cianobacterias, mientras que, los bacilos, formadores de esporas y aquellos del grupo *Flavobacterium* son escasos. Se determinó que las bacterias psicrófilas recolectadas pertenecen a los géneros *Colwellia*, *Marinobacter*, *Planococcus* y *Shewanella* mientras que, las cepas aisladas de bacterias psicrótrofas pertenecen a los géneros *Arthrobacter*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Hyphomonas*, *Planococcus*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*. Otras bacterias que se han detectado en este ambiente son especies pertenecientes a Proteobacteria principalmente *Pseudomonas* y *Vibrio*. Las bacterias generalmente dominan en número y diversidad en comparación con las arqueas (17).

El crecimiento de los microorganismos no se puede estudiar individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que es necesario recurrir a medios nutritivos artificiales donde se puedan desarrollar rápidamente y formar grandes poblaciones para su fácil manipulación. En un ambiente natural no es

frecuente encontrar un solo tipo de microorganismos, lo que existen son comunidades bacterianas. La separación de cada una de las variedades existentes en una comunidad es lo que se conoce como aislamiento de microorganismos.

Cada microorganismo tiene requerimientos nutricionales de temperatura y pH, que van de acuerdo a su hábitat natural. Por ejemplo, en el caso de muestras aisladas de ecosistemas glaciares de la Antártida se sabe que microorganismos como los psicrófilos mueren rápidamente si se exponen a temperatura ambiente normal, por esta razón, su estudio en laboratorio requiere un gran cuidado para estar seguros de que no se calienten durante el muestreo, el transporte, el aislamiento y otras manipulaciones (18).

## **2.2. Metabolismo bacteriano**

Las respuestas metabólicas a temperaturas bajas son dependientes de la fisiología específica de cada organismo psicrófilo. Pero, generalmente la mayoría de estas bacterias produce enzimas que funcionan óptimamente en frío y se desnaturalizan rápidamente a temperaturas moderadas.

Otra característica de los psicrófilos, es que a bajas temperaturas tiene lugar el proceso de transporte activo lo que es una clara indicación que la membrana de estos microorganismos es de distinta naturaleza pues a bajas temperaturas pueden seguir llevando a cabo sus funciones. De hecho, sus membranas contienen una mayor proporción de ácidos grasos insaturados lo que ayuda a mantener el estado semifluido de la membrana a bajas temperaturas (las membranas compuestas de ácidos grasos saturados se harían poco fluidas y no funcionales a bajas temperaturas) (19).

Los psicrófilos y psicrótrofos producen enzimas que funcionan óptimamente

en el frío y que con frecuencia se desnaturalizan o inactivan incluso a temperaturas muy moderadas. Las bases moleculares de este hecho no se conocen por completo, pero se ha observado que en general, las enzimas activas en frío poseen mayor cantidad de hélices, a comparación de enzimas que son inactivadas en temperaturas bajas. En consecuencia, la mayor cantidad de hélices en las enzimas activas en el frío puede permitir mayor flexibilidad en esas condiciones. Estas enzimas activas en el frío también tienden a tener más aminoácidos polares y menos aminoácidos hidrofóbicos, lo que puede servir igualmente de ayuda para mantener la proteína flexible y enzimáticamente activa a bajas temperaturas (20).

#### - **Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano**

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que la vida, sólo podía existir en un número limitado de ambientes, y en general, en condiciones normales de temperatura, pH, salinidad y presión (20). La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento y a la supervivencia de los microorganismos. A temperaturas muy frías o muy calientes los microorganismos no crecen, sin embargo, las temperaturas óptimas de crecimiento varían mucho entre los diferentes grupos de microorganismos y, principalmente reflejan el rango de temperaturas de sus hábitats naturales (18).

A medida que se eleva la temperatura las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y, por lo tanto, el crecimiento se acelera. Sin embargo, por encima de esta temperatura algunas proteínas sufren daños irreversibles, provocando la muerte celular.

Cada microorganismo tiene una temperatura óptima para su crecimiento, casi siempre relacionada con la temperatura de su hábitat. Se han definido también una temperatura mínima, por debajo de la cual no existe crecimiento, y una

temperatura máxima, sobre la cual los microbios tampoco crecen debido a la desnaturalización de proteínas que provocan la muerte celular. Estas tres temperaturas se denominan temperaturas cardinales o fundamentales (21).

Morita & Moyer en 2001, diferenciaron las bacterias psicrófilas y las psicrotolerantes, distinguiéndose por sus temperaturas mínima, óptima y máxima de crecimiento que son,  $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para psicrófilas y  $0\text{ }^{\circ}\text{C} - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $>15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $>20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para bacterias psicrotolerantes, también llamadas psicrótrofas. Sin embargo, para las bacterias psicrótrofas sus rangos de temperatura máxima de crecimiento pueden estar por encima de los  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en algunos casos su temperatura de crecimiento óptimo se encuentra también por encima de los  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (22).

Margensin en 2008 (23), afirmó la supervivencia de los microorganismos a bajas temperaturas es permitida por una serie de cambios fisiológicos y morfológicos. Los cambios en los productos metabólicos ocurren como resultado de la disminución en la actividad enzimática, la temperatura reducida durante el crecimiento conduce a un desequilibrio metabólico y el cese del crecimiento debido a la sensibilidad de algunos procesos metabólicos reguladores. Cuando la temperatura disminuye algunos de los componentes que son normalmente fluidos, se convierten en gel, lo que impide que las proteínas funcionen correctamente.

### **2.3. Bacterias psicrófilas**

El término “psicrofílico” fue introducido por Schmidt-Nielsen para describir los organismos adaptados al frío. Un psicrófilo se define como un organismo, procariótico o eucariótico, capaz de vivir permanentemente a temperaturas cercanas al punto de congelamiento del agua y en equilibrio térmico con el ambiente (24).

La primera enzima psicrófila proveniente de microorganismos de la Antártica en ser caracterizada fue una fosfatasa alcalina, dando paso a una gran cantidad de estudios relacionados con este tipo de enzimas extremófilas y un creciente interés por sus implicancias evolutivas y aplicaciones en bioprospección (25).

- **Importancia de las bacterias psicrófilas como productoras de sustancias para bioprospección**

Existe un enorme interés acerca de las proteínas estructurales y las enzimas metabólicas que son responsables de las propiedades inusuales de los microorganismos extremófilos. Pueden ser de mucha utilidad en biocatálisis para la síntesis de polímeros, productos farmacéuticos, agroquímicos, etc. (20).

En algunas ocasiones, el uso de enzimas de organismos mesófilos es limitado ya que ciertos procesos se tienen que llevar a cabo en condiciones en las que estas enzimas no son activas. En este sentido, el uso de enzimas derivadas de extremófilos abre la posibilidad de su uso en procesos en los que no se pueden usar las técnicas tradicionales (20).

Los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos en los ambientes antárticos presentan estrategias de adaptación al frío que resultan interesantes por su aplicación en bioprospección, por ejemplo, en alimentación, en la obtención de nuevos pigmentos como aditivos alimenticios, o la producción de fármacos y detergentes. Por todo lo expuesto, el potencial de las bacterias psicrófilas para aplicación en bioprospección recibe cada vez una mayor atención (20).

Por sus únicas condiciones de aislamiento y bajas temperaturas, la Antártica alberga un potencial científico y bioprospección enorme, pero también muchas barreras de entrada de diferente índole para los investigadores. Estos

problemas retrasan los estudios en el campo de la microbiología y por lo tanto el desarrollo en bioprospección también se ve afectado. Entre las principales barreras se pueden mencionar la geografía y clima. Otra consideración importante son las exigencias ecológicas, pues la ecología antártica es muy frágil, vulnerable y de difícil recuperación. Finalmente, las capacidades científicas y el entorno regulatorio constituyen otra barrera de entrada debido a que, los conocimientos y la experiencia requerida para trabajar con microorganismos y plantas de ambientes muy fríos no son triviales y requieren años para adquirirse (10).

#### **2.4. Bacterias psicrótrofas**

También denominados psicrófilos facultativos o psicrotolerantes, son microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el rango mesófilo, por encima de los 15 y 20 °C, más cercana a la temperatura ambiente, pero también pueden multiplicarse a temperaturas inferiores a 7 °C. Estos microorganismos crecen en ambientes donde la temperatura fluctúa, estando adaptadas a grandes oscilaciones, son los principales microorganismos implicados en el deterioro de los alimentos de origen animal en refrigeración (26).

La acción de las enzimas, en el caso de la producción de vinos, sidra o jugos, debe ocurrir a temperatura ambiente, por lo cual resulta importante contar con enzimas cuya temperatura óptima, es decir la temperatura a la cual su acción es mayor sea alrededor de 15 °C o 20 °C. Esto se logra haciendo producir cada enzima a partir de microorganismos que crecen a bajas temperaturas, procedentes de zonas frías, es decir microorganismos psicrótrofos. El uso de enzimas provenientes de organismos adaptados al frío permite ahorrar energía y disminuir tiempos de reacción en procesos que ocurren a temperatura

ambiente, por lo cual ha aumentado el interés en las mismas tendiente a una aplicación en bioprospección (27).

## **2.5. Bacterias halófilas**

Los microorganismos halófilos son organismos que están especializados para vivir en ambientes salinos, el término halófilo se origina del griego hals (sal) y phil (afín) por lo que etimológicamente halófilo significa “amigo, amante de la sal”). Los microorganismos marinos, en mayoría son por naturaleza psicrotrofos y halotolerantes, es decir capaces de crecer en temperaturas bajas y en ausencia como en presencia de sal (28).

La principal característica de las bacterias halófilas moderadas es la necesidad de NaCl en el hábitat, las concentraciones necesarias de sal para su crecimiento varían entre las distintas especies, se ha determinado que el requerimiento de sal en muchas bacterias halófilas moderadas aumenta con la temperatura. El rango de salinidad óptimo de crecimiento de las bacterias también se relaciona directamente con la concentración de nutrientes presentes en el medio.

Desde que se inició su estudio, las bacterias halófilas moderadas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial en bioprospección. Así, no sólo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además, presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. Por ejemplo, son microorganismos fáciles de cultivar y con escasos requerimientos nutricionales, pudiendo utilizar una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía (29).

## **2.6. Enzimas**

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica que catalizan las reacciones químicas en los seres vivos, aumentando la velocidad de la reacción y sin ser consumido en su totalidad al final de la reacción (30).

La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato y este se une en una región concreta de la enzima, denominada centro activo el cual es formado por aminoácidos, los cuales al entrar en contacto con el sustrato empiezan la reacción para originar el desdoblamiento del sustrato formando un producto (31).

Según la Unión Internacional de Bioquímica las enzimas se distribuyen en seis clases, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada.

- Oxidoreductasas: Realizan transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H).
- Transferasas: Ejecutan reacciones de transferencia de grupos funcionales.
- Liasas: Adicionan grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos funcionales.
- Isomerasas: Realizan transferencia de grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas.
- Ligasas: Realizan una formación de enlaces mediante reacciones de condensación acoplada a la rotura de ATP.
- Hidrolasas: Estas rompen enlaces mediante reacciones de hidrólisis en las que el enlace es roto gracias a la incorporación de una molécula de agua, de tal forma que el grupo OH se incorpora a un componente y el H al otro componente (32).

**- Generalidades e importancia de enzimas bacterianas extracelulares.**

Las enzimas son generalmente proteínas cuya función es la de catalizar reacciones químicas o bioquímicas con una relativamente alta especificidad sobre los reactantes o sustratos.

El estudio de las enzimas y sus aplicaciones han aumentado representativamente gracias al desarrollo de la Genética y Biología Molecular, sin embargo, ya en el siglo pasado, patentaron una amilasa bacteriana capaz de eliminar el almidón de las prendas textiles. En 1979 cerca de 80 % de los detergentes contienen enzimas hidrolíticas; muchas enzimas microbianas se han aislado desde entonces para utilizarlas en la industria como amilasas, proteasas, lipasas, DNAsas, celulasas, isomerasas y catalasas.

Las enzimas producidas por microorganismos extremófilos se destacan por su capacidad de actuar en rangos extremos de temperatura, pH o salinidad, lo cual es beneficioso en procesos industriales y proporciona nuevas posibilidades en los procesos biocatalíticos (33).

Al estudiar las actividades enzimáticas de las bacterias halófilas, en particular, al relacionar la tolerancia a la sal se diferencian tres categorías enzimáticas: a) enzimas intracelulares o citoplasmáticas, que están expuestas a la baja concentración de iones y a la presencia de solutos orgánicos característicos del medio intracelular pero no están expuestas a concentraciones salinas del medio externo; b) enzimas asociadas a la membrana, en las que se incluyen las proteínas de transporte, expuestas a los dos medios extra e intracelular; c) enzimas extracelulares propiamente dichas que se encuentran con directa exposición a las concentraciones salinas externas (34).

## **2.7. Tipos de enzimas**

- **Peptidasas**

Las enzimas proteolíticas o proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis específica de uno o varios enlaces peptídicos a diferentes grados de intensidad y selectividad dentro de una proteína, por lo que son también llamadas peptidasas. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Debido a la amplia aplicación que estas enzimas tienen en la industria, es muy importante el hallazgo de nuevas enzimas con características útiles para los procesos industriales.

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas se clasifican en:

- Endopeptidasas: Son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.
- Exopeptidasas: Actúan sobre enlaces terminales de una proteína (aminopeptidasas y carboxipeptidasas), basándose en su sitio de acción sobre el N o el C terminal (35).

Además de su importancia fisiológica, este grupo de enzimas tiene un enorme interés industrial siendo ampliamente utilizado en la industria de detergentes, alimentos, bebidas, textil o papelería. Por otro lado, a pesar de que las proteasas poseen una acción muy específica, es un grupo de enzimas muy diverso, por lo que resulta muy atractivo para su explotación en bioprospección (36).

#### - **Amilasas**

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son las enzimas responsables de la degradación del almidón hidrolizando los enlaces glucosídicos alfa-1-4.

Las amilasas se pueden dividir en tres grupos:

- Alfa-amilasas: Rompen al azar los enlaces en el interior del sustrato (endoamilasas).
- Beta-amilasas: Hidrolizan ordenadamente unidades de maltosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (exoamilasas).
- Glucoamilasas: Liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (37).

#### - **Nitrogenasa**

Las nitrogenasas son enzimas utilizadas por las bacterias fijadoras de nitrógeno, reduce el nitrógeno ( $N_2$ ) para formar amonio. Las nitrogenasas son enzimas oxidorreductasas que catalizan reacciones de tipo óxido-reducción, específicamente la reducción de nitrógeno molecular, este es muy inerte, y por lo tanto difícil de hacer reaccionar debido a la fortaleza de su triple enlace (38).

Entre las bacterias, la actividad de fijación de nitrógeno se encuentra distribuida entre Eubacterias y Arqueobacterias y entre heterótrofos y autótrofos. Estos organismos recuperan y reutilizan el nitrógeno soluble biológicamente, amoníaco, aminoácidos y nucleótidos, esto permite mantener el ciclo del nitrógeno en su gran totalidad (38).

## **2.8. Actividad enzimática**

La actividad enzimática es la reacción específica de una enzima con un determinado sustrato.

#### - **Amilolítica**

El almidón es un polímero de origen natural, está compuesto principalmente por dos tipos de alfa glucanos, amilosa, constituida por 1.000 a 5.000 moléculas de glucosa y amilopectina, formada por 6.000 a 20.000 unidades de

glucosa. Los microorganismos amilolíticos utilizan enzimas reductoras para producir azúcares simples.

La hidrólisis biológica del almidón está ligada a la síntesis de enzimas extracelulares de tipo amilasas las cuales hidrolizan la molécula para poderla integrar a la célula y completar su metabolismo, entre el grupo de microorganismos encontrados capaces de producir amilasas se encuentran algunas especies de actinobacterias aisladas de suelos terrestres o sedimentos marinos (39).

#### - **Proteolítica**

La proteólisis es la degradación de proteínas mediante enzimas específicas llamadas Peptidasas. Estas actúan sobre diversos substratos naturales y sintéticos, como la caseína.

La caseína es una fosfoproteína presente en la leche, asociadas al calcio formando así agregados que se denominan micelas de caseína. Se utiliza en la elaboración de productos no alimentarios: pegamentos y pinturas, cubiertas protectoras, plásticos.

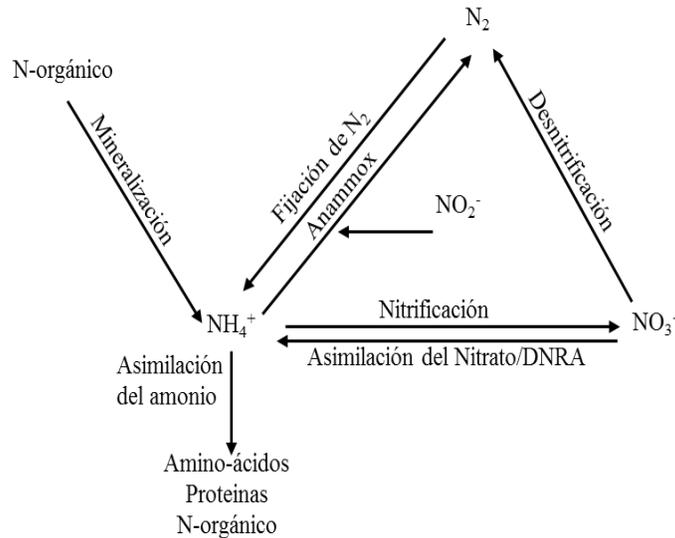
La hidrólisis de la caseína está ligada a la síntesis de enzimas extracelulares de tipo caseínas las cuales hidrolizan la molécula para poderla integrar a la célula y completar su metabolismo, los microorganismos son capaces de usar los aminoácidos de esta proteína como fuente de energía y de carbono (40).

#### - **Actividad enzimática del Ciclo del Nitrógeno**

##### ● **Fijación del Nitrógeno.**

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno (*figura 1*) comienza con la transformación del nitrógeno ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4^+$ ). Este proceso es llevado a cabo principalmente por bacterias, y se le denomina fijación biológica del nitrógeno. Las bacterias capaces de oxidar el nitrógeno contienen en su genoma genes *nif* que codifican para el complejo enzimático nitrogenasa, una enzima capaz

de romper el triple enlace covalente del nitrógeno (33).



**Figura 1:** Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

- **Nitrificación**

La nitrificación es el procedimiento en el cual el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) puede oxidarse a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) mediante un proceso de dos etapas. En la primera etapa, el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se oxida a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), vía hidroxilamina ( $\text{NO}_2\text{OH}$ ) por la enzima amonio monooxigenasa (Amo). En la segunda etapa, el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) formado se reduce a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por el nitrito oxidoreductasa.

Este nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) puede ser reducido por la enzima nitrato reductasa asimilatoria (Nas) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), y este a su vez puede convertirse por la enzima nitrito reductasa (Nir) en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y posteriormente, es asimilado mediante la vía glutamina sintetasa (GS)- glutamato sintasa (GOGAT) (34).

- **Desnitrificación**

La desnitrificación es la oxidación anaeróbica del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) empleando nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como aceptor de electrones. A este proceso se le denomina anammox (anaerobic ammonia oxidation).

Es la forma secuencial del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y/o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ), vía en la que se usan como intermediarios el óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $\text{NO}_2$ ):  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

La respiración del nitrato produce ATP ya que el nitrato reductasa y el óxido nítrico reductasa son enzimas integrales de membrana que acoplan la translocación de protones a la reducción del nitrato y del óxido nítrico. No obstante, la desnitrificación rinde menos ATP que la respiración oxigénica, pero es suficiente para permitir el crecimiento de las bacterias que lo realiza (41).

## **2.9. Actividad y aplicación de enzimas psicrófilas**

Las enzimas de bacterias psicrófilas no poseen tantos aminoácidos con varios enlaces iónicos (aminoácidos cargados) para mantener su estructura, pues la misma no es muy afectada por la temperatura en la que se desarrolla, y el término entrópico es lo suficientemente bajo como para que la enzima se permita poseer aminoácidos hidrofóbicos en su superficie (12).

En el caso de las enzimas activas en frío que exhiben una débil afinidad por el sustrato, la magnitud de la barrera de energía se reduce y, por lo tanto, la actividad se incrementa. Este enlace termodinámico entre la afinidad y la actividad es válido para la mayoría de enzimas (extremófilas o no) bajo concentraciones saturantes de sustrato, este enlace parece estar implicado en la mejora de la actividad a bajas temperaturas en numerosas enzimas activas (42).

La actividad termolábil de las enzimas de psicrófilas sugiere que la dinámica de las cadenas laterales funcionales en el sitio activo se mejora con el fin de

contribuir a la actividad en frío, y las adaptaciones estructurales y de tal modo dar mejor accesibilidad al sustrato y liberación del producto (43).

Como consecuencia de sus propiedades únicas de eficiencia catalítica y estabilidad, las enzimas adaptadas a bajas temperaturas encuentran múltiples y muy variadas aplicaciones comerciales.

Los detergentes constituyen la aplicación principal de las enzimas industriales. El mercado de proteasas, lipasas, amilasas y celulasas, enzimas usadas comúnmente como aditivos en detergentes, representa cerca del 40 % de las ventas totales. Las enzimas adaptadas al frío tienen gran potencial en el desarrollo de detergentes eficientes a temperatura ambiente (25).

Las  $\beta$ -galactosidasas criofílicas representan alternativas interesantes para la remoción de lactosa en la leche con el fin de incrementar la digestibilidad y el dulzor. Pueden ser usadas durante el transporte y almacenamiento.

Existen antecedentes de uso de pectinasas en los procesos de clarificación de jugos; lipasas en el desarrollo de sabores gracias a su alta especificidad de sustrato; y proteasas para incrementar la digestibilidad de alimento animal y ablandar carnes. Estas enzimas pueden ser usadas adicionalmente en la producción de compuestos químicos de alto valor agregado, tales como péptidos, ácidos grasos, polisacáridos, entre otras (44).

Las celulasas psicrófilicas son usadas en el tratamiento de telas de algodón para restaurar la suavidad y reducir la formación de pelusas, originadas a partir de fibrillas prominentes. Este procedimiento se denomina "biopulido". Producto de su inestabilidad intrínseca, las celulasas psicrófilicas pierden su actividad en forma progresiva. Esto minimiza la pérdida de resistencia mecánica en los tejidos, inconveniente tradicional asociado al biopulido (45)

## DISEÑO METODOLÓGICO

### **Tipo de Investigación**

Esta investigación es de tipo cuantitativa, descriptiva.

### **3.1. Universo, población y muestra**

**Universo** - Agua marina antártica con todos sus microorganismos bacterianos vivos.

**Población** - Todo tipo de microorganismos bacterianos presentes en la muestra de agua marina procedente de la Antártida

**Muestra** - Diversidad bacteriana aislada de agua marina antártica.

### **3.2. Hipótesis, Variables e indicadores**

#### **Hipótesis**

Los aislamientos bacterianos de agua marina Antártica tienen actividad enzimática en condiciones extremas que pueden utilizarse en bioprospección.

#### **Variables e Indicadores**

**Tabla 1.** Variables e indicadores de la investigación.

Tipo de variable	Indicadores
Actividad enzimática	Aislamientos bacterianos con actividad enzimática proteolítica.
	Aislamientos bacterianos con actividad enzimática amilolítica.
	Aislamientos bacterianos fijadores de nitrógeno.
	Aislamientos bacterianos desnitrificadoras.
Concentración de NaCl	Aislamientos bacterianos con crecimiento en concentración de 3 % de NaCl.
	Aislamientos bacterianos con crecimiento en concentración de 5 % de NaCl.
	Aislamientos bacterianos con crecimiento en concentración de 7 % de NaCl.
	Aislamientos bacterianos con crecimiento en concentración de 10 % de NaCl.
Dilución	Aislamientos bacterianos en dilución 1:2 en fase de enriquecimiento.
	Aislamientos bacterianos en dilución 1:4 en fase de enriquecimiento.
Temperatura	Aislamientos bacterianos a temperatura de 5 °C.
	Aislamientos bacterianos a temperatura de 10 °C.
	Aislamientos bacterianos a temperatura de 20 °C.

### **3.3. Técnicas y procedimientos**

#### **FASE 1. Recuperación de microorganismos bacterianos de agua marina Antártica.**

##### **- Obtención de agua marina Antártica.**

El Programa Antártico Colombiano realizado por la Armada Nacional de Colombia, realizó la Expedición Almirante Padilla 2016 - 2017 donde tomaron diferentes muestras, varias otorgadas al grupo de investigación Bioprospección de la Universidad de la Sabana (GIBP) siendo el grupo Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca invitado para trabajar la parte microbiológica.

En la presente Investigación se utilizaron 30 mL de agua marina Antártica recolectada el 22 de enero del 2017.

Coordenadas: -64.583S -62.257W

Método de recolecta: Botella roseta 30 m depth.

Se transportaron en tubo falcón, congeladas a - 80 °C con nitrógeno líquido en nevera de icopor manteniéndose a esta temperatura hasta su ensayo.

##### **- Recuperación de bacterias cultivables procedentes de agua marina Antártica.**

Todos los procedimientos se realizaron en el Laboratorio del grupo Ceparium de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físico-químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se

realiza mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos. El crecimiento exponencial de las bacterias permite producir un gran número de ellas a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de incubación en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia observable a simple vista.

Se elaboró caldo nutritivo adicionado extracto de levadura y peptona. En cuatro matraces de Erlenmeyer se dividió en partes iguales; a cada uno de ellos se le agregó una concentración diferente de NaCl: 3 %, 5 %, 7 % y 10 % para así simular las condiciones salinas del agua marina antártica (4,5 % - 6,5 % de NaCl) (46).

En tubos eppendorf tapón rosca de 1,5 mL se agregó 400 uL de caldo nutritivo modificado con las diferentes concentraciones de NaCl y 400 uL de la muestra del agua marina antártica "1:1". Se procedió a realizar diluciones seriadas en base 2, de 1:2 hasta 1:8.

Teniendo en cuenta la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias psicrófilas y psicrótrofas se incubaron los tubos eppendorf de cada concentración de sal a 5°C, 10 °C y 20 °C, controlando estas temperaturas con termómetro digital. Se observa durante quince días día a día evidencia de turbidez.

Para evidenciar crecimiento en cada tubo, se realizó coloración de Gram, se tomó una muestra de caldo nutritivo con turbidez con un asa estéril y se realizó el frotis en lámina fijándolo con calor; después, se tiñó durante 1 minuto con cristal violeta y se lavó con agua; el lugol de Gram se colocó por 1 minuto y se lavó de nuevo con agua, se decoloró con alcohol de Gram durante 30 segundos y se enjugó; la fucsina de Gram (color de contraste) también fue colocada durante 1 minuto y se enjugó con agua por última vez (47).

## **FASE 2. Aislamiento de microorganismos bacterianos cultivables procedentes de agua marina Antártica.**

### **- Preparación de Medio de cultivo.**

Se preparó agar nutritivo con las mismas condiciones del caldo nutritivo modificado, con las diferentes concentraciones de NaCl: 3 %, 5 %, 7 % y 10 %.

Las estructuras bacterianas observadas al microscopio, en la coloración de Gram, se sembraron en el medio de cultivo, y posteriormente se incubaron a las temperaturas establecidas (5 °C, 10 °C y 20 °C).

### **- Aislamiento de cepas bacterianas que lograron crecer en fase de recuperación.**

Durante quince días, se hizo observación macroscópica de los medios de cultivo, en las que se logró observar crecimiento en el momento del enriquecimiento. Para corroborar la pureza de la cepa aislada, cada tres días se realizó coloración de Gram.

## **FASE 3. Actividad enzimática de bacterias cultivables aisladas de agua marina Antártica.**

### **- Actividad proteolítica.**

Para el estudio de la actividad proteolítica se utilizó agar leche, siendo la caseína de la leche el sustrato (proteína), cuando se mezcla la leche con el medio de cultivo, el medio pierde su transparencia y se vuelve turbio debido a que la caseína reacciona con los iones de calcio del medio y forma complejos moléculas insolubles de caseinato de calcio. Cuando la enzima caseinasa cataliza la hidrólisis de la caseína, los aminoácidos resultantes se disuelven en el medio y se torna de nuevo transparente alrededor de la colonia del

microorganismo. Este fenómeno permite detectar la degradación de la proteína en el medio.

Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 35556 *Staphylococcus aureus*.

Como control negativo no se realizó siembra.

- **Actividad amilolítica.**

Para el estudio de la actividad amilolítica de las cepas aisladas, se utilizó agar almidón, siendo el almidón (polímero de glucosa) el sustrato, el lugol actúa como revelador mostrando un color café-púrpura que desaparece cuando el almidón ha sido degradado.

Como control positivo se utilizó la cepa *Bacillus megaterium* ATCC 1458.1

Como control negativo no se realizó siembra.

- **Fijación de nitrógeno:**

Para la fijación de nitrógeno se usó el medio de cultivo Ashby Manitol Agar, usando la asparagina como fuente de nitrógeno. Organismos que poseen la enzima nitrogenasa, convierten el nitrógeno en formas de amina y/o amonio para su aprovechamiento.

Se utiliza manitol como fuente de carbono y nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno. El fosfato dipotásico proporciona amortiguación al medio. Varios iones esenciales necesarios para promover el crecimiento de los microorganismos también están disponibles en el medio.

Como control positivo se utilizó la cepa *Klebsiella pneumoniae*.

Como control negativo no se realizó siembra.

- **Desnitrificación**

Para las bacterias desnitrificadoras se usó el medio de cultivo Asparagine Nitrate Medium. La transformación del nitrógeno en el suelo da como resultado la pérdida de nitrógeno molecular. La conversión de nitrato y nitrito en nitrógeno molecular u óxido nitroso a través de procesos microbianos se

conoce como desnitrificación (48). La asparagina es fuente de nitrógeno orgánico y está disponible para la energía microbiana y el crecimiento, mientras que las sales en el medio ayudan al crecimiento de microorganismos.

Los aislamientos obtenidos, serán conservados de acuerdo con el protocolo descrito por Sánchez L. y Corrales L. (49) (50).

### 3. RESULTADOS

#### 4.1. Aislamiento de microorganismos bacterianos cultivables procedentes de agua marina Antártica.

A los quince días de observación diaria, e incubación, se aislaron dieciocho cepas bacterianas en medio nutritivo modificado: trece a 20 °C, cuatro a 5 °C y una a 10 °C, de tal modo, las trece que crecieron a 20 °C se clasifican como bacterias psicrótrofas y las otras cinco que crecieron a 10 °C y 5 °C, se denominan psicrófilas.

Diez cepas de las dieciocho aisladas, fueron clasificadas dentro de las bacterias halófilas moderadas por tener un crecimiento óptimo entre 6 % y 10 % de NaCl, y ocho cepas como bacterias halófilas leves por tener un crecimiento óptimo < 6 %, en este caso, 3 % de NaCl.

Según observación morfológica en tinción de Gram, ocho corresponden a cocobacilos Gram negativos, siete son bacilos Gram negativos y los 3 restantes cocos Gram positivos; siendo así quince Gram negativos y tres Gram positivos.

**Tabla 2.** Características de crecimiento de los dieciocho aislamientos bacterianos.

Cepa No.	Temperatura	Dilución	NaCl	Tinción Gram
1	5 °C	1:2	3 %	Cocobacilos Gram negativos
2	5 °C	1:4	5 %	Bacilos Gram negativos

<b>3</b>	5 °C	1:2	3 %	Bacilos Gram negativos
<b>4</b>	10 °C	1:2	3 %	Cocos Gram positivos
<b>5</b>	5 °C	1:2	3 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>6</b>	20 °C	1:2	3 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>7</b>	20 °C	1:2	7 %	Bacilos Gram negativos
<b>8</b>	20 °C	1:2	10 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>9</b>	20 °C	1:2	5 %	Bacilos Gram negativos
<b>10</b>	20 °C	1:2	5 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>11</b>	20 °C	1:2	10 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>12</b>	20 °C	1:2	7 %	Cocos Gram positivos
<b>13</b>	20 °C	1:4	3 %	Bacilos Gram negativos
<b>14</b>	20 °C	1:2	3 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>15</b>	20 °C	1:4	3 %	Cocobacilos Gram negativos
<b>16</b>	20 °C	1:2	7 %	Cocos Gram positivos

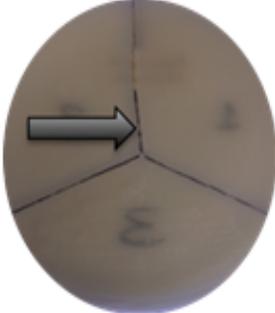
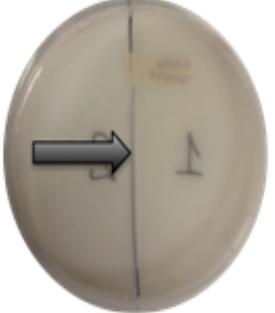
<b>17</b>	20 °C	1:2	5 %	Bacilos largos Gram negativos
<b>18</b>	20 °C	1:2	5 %	Bacilos largos Gram negativos

#### **4.2. Actividad enzimática de bacterias cultivables aisladas de agua marina Antártica.**

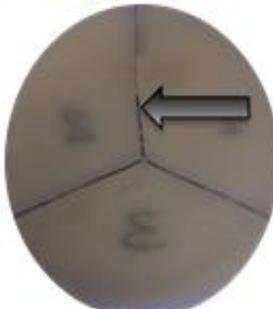
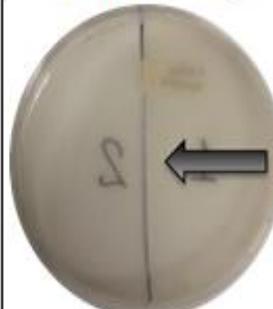
De igual forma que en la fase de aislamiento, se incubaron en la temperatura correspondiente: 5 °C, 10 °C y 20 °C en la que cada cepa obtuvo un crecimiento óptimo; a los quince días de observación diaria se procedió a observar su actividad enzimática teniendo en cuenta si en el medio sembrado se requería o no de un revelador de la reacción enzimática.

De las dieciocho cepas analizadas, once producen la enzima amilasa, cuatro aislamientos bacterianos son desnitrificadores y producen la enzima nitrogenasa, y, ninguna produce la enzima proteasa. A continuación, se presentan en las Tablas 3 hasta la 20 los resultados por dilución.

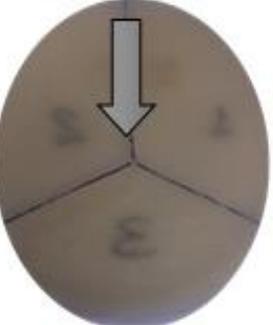
**Tabla 3.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 1 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 1.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 5°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color amarillo blanquecino, bordes irregulares, secas y duras.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

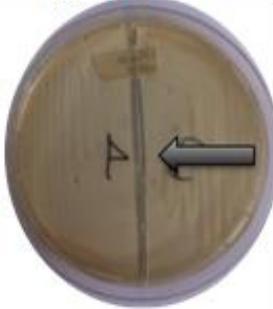
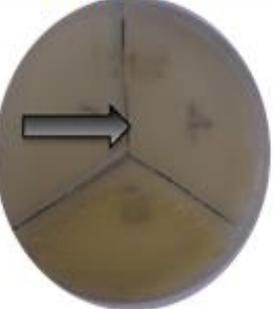
**Tabla 4.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 2 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 2.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:4, bacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 5°C en agar nutritivo modificado con 5% de NaCl. Colonias color amarillo, planas, bordes enteros y lisos de consistencia viscosa.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

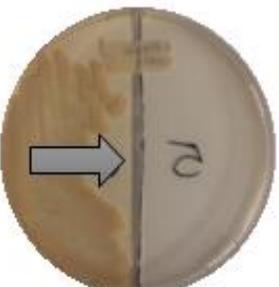
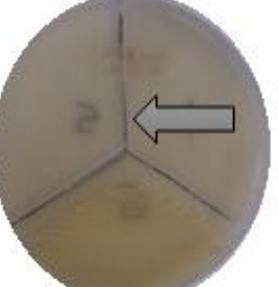
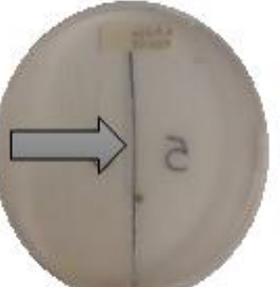
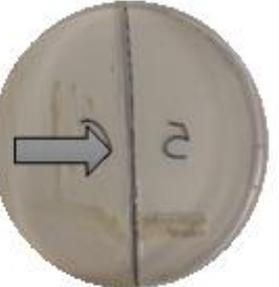
**Tabla 5.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 3 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 3.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, bacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 5°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>Si produce nitrogenasa</p>	<p>Es una bacteria que desnitrifica</p>

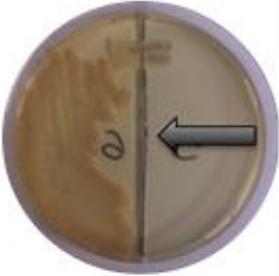
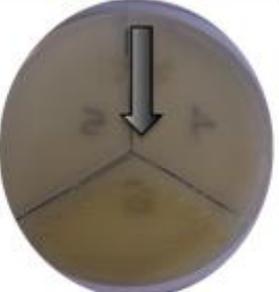
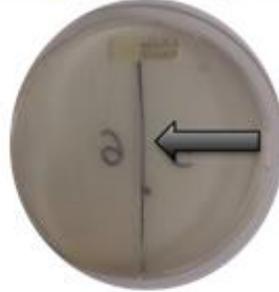
**Tabla 6.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 4 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 4.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocos Gram positivos, crecimiento óptimo a 10°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color naranja fluorescente, planas, bordes enteros y lisos de consistencia seca.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

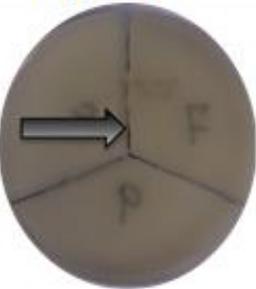
**Tabla 7.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 5 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 5.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 5°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color amarillo blanquecino, bordes irregulares, secas y duras.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

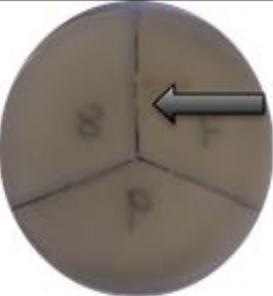
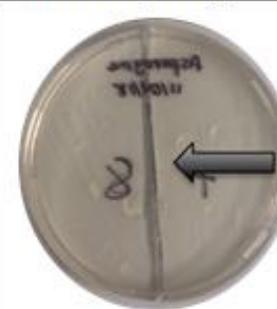
**Tabla 8.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 6 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 6.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color amarillas blanquecinas, circulares puntiformes, bordes regulares de consistencia dura.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>Si produce nitrogenasa</p>	<p>Es una bacteria que desnitrifica</p>

**Tabla 9.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 7 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 7.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, bacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 7% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares grandes, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

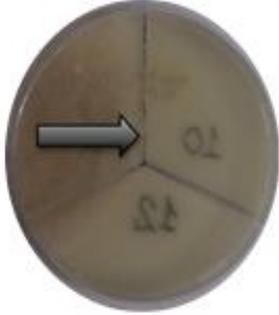
**Tabla 10.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 8 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 8.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 10% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

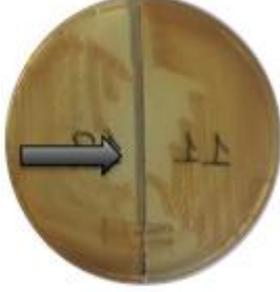
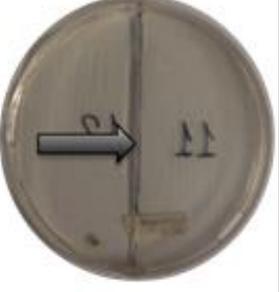
**Tabla 11.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 9 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 9.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, bacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 5% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares grandes, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

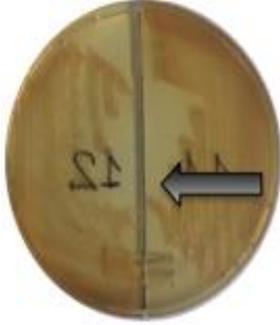
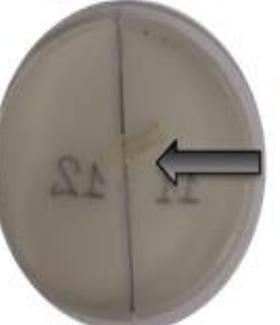
**Tabla 12.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 10 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 10.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 5% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

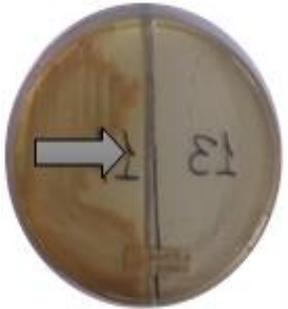
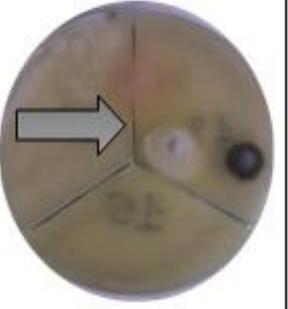
**Tabla 13.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 11 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 11.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 10% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

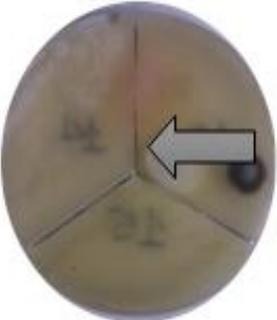
**Tabla 14.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 12 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 12.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocos Gram positivos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 7% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

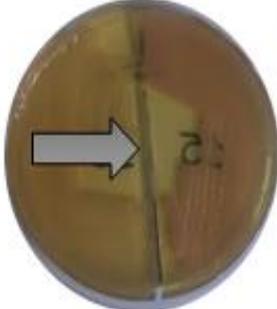
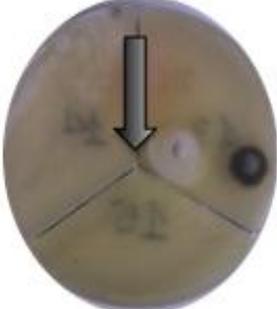
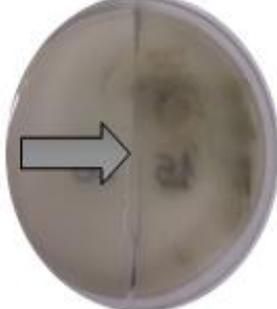
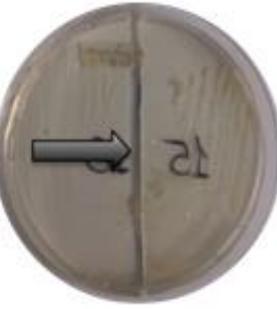
**Tabla 15.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 13 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 13.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:4, bacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares puntiformes, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

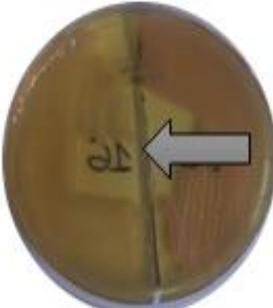
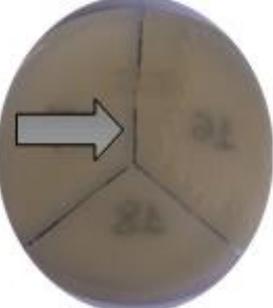
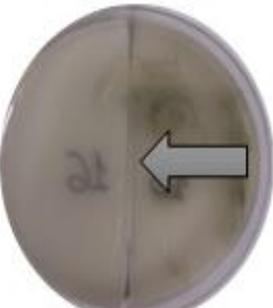
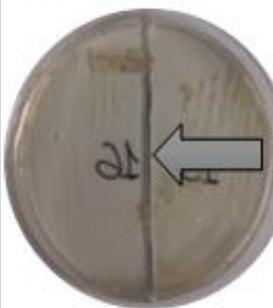
**Tabla 16.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 14 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 14.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color cafés, circulares, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

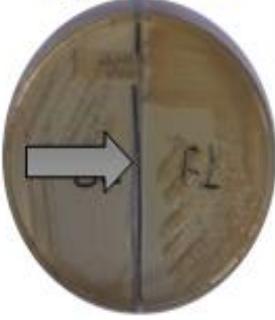
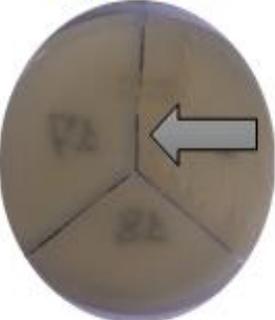
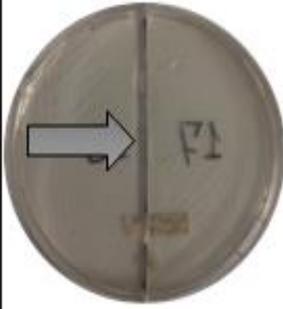
**Tabla 17.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 15 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 15.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:4, cocobacilos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 3% de NaCl. Colonias color blanquecinas, circulares, bordes irregulares de consistencia seca.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>Si produce nitrogenasa</p>	<p>Es una bacteria que desnitrifica</p>

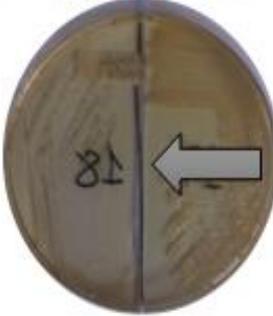
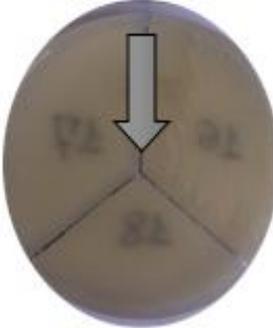
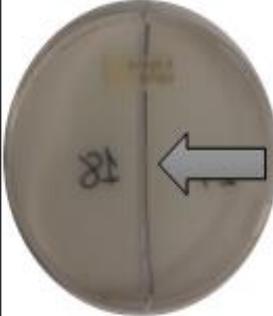
**Tabla 18.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 16 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 16.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
Dilución 1:2, cocos Gram positivos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 7% de NaCl. Colonias color café, circulares pequeñas, bordes irregulares de consistencia seca.	Si produce la enzima amilasa	No produce la enzima proteasa	Si produce nitrogenasa	Es una bacteria que desnitrifica

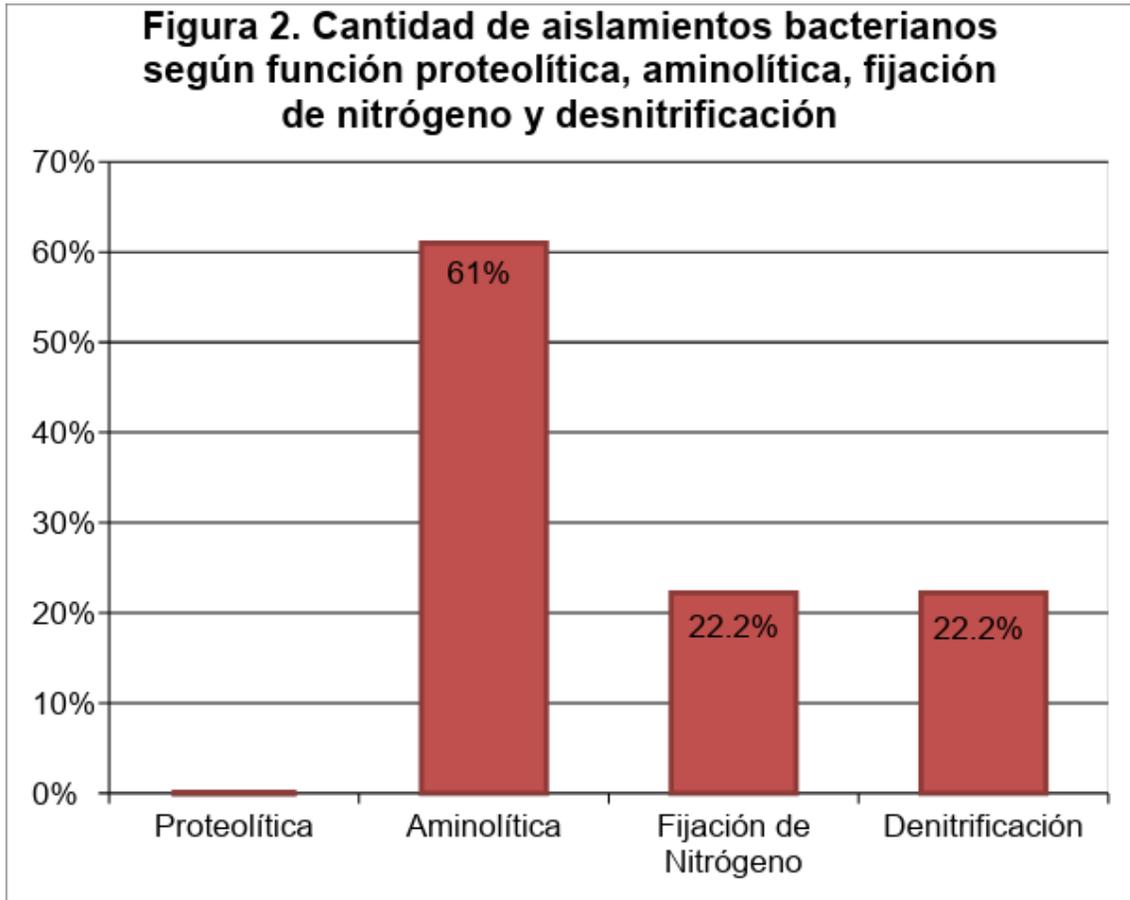
**Tabla 19.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 17 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 17.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, bacilos largos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 5% de NaCl. Colonias color café, circulares grandes, bordes regulares de consistencia viscosa.</p>	<p>Si produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

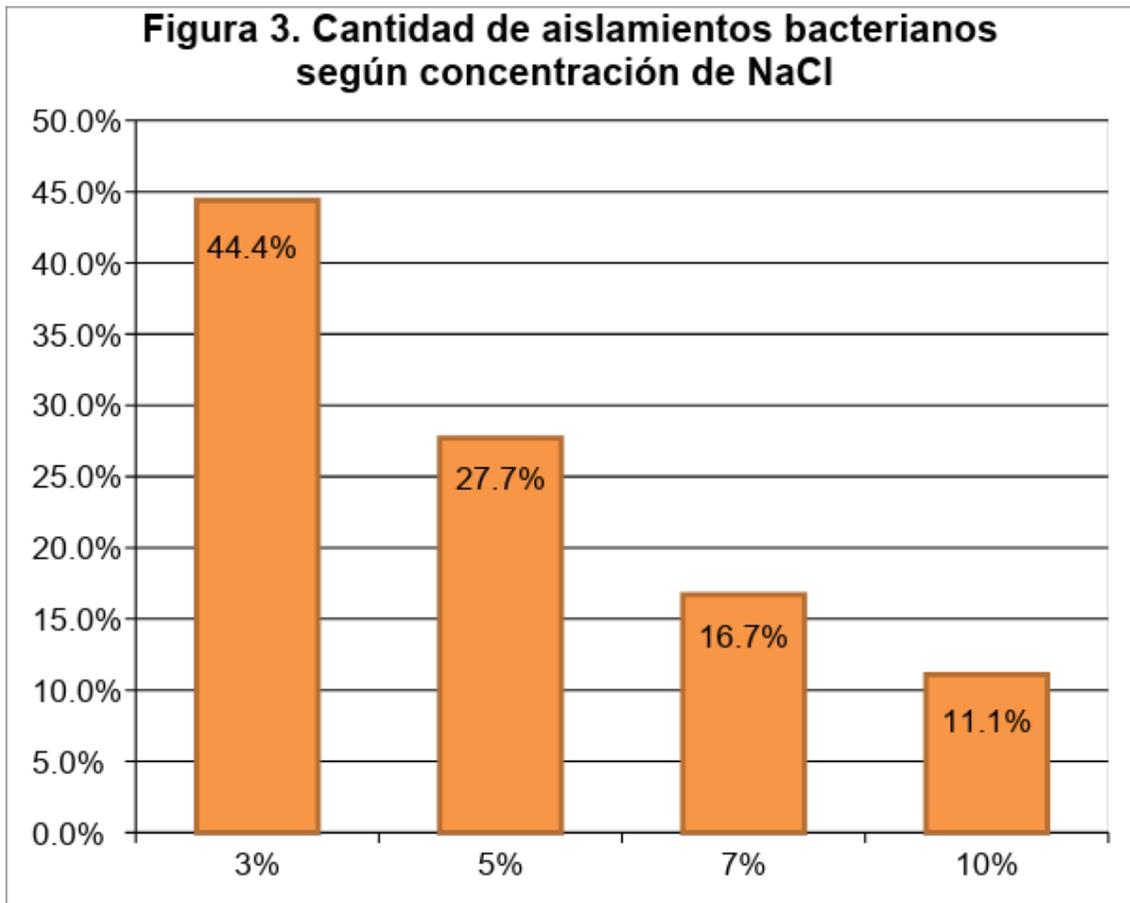
**Tabla 20.** Características de crecimiento óptimo y actividad enzimática de la cepa 18 aislada de agua marina antártica.

<b>Cepa 18.</b>				
Medio nutritivo	Agar almidón	Agar Leche	Medio Ashby	Medio Asparagine
				
<p>Dilución 1:2, bacilos largos Gram negativos, crecimiento óptimo a 20°C en agar nutritivo modificado con 5% de NaCl. Colonias color café, circulares grandes, bordes irregulares de consistencia viscosa.</p>	<p>No produce la enzima amilasa</p>	<p>No produce la enzima proteasa</p>	<p>No produce nitrogenasa</p>	<p>No son bacterias que desnitrifican</p>

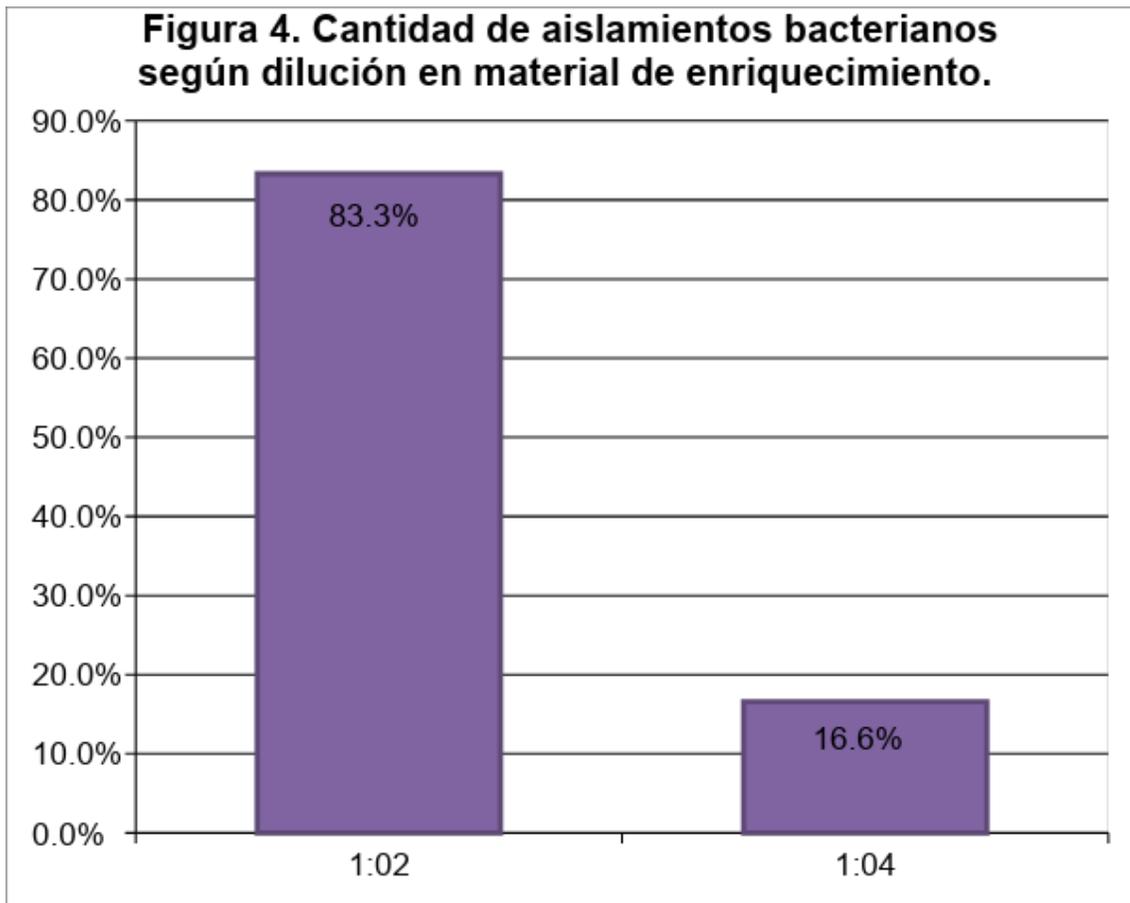
La **figura 2**, muestra la cantidad de aislamientos bacterianos según actividad enzimática; 61,1 % son bacterias amilolíticas, 22,2 % son bacterias desnitrificadoras y fijadoras de nitrógeno y 0 % bacterias proteolíticas.



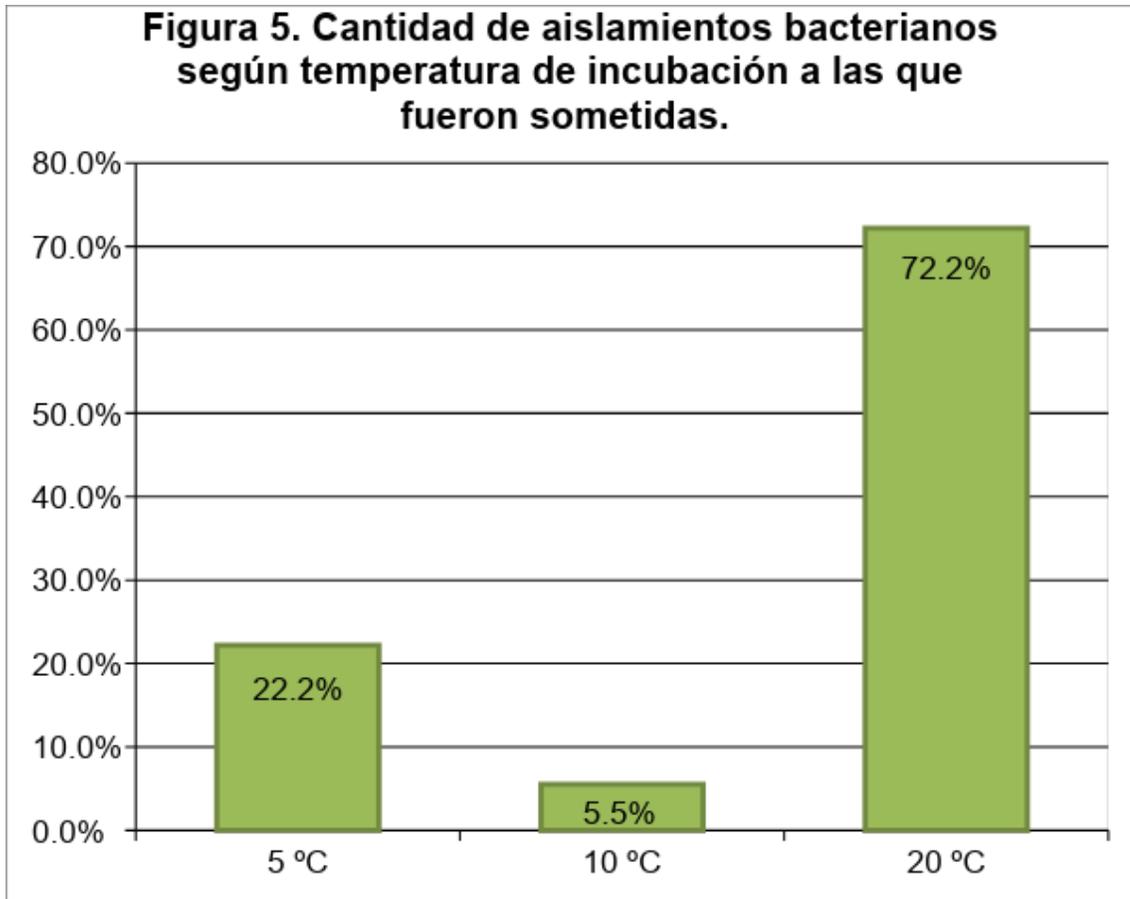
La **figura 3**, muestra la cantidad aislamientos bacterianos según su capacidad de crecer a concentraciones diferentes de NaCl. 28,4 % de las bacterias son halófilas moderadas (6 % - 15 %) y el 72,1 % halófilas leves (<6 %) (28).



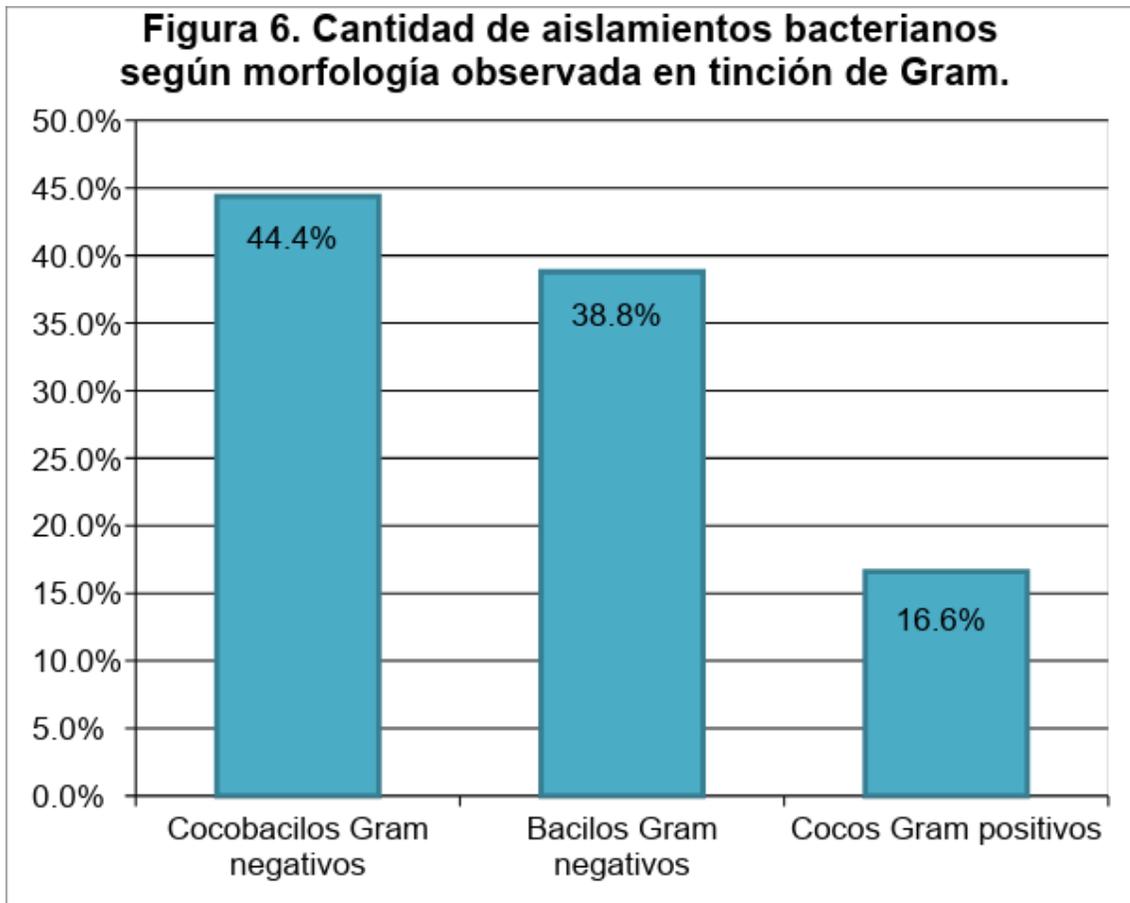
La **figura 4**, muestra la cantidad de aislamientos bacterianos según la dilución realizada para su óptimo aislamiento, así el 83,3 % de las bacterias aisladas fueron de una dilución de 1:2 y el 16,6 % de una dilución de 1:4.



La **figura 5**, muestra la cantidad de aislamientos bacterianos según temperatura de incubación a las que fueron sometidas en todo el proceso, dando como resultado poder clasificarlas en dos tipos: El 72,2 % de las bacterias son psicrótrofas (crecimiento óptimo de 20 °C a 25 °C) (48) y el 27,7 % son psicrófilas (>4 °C – 20 °C) (51).



La **figura 6**, muestra la cantidad de aislamientos bacterianos morfología descrita a través de la tinción de Gram, demostrando que la mayoría de las bacterias aisladas de agua marina Antártica con un 83,2 % son Gram negativas y el 16,6 % Gram positivas.



## 5. DISCUSIÓN

“La bioprospección relacionada con biodiversidad, se podría definir como la búsqueda sistemática de genes, componentes naturales y organismos completos, de la naturaleza, buscando darles un potencial para el desarrollo de productos” (27). De forma abreviada, bioprospección se puede definir como la explotación de la biodiversidad con el fin de otorgar valor comercial a los recursos genéticos y bioquímicos (52). La bioprospección genera productos que tienen relación con industrias como la farmacéutica, la biotecnológica, la de agro insumos; entre otras (53). En las últimas décadas la bioprospección ha cobrado gran importancia, debido a que los países buscan conservar su biodiversidad y compartir los beneficios que esta ofrece (54).

Las temperaturas a las que se realizó la evaluación de la actividad enzimática fueron de 5 °C, 10 °C y 20 °C, ninguna siendo la adecuada para la producción de proteasas, ya que estas tienen un crecimiento óptimo a temperaturas de 20 °C a 30 °C y mantenerse a 35 °C, siendo la posible causal de que ninguna cepa aislada presentara dicha enzima, en cambio, en el estudio “Isolation and Characterization of Psychrotrophic Antarctic Bacteria from Blue-green Algal Mats and Their Hydrolytic Enzymes” realizado por Lokendra S. y Venkata K en 1998 (7), colectaron bacterias psicrófilas de la Antártida, productoras de enzimas proteolíticas, amilolíticas y lipolíticas; en los resultados obtenidos las cepas bacterianas aisladas tienen actividad amilolítica, pero no concuerda con la actividad proteolítica aun así utilizando el mismo medio, agar leche, ya que necesitan una temperatura más alta.

En el presente trabajo, donde se evaluó la actividad proteolítica en las cepas bacterianas aisladas del agua marina antártica, se utilizó la caseína de la leche como sustrato en una concentración aproximada de 0,2 %, siendo notablemente diferente el porcentaje del sustrato de la investigación

“Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros” hecha por peruanos (55), donde utilizaron agar marino suplementado con caseína 1 %, incubadas a 25 °C hasta por 5 días, las cuales presentaron marcada actividad. Posible razón por la que no se pudo evaluar la actividad proteolítica, ya que el porcentaje de caseína fue muy bajo.

El mayor porcentaje obtenido de actividad enzimática en las cepas bacterianas aisladas, fue la amilolítica con el 61,1 % de las bacterias, en comparación con la investigación “Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico)” de Villalta J. (19) que fue del 25 %. Esto podría deberse a que las cepas aisladas en ambos trabajos son diferentes, aunque las temperaturas para producción de la enzima amilasa son similares, se usaron diferentes rangos, de 4 °C – 33 °C y en el presente trabajo entre 5 °C – 20 °C.

Cuatro de las dieciocho cepas bacterianas aisladas muestran actividad desnitrificadora; para saber si tienen o no un proceso incompleto se requiere a futuro realizar estudios complementarios y así saber si contribuirían a emisión de gases invernaderos. Las bacterias que son capaces de realizar la desnitrificación completa, son escasas, ya que no todas las bacterias poseen todas las enzimas, por ejemplo, las bacterias que cuentan con la enzima óxido nitroso reductasa origina la formación de N<sub>2</sub>O, un potente gas invernadero. Resulta ser una paradoja, ya que, la desnitrificación es el único proceso biológico conocido capaz de disminuir el exceso de nitratos que contaminan el medio ambiente (56).

Los microorganismos denominados psicrófilos se caracterizan así por tener una temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o inferior y presentan una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 20 °C (57). En

comparación, los microorganismos psicrótrofos tienen un rango de temperatura de crecimiento más amplio, con un límite de 40 °C, pero la temperatura óptima para su crecimiento está entre 20 °C a 25 °C siendo este grupo considerable por su potencial enzimático (58).

Esto permite inferir que las cepas bacterianas aisladas que crecieron a una temperatura de 20 °C, que fueron el 72,2 %, podrían ser tanto psicrófilas como psicrótrofas. Mantener una temperatura estable fue difícil ya que se utilizó la temperatura ambiente, donde unos días puede subir y otros bajar un poco los grados centígrados. Por lo tanto, estas bacterias pudieron estar sometidas hasta a 25 °C por lo que se podrían considerar psicrótrofas.

De acuerdo a la definición de Kushner, los tipos de microorganismos halófilos son: halófilos débiles con crecimiento óptimo cerca del 3 % de NaCl, halófilos moderados se encuentra en un rango del 6 % al 15 % de NaCl, y halófilos extremos, que presentan un crecimiento óptimo al 25 % de NaCl (28).

Los aislamientos bacterianos en el presente estudio se sometieron a unas concentraciones de 3 %, 5 %, 7 % y 10 % de NaCl; no se sometieron las cepas aisladas a mayores porcentajes de NaCl porque uno de los objetivos era poder recuperar diversidad bacteriana en condiciones de salinidad propicias al ecosistema de origen lo cual es hasta 6,5 % de NaCl. Aun así, se decidió trabajar con 10 % de NaCl para observar su máxima capacidad halotolerante. Dos de las dieciocho cepas crecieron en esta concentración, considerándose como halófilas moderadas. Pérez Davo en 2014 en su investigación "Microorganismos halófilos en ambientes salinos de Andalucía: estudio taxonómico numérico y molecular", sometió desde 0 % hasta 30 % de salinidad los microorganismos estudiados observando crecimiento desde halófilas débiles, hasta halófilas extremas, además, en las concentraciones más elevadas se generan pequeños cristales de sal (59), los mismos cristales

observados en los medios con 10 % de NaCl en el presente estudio, debido a que con el tiempo el medio se va secando y quedan tales formas cristalinas.

En la Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, se estudiaron bacterias Antárticas aisladas a temperaturas de 26 °C, 37 °C y 50 °C en agar nutritivo con adición de 1 %, 5 % y 10 % de NaCl, dentro de los resultados obtenidos, veinte de las treinta y cinco bacterias aisladas crecieron a 5 % de NaCl, doce a 1% y una a 10 % (51). Aunque en ambos estudios se utilizaron diferentes rangos de temperatura para la incubación, los resultados obtenidos en la presente investigación, son similares con respecto a la salinidad. La mayoría de las cepas crecieron entre los rangos 3 % y 5 % de NaCl, siendo las concentraciones más cercanas a las del agua marina, clasificadas dentro de las halófilas leves.

El promedio de crecimiento de las bacterias aisladas fue de 15 días, es una característica de las bacterias psicrótrofas, caracterizadas por su crecimiento lento, en el estudio llamado “Microbial communities associated with Antarctic snow pack and their biogeochemical implications”, realizado por Antonya R., *et. al.* (60), en el cual incubaron los aislamientos de microorganismos a 4 °C y 20 °C y observaron crecimiento dentro de los 2 - 30 días de incubación en los medios líquidos y en medios de agar aparecieron colonias dentro de 3 - 8 días de incubación. En ambas investigaciones, se utilizaron las mismas temperaturas de incubación.

Según la investigación taxonómica realizado por B Elena *et. al.*, denominada “Estudio taxonómico y ecológico de las bacterias marinas de la Antártida” (61), los resultados mostraron que casi todas las bacterias estudiadas eran Gram negativas (96,6 %), lo que es un patrón típico de los ecosistemas marinos fríos, y solo dos microorganismos eran Gram positivos. Estos últimos son competidores pobres por los nutrientes en ecosistemas marinos fríos y se

desarrollan, preferiblemente, en hábitat donde existe una alta concentración de materia orgánica como por ejemplo en los sedimentos marinos, como se demuestra en los datos de investigación en el proyecto llamado “Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetos y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos”, donde 32 de las 33 bacterias aisladas de sedimento de suelo marino corresponden a Gram positivos (62). En la presente investigación, 83,3 % de las cepas bacterianas aisladas son Gram negativas al igual que las aisladas en la referencia citada, ya que son típicas provenientes de ecosistema marino frío y por eso mismo, sólo el 16,6 % de las bacterias son Gram positivas.

Los aislamientos bacterianos no. 1 y 5 tienen los mismos resultados en las variables estudiadas y la misma caracterización macroscópica, lo que indicaría que podría ser la misma cepa. El paso que queda por realizar en este estudio es hacer una identificación genómica para confirmar esta hipótesis.

La riqueza para Bioprospección cuando se busca la actividad enzimática, es, por ejemplo, el caso de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento, porque ellas provienen de bacterias halófilas leves. Por otra parte, se han descrito varias hidrolasas de interés industrial del tipo de las amilasas, proteasas y nucleasas (63). Algunas de las enzimas con actividad enzimática amilolítica y proteolítica que posiblemente fueron producidas al crecer las bacterias en los medios específicos utilizados en el presente trabajo, podrían ser utilizadas en Bioprospección como enzimas para detergentes de lavadoras, síntesis de ácidos grasos, biosensores, formulación de componentes farmacéuticos. Las bacterias que crecieron en los medios de cultivo específicos para fijación de nitrógeno y desnitrificación pueden ser utilizadas en la industria agraria (64).

Las bacterias que demostraron desnitrificación, pueden ser usadas en biorremediación de aguas residuales, como lo demostró la investigación realizada en el 2017, “Application and microbial ecology of psychrotrophs in domestic wastewater treatment at low temperature” hecho por Zhenzhen Xu, et. al. (14) en la que las bacterias psicrófilas estudiadas tuvieron un rendimiento en el tratamiento de aguas residuales domésticas a una temperatura constante de 4 °C, así como las podría tener las cepas bacterianas aisladas de agua marina Antártica.

## 6. CONCLUSIONES

- La concentración de 5 % de NaCl e incubación de 20 °C, fueron las condiciones más adecuadas para lograr un apropiado crecimiento, sin embargo, para determinar la capacidad enzimática, la temperatura se debe aumentar hasta 30 °C.
- Los aislamientos bacterianos no son exigentes nutricionalmente, son de crecimiento lento y en su mayoría Gram negativas, características típicas de bacterias procedentes de ecosistemas marinos fríos.
- El análisis de la actividad enzimática de los aislamientos bacterianos, se realizó eficazmente en los diferentes medios de cultivo utilizados, a excepción de la actividad proteolítica en donde se usó un porcentaje muy bajo de caseína y temperatura de incubación.
- La técnica de congelación utilizada para la conservación bacteriana, permite que los aislamientos al ser descongelados puedan ser utilizados para Bioprospección, ya que estas no sufren cambios fenotípicos.
- A futuro, se recomienda evaluar la actividad de otras enzimáticas características de las bacterias psicrófilas y psicrótrofas y hacer escalamientos para obtener biomasa que pueda ser utilizada en bioprospección.

## 7. REFERENCIAS

1. Cavicchioli R., Charlton T., Erfan H., Mohd S., Siddiqui K., Williams T. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial biotechnology*. [Internet]. 2011 [Citado en Agosto 11 del 2017]; p. 449-460. Disponible en: DOI: 10.1007/s00284-005-4583-9.
2. Convey P., Brandt A., Nicole S. Life in a cold environment. In *Antarctica: Global science from a frozen Continent*. Walton D. W. H. Cambridge University Press, New York. [Internet]. 2013 [Citado en Agosto 2 del 2017]; p. 161- 210. Disponible en: ISBN: 9781107003927.
3. D'Amico S., Collins T., Marx J., Feller G., Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *Laboratory or biochemistry*. Institute of Chemistry, University of Liege, Sart-Tilman, Belgic. [Internet]. 2006 [Citado en Octubre 8 del 2017]; p.385- 389. Disponible en: PMID: 16585939.
4. Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. [Internet]. 2001 [Citado en Octubre 5 del 2017]; p.5: 73-83. Disponible en: PMID: 11354458.
5. Fernando V., Tratado antártico y mecanismos de protección del territorio antártico, 21 *International Law*, *Revista Colombiana de Derecho Internacional*. [Internet]. 2012. [Citado en junio 16 del 2018]; p. 255-295. Disponible en: ISSN:1692-8156.
6. Junke K, Gosink J, Hoppe H, Staley J. *Arthrobacter*, *Brachybacterium* and *Planococcus* Isolates Identified from Antarctic Sea Ice Brine. Description of *Planococcus mcmeekinii*, sp. Nov. *System. Appl Microbiol*. [Internet]. 1998 [Citado en Octubre 12 del 2017]; p.306-314. Disponible en: PMID: 9704115.
7. Lokendra, S., Venkata K. Isolation and Characterization of Psychrotrophic Antarctic Bacteria from Blue-green Algal Mats and Their

Hydrolytic Enzymes. Department of Ocean Development, Technical Publication. [Internet]. 1998. [Citado en Octubre 12 del 2017]; p. 199-206. Disponible en:

<http://14.139.119.23:8080/dspace/bitstream/123456789/424/3/ARTICLE+16.pdf>.

8. Sánchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. y Ventosa, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. [Internet]. 2003. [Citado en agosto 2 del 2018]; p. 94: 295-300. Disponible en: PMID: 12534822.
9. Ventosa A, Quesada E, Rodríguez F, Ruíz F, Ramos A. Numerical taxonomy of moderately halophilic-negative rods. *Journal of General Microbiol.* [Internet]. 1982. [Citado en Julio 11 del 2018]; p. 128: 1959-68. Disponible en: mic-128-9-1959.pdf.
10. Soria, V. Solari, A., Cabot, S., Varela, H. y Loperena, L. Evaluación de bacterias Antárticas como potenciales productores de lipasas de interés industrial. Depto. de Bioingeniería, Inst. Ing. Química, Facultad Ingeniería. [Internet]. 1998. [Citado en octubre 5 del 2017]; Disponible en: <https://es.scribd.com/document/33014692/Evaluacion-de-bacterias-Antarticas-como-potenciales-productoras-de-lipasas-de-interes-industrial>.
11. Mojib N, Philpott R, Huang J, Niederweis M, Bej A. Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 98. [Internet]. 2010. [Citado en octubre 5 del 2017]; p. 531–540. Disponible en: DOI: 10.1007/s10482-010-9470-0.
12. Rosado, A., Arroyo, M. Evaluación de la Actividad Proteolítica Extracelulares Producidas por Bacterias Marinas Aisladas en Punta Fort William, Antártida. Laboratorio de Protal-INTEC, ESPOL-CIBE, Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (IIRN). [Internet]. 2010. [Citado en agosto 9 del 2017]; Disponible en: <https://es.scribd.com/document/58009763/bacterias-marinas>.

13. Antony R, Sanyal A, Kapse N, Dhakephalkar P, Thamban M, Nair S. Microbial communities associated with Antarctic snowpack and their biogeochemical implications. *Microbial Research*. [Internet]. 2016. [Citado en septiembre 12 del 2017]; p. 192-202. Disponible en: PMID: 27664737.
14. Zhenzhen Xu, Yue Ben, Zhonglin Chen, Anxi Jiang, Jimin Shen, Xiaoyun Han. Application and microbial ecology of psychrotrophs in domestic wastewater treatment at low temperature. *Chemosphere*. Volume 191. [Internet]. 2017. [Citada en agosto 26 del 2018]. p. 946-953. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351731706X>.
15. Zaady, E. and Perevolotsky, A. Enhancement of growth and establishment of Oak (*Quercus ithaburensis* Decaine) seedling by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Forest Ecology Management*. [Internet]. 2015. [Citado en agosto 11 del 2017]; p. 238-248. Disponible en: ISSN: 2319-7706
16. Domínguez Y. Bacterias Antárticas y agentes antibacterianos. *Boletín Antártico Chileno*. Vol. 27 No. 1. Punta Arenas, Chile. [Internet]. 2008. [Citado en agosto 2 del 2017]; p. 4-5. Disponible en: <https://www.oceandocs.org/handle/1834/3372?locale-attribute=ru>.
17. Garzón D., Rodríguez C. Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida. Universidad técnica de Ambato. [Internet]. 2013. [Citado en octubre 24 del 2017]; Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3179/1/BQ37.pdf>.
18. Madigan M., Martinko J., Parker J. *Biología de los microorganismos*. Décima edición Pearson Prentice Hall. Madrid. [Internet]. 2004. [Citado en octubre 11 del 2017]; p.151- 155. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/89368128/1-pdfBrock-Biologia-de-Los-Microorganismos-10ed-1089pag-2>

19. Villalta J. Estudio polifásico de bacterias psicrófilas colectadas en la isla Greenwich, Bahía Chile (Continente Antártico). Universidad de Guayaquil. [Internet]. 2013. [Citado en agosto 2 del 2017]; Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/3917>.
20. Castillo F., Roldán M., Blasco R. Biotecnología ambiental. Editorial TEBAR. Madrid. [Internet]. 2005. [Citado en noviembre 6 del 2017]; p. 381- 385, 393- 394. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?Biotechnolog%C3%ADa+ambiental.+Editorial+TEBAR.+Madrid>.
21. Rodríguez C., Gamboa A., Hernández F., García J. Biotecnología general: Principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. [Internet]. 2015. [Citado en noviembre 6 del 2017]; p. 149-157. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=vwB0fgirgN0C&lpg=PR15&ots=xZrhy-pcAh&lr&hl=es&pg=PR15#v=onepage&q&f=false>.
22. Morita R. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 39. [Internet]. 2007. [Citado en abril 27 del 2018]; pp.144–167. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000402.pub2>.
23. Margesin, R., Miteva, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms, Springer Berlin Heidelberg, 162. [Internet]. 2008. [Citado en junio 8 del 2018]; pp.346-361. Disponible en: PMID: 21187146.
24. Hoyoux A., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Huston A., Marx J., Sonan G., Zeng G., Gerday C. Extreme catalysts from low-temperature environments. *J. Biosci. Bioeng*, 98. [Internet] 2004. [Citado en noviembre 6 del 2017]; p. 317- 330. Disponible en: PMID: 16233714.
25. Marx C., Collins S., D'Amico C., Gerday C. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Mar. Biotech*, 90. [Internet]. 2007. [Citado en noviembre 21 del 2017]; p. 293- 304. Disponible en: PMID: 17195087.

26. Alvarado V. Evaluación del exopolisacárido producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noroeste de México y sus potenciales aplicaciones industriales. Facultad de ciencias químicas. [Internet]. 2015. [Citado en junio 8 del 2018]; Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/9408/1/1080214905.pdf>.
27. CASTREE, N. Bioprospecting: from theory to practice (and back again). Transactions of the Institute of British Geographers, 28. [Internet]. 2003. [Citado en junio 24 del 2018]; p. 1: 35-55. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1475-5661.00076>.
28. Kushner, D.J. Vida Microbiana en Ambientes Extremos. Londres: Academic Press. [Internet]. 1978. [Citado en noviembre 29 del 2017]; p. 317-368. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/579/57937307>.
29. Martins LO, Santos H. Accumulation of mannolyglycerate and di-myo-inositol-phosphate by Pyrococcus furious in response to salinity and temperature. Appl Environ Microbiol. [Internet]. 1995. [Citado en noviembre 6 del 2017]; p. 299-303. Disponible en: PMID: 16535119.
30. Fennema R. Química de los alimentos. Editorial Acribia. España. [Internet]. 1993. [Citado en noviembre 17 del 2017]; p. 415- 422, 427-437. Disponible en: <https://sceqa.files.wordpress.com/2014/05/guc3admica-de-los-alimentos-fennema.pdf>.
31. Smalas A., Leiros H., Os V., Willassen N. Cold adapted enzymes. Biotechnol Annu Rev 6. [Internet]. 2000. [Citado en noviembre 29 del 2017]; p. 1- 57. Disponible en: PMID: 11193291.
32. Lehninger L. Principios de Bioquímica. 2da Edición. Editorial Omega. Barcelona, España. [Internet]. 1993. [Citado en octubre 11 del 2017]; p. 196- 237. Disponible en: <http://www.ediciones-omega.es/bioquimica/35-lehninger-principios-de-bioquimica-978-84-282-1603-6.html>.
33. Reed C., Cleveland C., Townsend R. Functional ecology of free-living

- nitrogen fixation: a contemporary perspective. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. [Internet]. 2011 [Citado en Agosto 2 del 2018]; p. 489-512. Disponible en: DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034.
34. Ward B., Arp D., Klotz M. Nitrification. American Society for Microbiology Press, Washington, U.S.A. [Internet]. 2011 [Citado en Agosto 2 del 2018]; Disponible en: [https://www.princeton.edu/nitrogen/publications/pdfs/Ward\\_2015\\_Nitrification.pdf](https://www.princeton.edu/nitrogen/publications/pdfs/Ward_2015_Nitrification.pdf).
35. Peña A. Bioquímica grupo Noriega, México D.F. [Internet]. 2004. [Citado en octubre 11 del 2017]; p. 305. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=EFUP472dyEMC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.
36. Gupta, R., Beg, Q.K. y Lorenz, P. Bacteruak alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Apple Microbiol Biotechnol. [Internet]. (2002). [Citado en noviembre 22 del 2017]; p. 59: 15-32. Disponible en: DOI: 10.1007/s00253-002-0975-y.
37. Rothschild L., Mancinelli L. Life in extreme environments. Nature 409. [Internet]. 2001. [Citado en noviembre 6 del 2017]; p. 1092– 1101. Disponible en: PMID: 11234023
38. Ruiz Herrera Brenda Lizette, Campos González Angulo Jorge Arturo, Barba Behrens Norah. Cofactor FeMco (M = Mo, V, Fe) en la nitrogenasa. Educ. quím. [Internet]. 2008. [Citado en agosto 15 del 2017]; p. 19(1): 34-41. Disponible en: ISSN: 0187-893X.
39. Haritha R, Kumar KS, Mohan J, Ramana T. Amylolytic and proteolytic Actinobacteria Isolated from marine sediments of Bay of Bengal. International Journal of Microbiological Research. [Internet]. 2010 [Citado en Julio 20 del 2018]; 1(2), 37- 44. Disponible en: ISSN: 2079-2093.
40. Leon J., Pellon F., Unda V., Mendoza V. Produccion de enzimas

- extracelulares por bacterias asiladas de invertebrados marinos. *Revista peruana de biología*. [Internet]. 2000. [Citada en Agosto 9 del 2018]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v7i2.6828>.
41. Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. [Internet]. 1997 [Citado en Julio 21 del 2018]; 61(4), 533-616. Disponible en: PMID: 9409151.
42. Fields P., Somero G. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A (4) orthologs of Antarctic notothenioid fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95. [Internet]. 1998. [Citado en septiembre 18 del 2017]; p. 11476– 1148. Disponible en: PMID: 9736762.
43. Cavicchioli R., Charlton T., Erfan H., Mohd S., Siddiqui K., Williams T. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial biotechnology*. [Internet]. 2011. [Citado en noviembre 21 del 2017]; p. 449- 460. Disponible en: DOI: 10.1007/s00284-005-4583-9.
44. Collins T., Dutron A., Georis J., Genot B., Dauvrin T., Arnaut P., Gerday C., Feller G. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. *J. Cereal Sci.* 43. [Internet]. 2006. [Citado en noviembre 6 del 2017]; p. 79-84. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.545.9113&rep=rep1&type=pdf>.
45. Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georlette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis A., Feller, G. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18. [Internet]. 2000. [Citado en noviembre 28 del 2017]; p. 103-107. Disponible en: PMID: 10675897.
46. Bowman J. *Methods for Psychrophilic Bacteria*. University of Tasmania. *Methods in Microbiology*, Volumen 30. [Internet]. 2001. [Citado en febrero 12 del 2018]; p. 591-614. Disponible en: DOI: 10.1016/S0580-9517(01)30064-8.

47. López L., Hernández M., Colín C., Ortega S., Cerón G., Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad. México DF. [Internet]. 2014. [Citado en febrero 12 del 2018]; p. 10-18. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>.
48. Sánchez, Jaime, & Sanabria, Janeth. Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno, una revisión prospectiva. *Revista Colombiana de Biotecnología*. [Internet]. 2009. [Citado en agosto 17 del 2018]; p. 11(1), 114-124. Disponible en: ISSN 0123-3475.
49. Sánchez L., Corrales L. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Nova, Publicación Científica. Vol. 3. [Internet]. 2005. [Citado en abril 24 del 2018]; p. 109-113. Disponible en: URI: <http://hdl.handle.net/10596/6772>.
50. Sánchez L., Corrales L. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova, Publicación Científica, Vol. 3. [Internet]. 2005. [Citado en febrero 12 del 2018]; p. 21-29. Disponible en: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTORIG2\\_4.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_4.pdf).
51. Garzón D. Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida. Ambato-Ecuador. [Internet]. 2013. [Citada en agosto 9 del 2018]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/3179>.
52. LAIRD, S; ten KATE, K. Biodiversity prospecting: the commercial use of genetic resources and best practice in benefit-sharing. In: Biodiversity and Traditional Knowledge. Equitable Partnerships in Practice. Edited By Sarah A. Laird. Earthscan Publications Ltd, London, Sterling, VA. Section IV, Chapter 8. [Internet]. 2002. [Citado en Julio 11 del 2018]; p. 241-286. Disponible en: <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2003-25.pdf>.

53. MORAN, K.; KING, S.; CARLSON, The Biodiversity Prospecting Lessons and Prospects Annual Review of Anthropology. [Internet]. 2001. [Citado en Julio 23 del 2018]. p. 30: 505-526. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.30.1.505>.
54. Centro de Información y Comunicación Ambiental de Norte América, Bioprospección. [Internet]. 2017. [Citado en Julio 11 del 2018]; Disponible en: <http://www.ciceana.org.mx/contenido.php?cont=197>.
55. Sánchez T., Leon J., Woocoltt J., Arauco K. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Rev. Perú biol* vol.11. [Internet]. 2004. [Citado en febrero 12 del 2018]; Disponible en: ISSN 1727-9933.
56. Correa Galeote, D. Biodiversidad y ecología funcional de bacterias desnitrificantes. Granada: Universidad de Granada. [Internet]. 2016. [Citado en agosto 2 del 2018]; Disponible en: [\[http://hdl.handle.net/10481/43294\]](http://hdl.handle.net/10481/43294).
57. REVILLA, A. Tecnología de la leche: procesamiento, manufactura y análisis. Segunda Edición. San José. Costa Rica. [Internet]. 1982. [Citado en agosto 17 del 2018]; p. 56, 57. Citado en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XL2012001316>.
58. Rosa Margesin, Georges Feller. Biotechnological applications of psychrophiles. *Environ Technol*. [Internet]. 2010. [Citado en Julio 23 del 2018]; p. 31(8-9): 835–844. Disponible en: PMID: 20662375.
59. Pérez Davo, A. Microorganismos halófilos en ambientes salinos de Andalucía: estudio taxonómico numérico y molecular. Granada: Universidad de Granada. [Internet]. 2014. [Citado en agosto 2 del 2018]; p. 418. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10481/34130>.
60. Runa Antony, Aritri Sanyal, Neelam Kapse, Prashant K. Dhakephalkar, Meloth Thamban, Shanta Nair, Microbial communities associated with Antarctic snow pack and their biogeochemical implications, *Microbiological Research*, Volume 192. [Internet]. 2016. [Citada en

agosto 26 del 2018]. p. 192-202. Disponible en: ISSN 0944-5013.

61. Elena, B., & Monticelli, L. S Estudio taxonómico y ecológico de las bacterias marinas de la Antártida. Taxonomic and ecological study of the marine bacteria of Antártida. [Internet]. 1998. [Citado en agosto 12 del 2018]; p. 97-106. Disponible en: elena-y-monticelli-142616735019.pdf.
62. Rodríguez M., Díaz C. Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos. [Internet]. 2018. [Citada en agosto 26 del 2018]; Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/27507>.
63. Kamekura M, Hamawata T, Onishi H. Application of halophilic nuclease H from *Micrococcus varians* subs. *halophilus* to commercial pruction of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol*. [Internet]. 1982. [Citado en marzo 23 del 2018]; p. 44: 994-5. Disponible en: ISSN 1517-8382.
64. Carlos A. Biotecnología De Microorganismos Extremofilos. Universidad Católica de Manizales. [Internet]. 2010. [Citado en junio 16 del 2018]; Disponible en: URI: <http://hdl.handle.net/10839/1410>.