

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE
UNA FUENTE TERMAL DEL VOLCÁN CHILES, NARIÑO, COLOMBIA

ARIANA REINA HIDALGO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE
UNA FUENTE TERMAL DEL VOLCÁN CHILES, NARIÑO, COLOMBIA

PRESENTADO POR:

ARIANA REINA HIDALGO

ASESORA:

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO

PhD, Ciencias, Área Microbiología

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo Modalidad
Trabajo de Investigación

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de los autores”.

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Edith Mariela Burbano Rosero, PhD
Asesora de trabajo de grado

Pablo Fernández Izquierdo, PhD
Jurado

Juliana Gil Loaiza, PhD
Jurado

San Juan de Pasto, 3 de septiembre de 2019

Agradecimientos

A la Universidad de Nariño y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones internacionales, por la aceptación de este proyecto en el sistema de investigaciones y la consecución de recursos económicos para la financiación de este estudio.

Al señor Segundo Ortiz, propietario de la fuente termal “Jesús del Río” por encargarse de cuidar y mantener estos ambientes termales.

Al Grupo de Investigación en Biología Matemática y Matemática Aplicada GIBIMMA, liderado por el Doctor Eduardo Iburguen Mondragón PhD, por la colaboración brindada.

A los laboratoristas Maira Quiroz, Alirio Rodríguez y los integrantes del laboratorio de procesos microbianos, por su apoyo colaboración en el desarrollo de este estudio.

A la asesora Edith Mariela Burbano Rosero PhD, por la confianza, acompañamiento, apoyo, motivación y conocimiento compartido. Por ser parte de mi formación como Bióloga.

Dedicatoria

A mis padres Ana Jael Hidalgo y Jorge Ricardo Reina, por enseñarme que los sueños se construyen con voluntad.

Resumen

Las bacterias termófilas son aquellas que crecen y se reproducen en temperaturas superiores a 50°C, característica fisicoquímica considerada extrema para el desarrollo de la vida. El departamento de Nariño, (Colombia) se caracteriza por su geografía diversa y es plataforma de ambientes extremos como las fuentes termales. En la fuente termal “Jesús del Río”, del volcán Chiles al sur de Nariño, en límites con el Ecuador; se realizó aislamiento de 18 formas de crecimiento con características morfológicas y bioquímicas diferenciales. En agar leche semidescremada se determinó que 55% de los aislados bacterianos exhiben actividad proteolítica diferentes concentraciones de sustrato y temperatura, los datos se analizaron a través de una ANOVA multifactorial que generó valores-P menores que 0,05, los factores temperatura, concentración de sustrato y tipo de aislado bacteriano tienen un efecto estadísticamente significativo sobre halo de proteólisis con 95,0% de nivel de confianza. A través de la secuenciación del gen 16S rRNA se determinó que los aislados termófilos proteolíticos pertenecen al género *Bacillus*, y que de estos el 80% corresponden a las especies *Bacillus licheniformis* y el 20% a *Bacillus sp.*, la realización de perfiles genómicos BOX y ERIC -PCR evidenciaron diversidad genética asociada con la variación en el fenotipo. Finalmente, a través de un cultivo semidiscontinuo, se estableció que el aislado bacteriano identificado como *Bacillus licheniformis* CMMMB885 utilizó el sustrato suero lácteo, se observó que la fase de crecimiento exponencial se alcanzó en un tiempo entre 12 y 20 horas y la máxima actividad proteolítica se realizó en un tiempo de 12 horas, tiempo en el cual la actividad proteolítica fue óptima en concentración de sustrato 10% p/v y temperatura 50°C, lo que lo convierte en un microorganismo con potencial uso en los procesos biotecnológicos, ambientales o industriales.

Abstract

Thermophilic bacteria are those who grow and reproduce at temperatures above 50 ° C, a physicochemical characteristic considered extreme for the development of life. Nariño department, (Colombia), place characterized by its diverse geography that makes a platform for extreme environments such as the hot springs. In “*Jesús del Río*” thermal spring, located in the Chiles volcano, in south of Nariño, in the border line with Ecuador. A isolation was made of 18 growth forms with different morphological and biochemical characteristics. In semi-skim milk agar determined that 55% of the isolates exhibits proteolytic activity understood as proteolysis halo in different substrate concentration and temperature, the data were analyzed through a multifactorial ANOVA that generated P-values less than 0.05, these factors substrate concentration, temperature and kind of isolate have a statistically significant effect on halo proteolysis with 95.0% confidence level. Through sequencing of the 16S rRNA gene, it was determined that the thermophilic proteolytic isolates belong to the genus *Bacillus*, that correspond to the species 80% *Bacillus licheniformis* and 20% *Bacillus sp.*, a genomic profiles BOX and ERIC –PCR was realized, wich confirmed genetic diversity associated to the high variation in the phenotype. It was established that the bacterial isolate identified as *Bacillus licheniformis* CCMMB885 used the whey substrate. The maximum proteolytic activity was observed in a time of 12 hours and in which the proteases were optimal in substrate concentration 10% w / v with temperatura of 50 ° C. This makes it a microorganism with potential use in biotechnological, environmental or industrial processes.

Tabla de contenido

1. Introducción a la problemática.....	18
2. Justificación.....	20
3. Marco teórico.....	23
3.1 Microorganismos termófilos.....	23
3.1.1 Generalidades.....	23
3.1.2 Metabolismo y fisiología.....	24
3.2 Adaptaciones a las altas temperaturas.....	25
3.2.1 Estabilidad de la membrana celular.....	25
3.2.2 Estabilidad de los lípidos.....	26
3.2.3 Estabilidad de las proteínas.....	26
3.2.4 Estabilidad del DNA.....	27
3.2.5 Estabilidad del RNA ribosomal.....	28
3.3 Caracterización de microorganismos termófilos.....	29
3.3.1 Taxonomía.....	29
3.3.2 Caracterización fenotípica.....	30
3.3.3 Caracterización molecular.....	31
3.3.4 Variabilidad genética.....	32
3.4 Actividad enzimática.....	34
3.4.1 Enzimas termoestables.....	34
3.4.1.1 Enzimas amilolíticas.....	35
3.4.1.2 Enzimas lipolíticas.....	36
3.4.1.3 Enzimas xilanolíticas.....	36

3.4.1.4 Enzimas celulolíticas.....	36
3.4.2.5 Enzimas proteolíticas.....	37
3.4.2 Aplicaciones de las enzimas proteolíticas.....	39
4. Estado del arte.....	42
5. Objetivos.....	45
5.1 Objetivo general.....	45
5.2 Objetivos específicos.....	45
6. Métodos.....	46
6.1 Aislamiento de bacterias termófilas.....	46
6.1.1 Colecta de muestras.....	46
6.1.2 Procesamiento de muestras.....	46
6.1.3 Conservación de bacterias termófilas.....	47
6.1.4 Determinación de la actividad proteolítica.....	47
6.1.5 Registro y procesamiento de los datos.....	48
6.2 Caracterización de bacterias termófilas proteolíticas.....	49
6.2.1 Caracterización fenotípica.....	49
6.2.2 Caracterización molecular.....	49
6.2.2.1 Extracción de DNA.....	49
6.2.2.2 Amplificación y secuenciación de 16s rRNA.....	51
6.2.2.3 Perfil genómico.....	54
6.3 Actividad proteolítica del mejor aislado respecto al remanente de la industria láctea (suero).....	53
6.3.1 Análisis de suero lácteo.....	53

6.3.2 Curva patrón para la cuantificación de proteínas.....	54
6.3.2.1 Determinación de proteínas en el suero lácteo.....	54
6.3.3 Diseño experimental.....	55
6.3.4 Registro y procesamiento de los datos.....	57
7. Resultados y discusión.....	58
7.1 Aislamiento de bacterias termófilas proteolíticas.....	59
7.2 Caracterización de bacterias termófilas proteolíticas.....	64
7.2.1 Caracterización fenotípica.....	64
7.2.2 Caracterización genotípica.....	68
7.3 Actividad proteolítica del mejor aislado respecto al remanente de la industria láctea (suero).....	77
8. Conclusiones.....	86
9. Recomendaciones.....	87
10. Aportes a la ciencia.....	88
11. Referencias.....	89
12. Anexos.....	97

Lista de tablas

Tabla 1. *Características morfológicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....65*

Tabla 2. *Características bioquímicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....67*

Tabla 3. *Identificación de las muestras por comparación en RPD y GenBank.....71*

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama experimental de la actividad proteolítica.....	48
Figura 2. Diagrama experimental de la determinación de la actividad proteolítica en el remanente de la industria láctea (suero).....	55
Figura 3. Gráfico de medias del análisis de varianza (ANOVA) de la variable dependiente halo de proteólisis (mm) con respecto a 10 niveles del factor tipo de aislado bacteriano.....	59
Figura 4. Fotografías de la actividad proteolítica en agar leche descremada 1% p/v.....	60
Figura 5. Gráfico de interacción concentración-temperatura respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.....	62
Figura 6. Gráfico de interacción tipo de aislado bacteriano-concentración respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.....	62
Figura 7. Gráfico de interacción tipo de aislado bacteriano-temperatura respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.....	63
Figura 8. Fotografías de las colonias de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	65
Figura 9. Dendrograma de las características bioquímicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	68
Figura 10. Extracción de DNA cromosomal de los aislados bacterianos termófilos.....	69
Figura 11. DNA cromosomal de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	69
Figura 12. Amplificación de la subunidad 16S rRNA de los aislados bacterianos termófilos.....	70
Figura 13. Árbol filogenético de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	73

Figura 14. Amplificación BOX-PCR de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	74
Figura 15. Amplificación ERIC-PCR de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	75
Figura 16. Dendrograma de los perfiles genómicos de BOX y ERIC – PCR de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.....	76
Figura 17. Gráfico de la curva de calibración para el ajuste de la concentración del suero lácteo en función de la absorbancia (595 nm)	78
Figura 18. Gráfico de la concentración de proteínas del suero lácteo en función del tiempo.....	78
Figura 19. Cinética de crecimiento bacteriana, absorbancia (nm) en función de tiempo.....	79
Figura 20. Cinética de crecimiento bacteriana, número de células viables en función del tiempo.....	79
Figura 21. Gráfico de interacción temperatura-tiempo respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.....	81
Figura 22. Gráfico de interacción concentración-tiempo respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.....	82
Figura 23. Gráfico de interacción temperatura-concentración respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.....	82

Lista de anexos

A. Medida del halo de proteólisis (mm) de los aislados que presentaron actividad proteolítica en agar leche semidescremada 1% p/v.....	97
B. ANOVA para Halo de proteólisis (mm) por Aislado bacteriano.....	97
C. Medida de halo de proteólisis de 5 aislados bacterianos con respecto a los factores concentración de sustrato y temperatura.....	98
D. Análisis de Varianza para Halo de proteólisis de la actividad proteolítica de 5 aislados bacterianos.....	99
E. Medidas de absorbancia en longitud de onda 595 nm de las concentraciones $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la dilución suero lácteo para realizar la curva de calibración para proteínas.....	100
F. Análisis de varianza de la curva de calibración de proteínas.....	100
G. Medida de halo de proteólisis con respecto a los factores concentración de sustrato, temperatura y tiempo de la actividad proteolítica del aislado LB 302-2 A en suero lácteo.....	101
H. Análisis de varianza de la actividad proteolítica del aislado bacteriano LB 302-2 A en suero lácteo con respecto a los factores concentración de sustrato, temperatura y tiempo.....	102

Abreviaciones

%: porcentaje

°C: grados Celsius

μL: microlitros

16S rRNA: RNA ribosomal 16S

CO₂: dióxido de carbono

DNA: ácido desoxirribonucleico

Fe: hierro

g: gramos

h: horas

H₂: hidrógeno

H₂S: ácido sulfhídrico

L: litros

lb: libras

M: molar

mg: miligramos

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

NaCl: cloruro de sodio

NH₃: amoníaco

nm: nanómetro

p/v: peso/volumen

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pH: unidad de medida pH

rpm: rotaciones por minuto

SO: óxido de azufre

Glosario

Archaea: Microorganismo del tipo de las arqueobacterias.

Biomolécula: Molécula constituyente de los organismos vivos.

Cultivo axénico: Dicho de un cultivo o de un microorganismo: Que se desarrolla en un ambiente donde no hay ningún otro organismo vivo.

Cultivo semidiscontinuo: Modo de cultivo intermitente o no continuo.

Electroforésis: Migración de sustancias por la acción de un campo eléctrico.

Fisicoquímico: Propiedades físicas o químicas.

Péptido: Molécula formada por la unión covalente de dos o más aminoácidos.

Primers: Iniciador o cebador, es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Proteasas: Enzima que fragmenta las proteínas.

Suero lácteo: Fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína

Termoestable: Que no se altera fácilmente por la acción de la temperatura.

Termorresistente: Dicho de un material: Que conserva sus propiedades a altas temperaturas.

Termozimas: Enzima que no se altera fácilmente por la acción de la temperatura.

1. Introducción a la problemática

Los microorganismos son seres diversos que tienen la capacidad de crecer y adaptarse en ambientes variados, algunos de estos requieren condiciones fisicoquímicas extremas para vivir y reproducirse. El crecimiento de los microorganismos según el ambiente en que se encuentren depende de factores físicos o químicos como temperatura, pH, presión, disponibilidad de agua y oxígeno. Con relación a la temperatura óptima de crecimiento los microorganismos se pueden clasificar en psicrófilos (0-10 °C), mesófilos (10-40 °C), termófilos (40-80 °C) e hipertermófilos (>80 °C) (Madigan, Martinko, Bender, Buckley y Stahl, 2015; Raddadi, Cherif, Daffonchio, Neifar y Fava, 2015). Estudiar y caracterizar microorganismos termófilos ha sido de interés porque son fuente de biomoléculas y sus características favorecen la aplicación en los procesos biotecnológicos, industriales, ambientales y en el desarrollo económico (Mohammad, Daghistani, Jaouani, Abdel-Latif y Kennes, 2017; Raddadi *et al.*, 2015).

Entre las biomoléculas de estudio se destaca la producción de enzimas, que pueden ser: amilasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, proteasas y lipasas que catalizan reacciones a elevadas temperaturas y son operativamente estables (El-Gayar, Al Abboud y Essa, 2017; Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento, Peralta y Blamey, 2015). Aunque el interés en bacterias termófilas es debido a su importancia biotecnológica como fuente de enzimas termoestables y productos industriales, también es relevante el aislamiento y caracterización por métodos fenotípicos y genotípicos como la secuenciación del 16S rRNA y los perfiles genómicos que proporcionan identificación, diferenciación taxonómica, relaciones filogenéticas y discriminación de microorganismos que están genéticamente cerca uno del otro (Aanniz *et al.*, 2015; Adiguzel *et al.*, 2009).

De esta forma, se han realizado investigaciones de caracterización fenotípica y genotípica de bacterias termófilas en áreas restringidas, muchas de estas asociadas a fenómenos volcánicos que

incluyen a países como: Turquía, Italia, Bulgaria, Grecia, China, India y Marruecos, contribuyendo al conocimiento de la diversidad de microorganismos, obtención de nuevos biocatalizadores y mejoramiento de los mismos para procesos biotecnológicos o industriales (El-Gayar *et al.*, 2017). Desde esta perspectiva, en países como Ecuador se reporta el aislamiento e identificación de bacterias, hongos y algas en fuentes termales de origen volcánico mediante técnicas microbiológicas y moleculares (Molina y David, 2017; Rivas, 2017). En Colombia, en fuentes termo-minerales de Boyacá se han realizado estudios de aislamiento, caracterización genotípica, fenotípica, cinética y enzimática de bacterias termófilas (Posada *et al.*, 2004; Rubiano, 2006; Gómez, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible considerar la pertinencia de esta investigación en nuestra región, caracterizada por su geografía diversa y ambientes de vida extremos como las fuentes termales del volcán Chiles, donde las aguas han sido clasificadas como débilmente ácidas, con alto contenido de sulfatos y calcio y temperatura promedio de 42 °C, características que generan un hábitat propicio para el desarrollo de microorganismos con capacidades metabólicas diferenciales (Cabrera y Díaz, 2003). Aunque en el departamento de Nariño, en el volcán Chiles, Cabrera y Díaz (2003) realizaron un estudio de caracterización parcial de bacterias termófilas amilolíticas basado en métodos fenotípicos y bioquímicos, en nuestra región no se reportan estudios de microorganismos proteolíticos desde el enfoque molecular y su respectiva actividad enzimática.

Con base en estos argumentos se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las bacterias termófilas con actividad proteolítica aisladas de una fuente termal del Volcán Chiles, Nariño-Colombia?

2. Justificación

Los organismos adaptados a ambientes extremos son de interés científico, ya que se pueden encontrar nuevos taxones que contribuyen al conocimiento filogenético de los seres vivos, enriquecen los debates relativos al origen y a los límites de la vida; adicionalmente el estudio de sus biomoléculas cobra importancia puesto que suelen ser resistentes a las condiciones específicas de su entorno, esto lleva a implementar estudios para comprender los mecanismos íntimos de resistencia y futuras perspectivas en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, ambientales o industriales (Mohammad *et al.*, 2017; Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). El uso de datos de secuencias de DNA permite un acercamiento en la taxonomía y refleja las relaciones filogenéticas de los organismos, es así, que técnicas de biología molecular como la amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (rep-PCR) y la secuenciación 16S rRNA suministran información para la identificación de microorganismos a nivel de especie y subespecie (Adiguzel *et al.*, 2009; Aanniz *et al.*, 2015). Aunque la secuenciación del gen 16S rRNA proporciona información relevante sobre los microorganismos, no siempre es útil para distinguir especies estrechamente relacionadas; para esto, existen técnicas que permiten evaluar la diversidad de genes que conforman una población, como los perfiles genómicos basados en varios conjuntos de *primers* dirigidos a elementos repetitivos conservados de DNA, como: REP, ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), BOX (*Enterobacterial Repetitive Consensus*) y (GTG)⁵, los cuales permiten evaluar polimorfismos entre los microorganismos (Adiguzel *et al.*, 2009; Aanniz *et al.*, 2015).

Por otra parte, las enzimas de microorganismos termófilos funcionan como catalizadores robustos, estables y con alta especificidad, siendo necesarios en el rendimiento de procesos; además ofrecen ventajas de resistencia a pH alto, a diversos agentes químicos, protección de

desnaturalización, vida media más prolongada, reducción en la necesidad de refrigeración y mínimo impacto ambiental (Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). Las enzimas termoestables como amilasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, manasas, pululanasas, proteasas y lipasas tienen aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la agricultura, la producción de alimentos, el refinamiento de biomasa, el *biocomposting* de textiles, la elaboración de cerveza, vino, entre otras. En cuanto a las aplicaciones industriales, muchas de estas termozimas tienen funciones específicas como la obtención, bioconversión o degradación de sustratos. (Mehta, Singhal, Singh, Damle y Sharma, 2016; Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015).

En cuanto a las enzimas proteolíticas, catalizan la hidrólisis del enlace peptídico en las proteínas y se ha reportado que aquellas que provienen de microorganismos termófilos confieren termo-estabilidad en los procesos biotecnológicos e industrialmente se utilizan en la síntesis de péptidos, preparación del cuero y en la fabricación de detergentes como las proteasas alcalinas (Banerjee y Ray, 2017; Da Silva, 2017; Mehta *et al.*, 2016); de igual manera son útiles en la industria textil, farmacéutica, alimentaria y biorremediación (degradación de residuos de cerveza) (Banerjee y Ray, 2017; Da Silva, 2017). Entre las bacterias productoras de proteasas termoestables están las pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Staphylothermus* (Haki y Rakshit, 2003; Sahay *et al.*, 2017). Se ha encontrado que microorganismos como *Bacillus stearothermophilus* producen una proteasa alcalina y termoestable óptimamente activa a 85 °C (Haki y Rakshit, 2003) y otras bacterias como *Brevibacterium linens* y *Bacillus subtilis* tienen la máxima producción de proteasa a 50 °C teniendo en cuenta el efecto de la temperatura, sustrato, concentración y algunos iones metálicos (Mohammad *et al.*, 2017).

Debido, a la importancia y aplicación de enzimas proteolíticas es conveniente estudiar otras fuentes de obtención de biocatalizadores en bacterias termófilas, considerando el reporte de la presencia de estos microorganismos con actividad enzimática en manantiales termales del volcán Chiles (Nariño), estudio realizado por Cabrera y Díaz (2003). Adicional a esto, las enzimas producidas por bacterias termófilas son de utilidad en los procesos biotecnológicos o industriales y pueden aplicarse en la resolución de problemas locales como la transformación de residuos provenientes de la industria láctea, los cuales alteran las propiedades físicas y químicas del ambiente (Dullius, Goettert y de Souza, 2018; Vargas y Martínez, 2017). Además, conociendo que la economía basada en lácteos en nuestro departamento representa 6,03 % de la producción del país (Muñoz, 2015), la actividad proteolítica de bacterias termófilas podría emplearse como una alternativa eficiente en la transformación de estos residuos. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se pretende caracterizar por métodos fenotípicos y moleculares bacterias termófilas aisladas de una fuente termal del volcán Chiles, Nariño (Colombia) determinando la actividad proteolítica con posible aplicación biotecnológica, ambiental o industrial.

3. Marco teórico

Los microorganismos son seres diversos que tienen la capacidad de adaptarse a condiciones variadas, muchos de estos prosperan en ambientes hostiles donde otros organismos no pueden sobrevivir, estos microorganismos son considerados extremófilos (Aanniz *et al.*, 2015; Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). Los extremófilos son capaces de vivir y reproducirse en ambientes que presentan particularidades como temperaturas muy altas que pueden superar 100 °C (termófilos) o muy bajas, inferiores a 0 °C (psicrófilos), presiones altas (barófilos), diferentes concentraciones salinas (halófilos), pH variado (acidófilos o alcalófilos), crecen en presencia de metales pesados (metalófilos) y soportan varios niveles de radiación y desecación (radiófilos), entre otros (Aanniz *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). En la actualidad el estudio de microorganismos extremófilos es importante debido a que son capaces de producir moléculas estables con características potencialmente útiles en el sector ambiental, biotecnológico e industrial (Banerjee y Ray, 2017; Raddadi *et al.*, 2015).

3.1 Microorganismos termófilos

3.1.1 Generalidades

Los microorganismos que poseen temperatura óptima de crecimiento en un rango entre 45 y 80 °C son considerados termófilos y aquellos donde la temperatura sobrepasa 80 °C se consideran hipertermófilos. Estos microorganismos suelen desarrollarse en ambientes como suelos calentados por el sol que pueden llegar hasta 50 °C, agua hirviendo, calentadores de agua domésticos o industriales, plantas de energía eléctrica y otras fuentes térmicas artificiales. Los ambientes más comunes son las fuentes de agua termal donde se alberga gran diversidad de microorganismos que se adaptan a las condiciones fisicoquímicas del medio como variación de

pH y composición química. Las aguas termales generalmente se asocian con fenómenos volcánicos y se pueden encontrar en todo el mundo, pero son especialmente abundantes en el oeste de los Estados Unidos, Nueva Zelanda, Islandia, Japón, Italia, Indonesia, América y África Central (Madigan *et al.*, 2015; Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015).

Los manantiales termales en Colombia son hábitats propicios para el desarrollo de microorganismos extremófilos por sus condiciones fisicoquímicas y porque su temperatura suele estar por encima de 40 °C, además la descarga de agua natural en ocasiones se acompaña por emisión de gases, principalmente, gas carbónico (CO₂) y sulfuro de hidrógeno (H₂S). En el departamento de Nariño, en el municipio de Cumbal, se reporta la fuente termal “Baños Chiles”, asociada al volcán Chiles, la cual tiene una temperatura promedio entre 40 y 42 °C, pH in situ de 6,22 y conductividad eléctrica in situ de 1,117 uS/cm reportado por el Servicio Geológico Colombiano (SGC, 2017). La fuente termal Baños Chiles también ha sido descrita por su composición química, sus aguas se han clasificado como débilmente ácidas y con alto contenido de sulfatos y calcio (Cabrera y Díaz, 2003).

3.1.2 Metabolismo y fisiología

Los microorganismos al igual que otros seres vivos toman los nutrientes necesarios del medio para crecer y reproducirse. Los microorganismos termófilos poseen tasas de crecimiento muy rápidas, se ha evidenciado que algunas bacterias necesitan hasta una hora para su replicación; esto se relaciona con las diferentes estrategias metabólicas que emplean y a la diversidad de hábitats que ocupan, además de factores a su favor, como presencia o no de luz, cantidad de compuestos orgánicos (organótrofos) o sustancias sencillas inorgánicas (H₂S, SO, NH₃, NO₂⁻, Fe, H₂) y que algunos microorganismos tienen la capacidad de fabricar los componentes celulares a partir de CO₂ (autótrofos) o a partir de carbono orgánico (heterótrofos) que son fuente

de energía, además pueden ser organismos aerobios y anaerobios, debido a que el aumento de temperatura reduce solubilidad de oxígeno en el agua (Aanniz *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2015; Ranawat y Rawat, 2017).

Por otra parte, los microorganismos se enfrentan a condiciones desfavorables que producen estrés considerado como una respuesta fisiológica a las distintas presiones del ambiente, es el caso de la radiación y estrés oxidativo donde moléculas celulares como ácidos nucleicos y proteínas suelen tener daño irreversible, aunque también algunos factores como los cambios bruscos de temperatura y pH o el denominado estrés osmótico inciden directamente en el crecimiento (Ranawat y Rawat, 2017). Por otra parte, la hidrólisis de sustancias nutritivas genera compuestos más sencillos produciendo energía libre que se almacena en forma de ATP, molécula que es degradada casi instantáneamente a 150 °C y por encima de esta temperatura los microorganismos tienen que soportar la labilidad de la molécula. Las formas de vida que crecen a temperaturas superiores a 150 °C utilizan mecanismos de protección como el uso de nuevas moléculas o el desarrollo de flujos de mecanismos que mantengan al ATP de tal forma que exista ahorro energético (Madigan *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). De acuerdo con esto, las respuestas a los factores ambientales varían de un organismo a otro, manteniendo los flujos metabólicos y los mecanismos celulares para permitir la funcionalidad del microorganismo (Ranawat y Rawat, 2017).

3.2 Adaptaciones a las altas temperaturas

3.2.1 Estabilidad de la membrana celular

Las elevadas temperaturas pueden separar la bicapa lipídica que compone la membrana celular, las bacterias termófilas han desarrollado adaptaciones como la construcción de cadenas

largas con alto contenido de ácidos grasos saturados que forman enlaces hidrofóbicos más fuertes, esto permite que tengan puntos de fusión más elevados que los ácidos grasos de cadena corta, posibilitando la estabilidad de la membrana (Daniel y Cowan, 2000; Mehta *et al.*, 2016).

Los hipertermófilos por su parte, donde la mayoría pertenecen a Arquea, no contienen ácidos grasos en sus membranas, en su lugar tienen hidrocarburos de cadenas largas de carbono (C40) conformadas por unidades de isopreno unidos por enlaces de éter a glicerol fosfato.

Adicionalmente, la estructura de las membranas citoplásmicas de hipertermófilos forma una monocapa lipídica en lugar de una bicapa lipídica, esta conformación permite la unión covalente de un lado de la membrana con el otro y esto evita que la membrana se disuelva en las altas temperaturas donde crecen (Chong, Ayesa, Prakash y Hur, 2012; Daniel y Cowan, 2000; Mehta *et al.*, 2016).

3.2.2 Estabilidad de los lípidos

Los lípidos son moléculas que conforman la membrana celular, en bacterias es importante la conformación por ácidos grasos saturados, mientras que en Arquea se sintetizan lípidos de tipo dietiléter o tetraéter, que son naturalmente resistentes al calor, las unidades de fitano se unen entre sí para conformar cada mitad de la estructura de la membrana formando una monocapa de lípidos en lugar de la bicapa lipídica construida por ácidos grasos permitiendo estabilidad química en las altas temperaturas (Chong *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2016).

3.2.3 Estabilidad de las proteínas

La temperatura es considerada un factor desnaturalizante de la mayoría de las proteínas, no obstante, en microorganismos termófilos existe termo estabilidad en estas macromoléculas, característica asociada con el plegamiento de la molécula en sí misma por un ligero aumento en

los niveles de aminoácidos que promueven la formación de estructuras secundarias alfa-helicoidales (Mehta *et al.*, 2016). Además, en su estructura se incluyen núcleos altamente hidrofóbicos que disminuyen la tendencia de la proteína a desenrollarse en un entorno iónico y a la presencia de más interacciones iónicas no covalentes en las superficies que mantiene unida la proteína, evitando su desplegamiento y conservándola biológicamente activa (Daniel y Cowan, 2000; Sarmiento *et al.*, 2015).

De igual forma, existe un tipo de proteínas denominadas chaperoninas de choque térmico que ayudan a las proteínas a mantener su estado original o a replegar las que se encuentran parcialmente desnaturalizadas. Se ha encontrado algunas chaperoninas especiales en *Archaeas* hipertermófilas que funcionan a temperaturas elevadas. En *Pyrodictium abyssi*, por ejemplo, una chaperonina principal es un complejo de proteínas llamado termosoma que mantiene a otras proteínas correctamente plegadas y funcionales a temperatura incluso superior a 110 °C, su temperatura máxima de crecimiento. Debido a la actividad de las chaperoninas el límite superior de temperatura en el que pueden sobrevivir muchos hipertermófilos es más alto que la temperatura superior a la que pueden crecer (Daniel y Cowan, 2000; Madigan *et al.*, 2015).

3.2.4 Estabilidad del DNA

La estabilidad en la molécula de DNA es debida a la contribución de varios mecanismos; principalmente, el aumento de los niveles celulares de soluto, en particular potasio (K⁺) o compuestos orgánicos compatibles como como el d-myo-inositol fosfato de potasio, que protege contra el estrés osmótico y las poliaminas putrescina y espermidina que estabilizan los ribosomas y ácidos nucleicos a alta temperatura y ayudan a mantener las macromoléculas celulares de hipertermófilos en su forma activa. En el citoplasma del hipertermófilo *Methanopyrus* se ha encontrado cantidad de soluto 2,3-difosfoglicerato cíclico de potasio que evita el daño químico

del DNA, como la depurinación o la depirimidación (pérdida de una base de nucleótidos mediante la hidrólisis del enlace glucosídico), eventos que pueden causar mutación al estar expuesto a las altas temperaturas (Boteva y Kambourova, 2018; Daniel y Cowan, 2000; Madigan *et al.*, 2015).

Además, se ha reportado que los hipertermófilos producen una enzima DNA topoisomerasa especial denominada DNA girasa inversa. Esta enzima causa superenrollamientos positivos en el DNA de estos microorganismos (en contraste con los superenrollamientos negativos causados por DNA girasa presente en procariotas). La DNA girasa inversa estabiliza la molécula de DNA en presencia de calor y evita que la hélice del DNA se desenrolle espontáneamente. En arqueas, como el hipertermófilo metanógeno *Methanothermus fervidus* se ha encontrado moléculas como las histonas, proteínas que enrollan y compactan el DNA en estructuras similares a los nucleosomas y mantienen el DNA en una forma bicatenaria a temperaturas elevadas (Boteva y Kambourova, 2018; Daniel y Cowan, 2000; Madigan *et al.*, 2015).

3.2.5 Estabilidad del RNA ribosomal

La importancia de las adaptaciones moleculares a la vida a altas temperaturas es la composición de los RNA ribosómicos. Los RNA ribosomales son componentes estructurales y funcionales clave del ribosoma, que se encargan de sintetizar proteínas en la célula. Los microorganismos adaptados a las altas temperaturas tanto de Bacteria como Archaea poseen una proporción hasta 15% mayor en pares de bases guanina-citosina (G-C) en su RNA ribosomal en comparación con organismos que crecen a temperaturas más bajas. Los pares de bases G-C forman tres enlaces de hidrógeno en comparación con los dos pares de bases adenina-uracilo (A-U) y, por lo tanto, el mayor contenido de G-C de los ARN ribosómicos confiere mayor estabilidad térmica a los ribosomas de estos organismos que intervienen en la síntesis de

proteínas a altas temperaturas (Boteva y Kambourova, 2018; Daniel y Cowan, 2000; Mehta *et al.*, 2016).

3.3 Caracterización de microorganismos termófilos

3.3.1 Taxonomía

Se conoce por taxonomía la ciencia que caracteriza, nombra y clasifica organismos teniendo en cuenta criterios definidos. Actualmente en bacterias, la taxonomía adopta la combinación de métodos fenotípicos, genotípicos y filogenéticos para la identificación y descripción. En el análisis fenotípico se tiene en cuenta la morfología, características metabólicas, fisiológicas y químicas de las bacterias, mientras que el análisis genotípico considera las características del genoma y estos dos tipos de análisis permiten categorizar organismos basados en similitudes. Complementario a esto, los análisis filogenéticos, relacionan organismos dentro de un marco evolutivo usando datos de secuencias moleculares (Aanniz *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2015).

En bacterias hipertermófilas, actualmente se distinguen los filos Thermotogae, Thermodesulfobacteria y Aquificae que se agrupan en el árbol filogenético, cada grupo consta de uno o dos géneros principales y comparten una característica fisiológica clave en el crecimiento de la mayoría de las especies que es la temperatura óptima superior a 80 °C. En estos filos se distinguen los géneros *Thermotoga*, *Thermodesulfobacterium*, *Aquifex*, *Thermocrinis* y *Thermus* (Madigan *et al.*, 2015).

También estudios de bacterias termófilas basados en datos de secuenciación de 16S rRNA, incluyen a los géneros *Bacillus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Staphylothermus*. Teniendo en cuenta dichos estudios se ha reportado suficiente evidencia que apoya la reclasificación de miembros termófilos del género *Bacillus* como *Amphibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*,

Aneurinibacillus, Anoxybacillus, Brevibacillus, Halobacillus, Virgibacillus, Gracilibacillus, Sulfobacillus y *Salibacillus, Anoxybacillus, Coprobacillus, Thermobacillus, Thiobacillus, Filobacillus, Geobacillus, Ureibacillus, Jeotgalibacillus, Sulfobacillus* y *Marinibacillus* y otros géneros que incluyen bacterias termófilas como *Brevundimonas, Burkholderia, Planococcus, Pseudomonas, Rhodanobacter, Thermoactinomyces* y *Thermonema* (Adiguzel *et al.*, 2009; Sahay *et al.*, 2017).

3.3.2 Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de un microorganismo está relacionada con aspectos como su morfología, condiciones fisiológicas y técnicas de análisis bioquímico (perfil de ácidos grasos, determinación de productos finales del metabolismo). Los organismos procariotas capaces de crecer en altas temperaturas se han logrado aislar fácilmente en medios complejos incubados a la temperatura del hábitat de donde se originó la muestra, este método permite obtener información de las características macroscópicas de los microorganismos evaluando morfología de colonias con relación a su coloración, tamaño, borde y textura que permite un acercamiento a su identificación; sin embargo, no en todos los medios de cultivo crecen el total de microorganismos, otros prefieren medios más selectivos o enriquecidos, además se requieren aislamientos por la agrupación de colonias, que en muchos casos dificultan la tarea de identificación (Campbell, 2005; Madigan *et al.*, 2015).

La fisiología y actividad metabólica es un método clave que puede dar a conocer el tamaño de la población a observar y permite calcular la tasa de recambio o tiempo de generación de microorganismos, así como también la tasa de consumo de varios sustratos, usada para determinar la actividad de enzimas particulares, aunque este método usualmente no proporciona

información acerca de la distribución en el medio, ni tampoco facilita su identificación (Campbell, 2005; Madigan *et al.*, 2015).

Cada método requiere largos procesos y cantidad de material de estudio para obtener resultados confiables además de incluir el análisis estadístico que permite estimar y analizar la cantidad de datos. Al combinar uno o más métodos se puede obtener información útil y valiosa, lógicamente considerando las limitaciones del medio para caracterizar los microorganismos aislados de distintos ambientes, en este caso, asociados a fuentes termales (Campbell, 2005; Madigan *et al.*, 2015).

3.3.3 Caracterización molecular

Actualmente las técnicas moleculares son clave para la caracterización de especies bacterianas y para esto se debe tener en cuenta el concepto de especie filogenética, donde la especie microbiana es un grupo de cepas que comparten ciertos rasgos de diagnóstico, que son genéticamente similares y comparten un ancestro común. El uso de datos de secuencias de DNA está permitiendo cada vez más un acercamiento en la taxonomía y en el establecimiento de las relaciones filogenéticas (Madigan *et al.*, 2015).

En el análisis de secuencias de DNA se considera el estudio de algunos genes universales, como los genes ribosomales que están presentes en todos los organismos vivos y se compone de dominios altamente conservados y variables, como la subunidad 16S rRNA que se puede secuenciar y se utiliza para evaluar la taxonomía bacteriana. El gen 16S rRNA posee una longitud aproximadamente de 1550 pares de bases (pb) y contiene regiones variables y conservadas con secuencias características de oligonucleótidos (exclusivas de grupo filogenético particular) que se pueden detectar usando *primers* de las regiones conservadas aunque también

puede amplificarse la región variable intermedia, así se pueden diferenciar organismos utilizando mediciones estadísticamente válidas (Aanniz *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2015; Palladino, Spencer, Cummings y Klug, 2015; Patwardhan, Ray y Roy, 2014).

3.3.4 Variabilidad genética

Teniendo en cuenta que la población se puede definir como un grupo de individuos pertenecientes a la misma especie que viven en un área geográfica definida y que pueden reproducirse entre sí, se puede atribuir que la información genética que tienen los miembros de esa población lo constituye el conjunto de genes. Muchas veces se observa que algunas poblaciones tienen similitudes fenotípicas entre individuos, pero existe diferenciación que conlleva a la diversidad genética y que se puede evaluar por distintos métodos, uno de estos por selección artificial, que puede observarse cuando la variación genética está presente y el fenotipo cambia a lo largo de unas pocas generaciones (Palladino *et al.*, 2015).

Otra forma de evaluar la variabilidad genética es a través de comparación de secuencias de nucleótidos de los genes soportados por los individuos de la población, muchas veces se puede hacer a nivel de proteína donde las secuencias de aminoácidos pueden variar por la cantidad de nucleótidos presentes. Las causas de variación en las secuencias de nucleótidos pueden ser distintas, como las mutaciones sin sentido, las deleciones de aminoácidos, los desplazamientos del marco de lectura y los defectos de empalme de nucleótidos, que en ocasiones alteran la estructura y función de la proteína, aunque otras veces suelen ser cambios silenciosos que no cambian la secuencia de aminoácidos y no afectan la función de la proteína. Varios estudios en diferentes organismos sugieren que existe un enorme reservorio de variabilidad genética en la mayoría de las poblaciones, que se da a nivel de DNA y que los genes exhiben esta diversidad de individuo a individuo (Palladino *et al.*, 2015).

Los análisis de secuencia génica se pueden determinar comúnmente de fragmentos amplificados por PCR de DNA y realizando análisis filogenéticos. También se puede analizar secuencias del gen rRNA ribosomal que están altamente conservadas y proporcionan información filogenética valiosa, aunque no siempre son útiles para distinguir especies estrechamente relacionadas. Un método eficiente para evaluar polimorfismo entre cepas es realizar perfiles genómicos. Estos generalmente son fragmentos de DNA obtenidos a partir de genes individuales o genomas. La secuencia génica a menudo se habilita mediante amplificación por PCR de fragmentos de genes secuenciados de rRNA, pero una variedad de genes diferentes puede ser de utilidad en la clasificación de especies (Madigan *et al.*, 2015; Palladino *et al.*, 2015).

Entre los métodos para realizar perfiles genómicos se incluyen PCR palindrómica extragénica repetitiva (rep-PCR) y polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP). El rep-PCR método se basa en la presencia de repeticiones altamente conservadas de elementos de DNA intercalados al azar alrededor del cromosoma bacteriano. El número y las posiciones de estos elementos difieren entre las cepas de una especie. Se usan *primers* de secuencias de oligonucleótidos diseñados para ser complementario a estos elementos que permiten la amplificación por PCR de fragmentos genómicos encontrados entre elementos repetidos, entre estos *primers* se encuentran BOX (DNA altamente repetitivo, que se basa en el elemento BOXA1 y diferencia el tamaño molecular de fragmento) y ERIC (DNA altamente repetitivo, amplifica regiones intergénicas conservadas) y el producto de PCR se pueden visualizar usando electroforesis en gel para revelar un patrón de bandas que se pueden usar como un perfil genómico. La técnica de AFLP por su parte se basa en la digestión de ADN genómico con una o dos enzimas de restricción y selecciona la amplificación por PCR de los fragmentos resultantes,

que luego se separan por electroforesis en gel de agarosa (Madigan *et al.*, 2015; Palladino *et al.*, 2015).

3.4 Actividad enzimática

3.4.1 Enzimas termoestables

Las enzimas son proteínas (o en algunos casos, ARN) altamente específicos para las reacciones que catalizan e intervienen en la velocidad de las reacciones biológicas. Las enzimas provenientes de organismos termófilos al igual que las proteínas son mucho más estables al calor que las de los mesófilos y funcionan óptimamente a altas temperaturas, adicional a esto las termoenzimas incluyen beneficios como menor riesgo de contaminación, menor viscosidad y mayor solubilidad de los sustratos (Raddadi *et al.*, 2015). Se ha reportado que las enzimas termoestables difieren poco en la secuencia de aminoácidos en comparación con enzima de mesófilos que son sensibles al calor; al parecer se trata de algunos aminoácidos que sustituyen unos pocos lugares de la enzima que permiten su plegamiento y le confiere estabilidad al calor (De Castro *et al.*, 2016; Madigan *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015).

La obtención y purificación de biocatalizadores en microorganismos termófilos a través del tiempo ha sido de utilidad por su termoestabilidad, estructura y función (Sahay *et al.*, 2017). Un ejemplo de enzima termoresistente y de importancia aplicada es la DNA polimerasa aislada del termófilo *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa), que se usa en procesos de automatización de los pasos repetitivos que tienen lugar en la reacción en cadena de la polimerasa PCR, técnica muy útil para la amplificación de secuencias de DNA (Madigan *et al.*, 2015). Las enzimas termoreestables como amilasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, manasas, pululanasa, proteasas y lipasas, se usan para aplicaciones biotecnológicas o industriales, muchas de estas con funciones

específicas como bioconversión o degradación de sustratos, entre otras (Aanniz *et al.*, 2015; Dumorné, Córdova, Astorga-Eló y Renganathan, 2017; Sahay *et al.*, 2017).

Entre las aplicaciones biotecnológicas actuales se destacan procesos como la bioconversión de lignocelulosa en hidrógeno por bacterias como *Clostridium thermocellum* y *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, el hidrógeno se puede utilizar como fuente de energía; así como también la conversión de celulosa o monómeros de xilosa, arabinosa, manosa y galactosa para la producción de etanol, de utilidad en fábricas de papel y residuos de la industria cervecera. También, procesos de descontaminación ambiental como la biodegradación de hidrocarburos de petróleo y contaminantes refinados, recuperación de suelos de metales pesados, remediación de tintes textiles por eliminación de colorantes, sacarificación de residuos agrícolas entre otras (Mehta *et al.*, 2016).

3.4.1.1 Enzimas amilolíticas

Las enzimas amilolíticas son aquellas que hidrolizan el almidón, uno de los polisacáridos más abundantes, formado por amilosa, una cadena de glucosas y amilopectinas unidas mediante enlaces glucosídicos (α 1-4) y amilopeptídicos (α 1-4 y β 1-6), que sirven como reserva de carbono y energía. Este polímero requiere de una combinación de enzimas para su hidrólisis como son α -amilasas, glucoamilasas o β -amilasas e isoamilasas o pululanasa (Sen *et al.*, 2014; Vieille y Zeikus, 2001). Las enzimas amilolíticas se pueden clasificar como endoactivas si hidrolizan los enlaces de forma aleatoria y conduce a la formación de oligosacáridos lineales y ramificados y enzimas exoactivas si atacan al sustrato desde el extremo no reductor, produciendo oligosacáridos o monosacáridos. Las enzimas amilolíticas termoestables presentes en muchas bacterias mejoran los procesos de bioconversión del almidón industrial, se usan en procesos de

licuefacción de almidón en industrias cerveceras y azucareras, además de procesos de sacarificación o isomerización (Haki y Rakshit, 2003; Sen *et al.*, 2014).

3.4.1.2 Enzimas lipolíticas

Por su parte, las enzimas lipolíticas, pueden ser estererasas o lipasas y se encuentran ampliamente distribuidas en los microorganismos, plantas y animales. Su función es catalizar la hidrólisis, síntesis o transesterificación de enlaces éster; así hidrolizan la grasa, realizan esterificación, interesterificación, transesterificación y biosíntesis de materia orgánica. Actualmente, las enzimas lipolíticas representan aproximadamente 20% de las enzimas comercializadas en procesos industriales, las enzimas lipolíticas termoestables se aplican en industrias tales como la producción de polímeros biodegradables, detergentes, aromatizantes de alimentos, biodegradación de aceites o desechos, entre otros (De Castro *et al.*, 2016; Dumorné *et al.*, 2017; Haki y Rakshit, 2003).

3.4.1.3 Enzimas xilanolíticas

Las enzimas xilanasas, se encargan de la hidrólisis del xilano, un componente de las hemicelulosas, sustancias orgánicas muy abundantes. Se ha reportado que microorganismos como: *Thermus thermophilus*, *Thermus Aquaticus*, *Thermotoga maritima* y *Thermotoga neapolitana* producen xilosa isomerasa, enzima que tiene actividad óptima en temperaturas entre 90 y 100 °C además posee de alta eficiencia catalítica. (Sahay *et al.*, 2017; Vieille y Zeikus, 2001). Industrialmente, las xilanasas se utilizan en la obtención de papel, proceso que requiere actividad enzimática que exhiba alta termoestabilidad y función en un amplio rango de pH (Dumorné *et al.*, 2017; Haki y Rakshit, 2003).

3.4.1.4 Enzimas celulolíticas

La celulosa es un compuesto que se forma por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos (β 1-4), funciona como materia orgánica, combustible y se obtienen productos químicos. Las enzimas requeridas para la hidrólisis de celulosa incluyen endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Las enzimas β -glucosidasas provienen de ambientes termófilos y han llamado la atención en la industria farmacéutica por su capacidad de hidrolizar celobiosa a glucosa. Adicionalmente, se usan celulasas en procesos industriales por su actividad en temperatura y pH alto. Las enzimas celulolíticas se emplean en las extracciones de color de los jugos, en detergentes que causan un aclarado y suavizado del color, en el *biocomposting* de jeans, en el pretratamiento de biomasa que contiene celulosa para mejorar la calidad nutricional de forraje y en el pretratamiento de desechos industriales, biotecnológicamente están relacionadas con los alimentos, la elaboración de cerveza y el vino, la agricultura, el refinamiento de biomasa, los textiles, la pulpa y el papel (Dumorné *et al.*, 2017; Haki y Rakshit, 2003; Sahay *et al.*, 2017).

3.4.1.5 Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas son aquellas que se encargan de hidrolizar el enlace peptídico de las proteínas, pueden recibir el nombre de peptidasas, proteasas o proteinasas (Da Silva, 2017; Haki y Rakshit, 2003; Mótyán, Tóth y Tózsér, 2013). Las proteasas desempeñan función fisiológica en todos los organismos vivos, por ejemplo, están presentes en la digestión de proteínas alimentarias, recambio proteico, división celular, cascada de coagulación de la sangre, transducción de señales, procesamiento de hormonas polipeptídicas, apoptosis y el ciclo de replicación de retrovirus. Las enzimas proteolíticas tienen función clave en el ciclo de vida de muchos hospederos y patógenos, debido a esto han adquirido importancia médica y farmacéutica (Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). Las fuentes de obtención de enzimas proteolíticas

son diversas, puede ser a partir de microorganismos (bacterias, hongos, algas), plantas o animales (Da Silva, 2017; Mótyán *et al.*, 2013; Sarmiento *et al.*, 2015).

Según el sitio de acción enzimática, las proteasas se pueden subdividir en exopeptidasas que separan aminoácidos en los extremos de la cadena de la proteína (enlace peptídico cerca de los extremos nitrógeno o carbono terminales del sustrato) y endopeptidasas que rompen los enlaces peptídicos en medio y distantes de los extremos de una cadena polipeptídica (Haki y Rakshit, 2003; Mótyán *et al.*, 2013; Raddadi *et al.*, 2015). También se pueden clasificar en familias en función de similitudes de secuencia y estructura (Mótyán *et al.*, 2013) y de acuerdo con el mecanismo catalítico y la presencia de residuos de aminoácidos en el sitio activo, las proteasas se pueden agrupar como proteasas aspárticas, cisteína proteasas, proteasas glutámicas, metaloproteasas, asparagina proteasas, serina proteasas, treonina proteasas y proteasas con mezcla o mecanismo catalítico desconocido (Da Silva, 2017; De Castro *et al.*, 2016; Gomri *et al.*, 2018; Mótyán *et al.*, 2013).

El grupo más abundante de peptidasas termoresistentes lo conforman las serinas peptidasas, las cuales se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo (histidina, serina y asparagina), que es crucial para su desempeño catalítico, estas enzimas pueden actuar como endopeptidasa y exopeptidasa, en este grupo se pueden incluir las peptidasas glutámicas debido a su triada catalítica conformada por serina, ácido glutámico y ácido aspártico; en cuanto a sus aplicaciones, las serinas peptidasas alcalinas son necesarias en el tratamiento del cuero, la mejora del sabor del queso y la industria de los detergentes. Por su parte, las peptidasas aspárticas son endopeptidasas ácidas que tienen actividad óptima a pH entre 3 y 6, se caracterizan porque su acción catalítica tiene dos residuos de ácido aspártico y se requiere en procesos industriales como la hidrólisis de caseína o síntesis de péptidos. La treonina peptidasa

incluye un residuo de treonina en el sitio activo necesario para su maquinaria catalítica, se ha encontrado en el proteosoma de bacterias y arqueas. Las cisteínas peptidasas pueden ser endopeptidasas y exopeptidasas, la acción catalítica depende de un residuo de cisteína en el sitio activo y su actividad máxima se realiza a un pH entre 4,5 y 7. Otro grupo de peptidasas son las metalopeptidasas que son endopeptidasas y exopeptidasas que en su desempeño catalítico depende de iones, generalmente zinc, aunque incluye otros iones metálicos, como cobalto, manganeso, níquel, cobre y hierro (Da Silva, 2017; Sarmiento *et al*, 2015).

Adicional a esto, se ha reportado otro grupo de enzimas proteolíticas, denominadas liasas peptídicas de asparagina. La catálisis de estas enzimas depende de un residuo de asparagina y los enlaces peptídicos se escinden por acción de la amidina liasa y se han encontrado homólogos de estas enzimas en virus, arqueas, bacterias y hongos. Las liasas peptídicas de asparagina se han identificado en proteínas auto transportadoras (precursoras de la proteína Tsh de *E. coli*), proteínas de la cubierta viral, entre otras. Todas estas liasas peptídicas de asparagina realizan auto escisiones, la escisión que se produce es en el lado carbono-terminal con el residuo de asparagina del sitio activo (Da Silva, 2017). Por último, el estudio de las proteasas termoestables tiene importancia porque ofrecen ventajas como compatibilidad con procesos que funcionan de manera más óptima a temperaturas más altas en los cuales pueden reducir la viscosidad o tener altas eficiencias catalíticas además de evitar la contaminación microbiana mesófila y alta afinidad de sustrato, lo que les permite tener diversidad de aplicación (Da Silva, 2017; Gomri *et al.*, 2018)

3.4.2 Aplicaciones de las enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas obtenidas de microorganismos termófilos han tenido gran acogida en varios sectores de la industria alimentaria, de detergentes, del cuero y textil, aplicaciones

biotecnológicas, desempeñan importancia médica y farmacéutica por su utilidad en procesos biológicos y en el ciclo de vida de muchos patógenos y muchas aplicaciones de investigación requieren su uso debido a los reducidos costos de producción, naturaleza extracelular, disponibilidad y estabilidad (Banerjee y Ray, 2017; Gomri *et al.*, 2018; Haki y Rakshit, 2003; Mótyán *et al.*, 2013; Raddadi *et al.*, 2015). Algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pyrococcus*, *Thermococcus* y *Staphylothermus* se reportan como productoras de proteasas termoestables. Se ha encontrado que microorganismos como *Geobacillus stearothermophilus* produce una proteasa alcalina y termoestable óptimamente activa a 85 °C (Haki y Rakshit, 2003) y otras bacterias como *Brevibacterium Linens* y *Bacillus subtilis* tienen la máxima producción de proteasa a 50 °C teniendo en cuenta el efecto de la temperatura, sustrato, concentración y algunos iones metálicos (Mohammad *et al.*, 2017). La utilización de otros métodos como las bibliotecas genómicas reportan enzimas termotolerantes, que resisten álcalis y procesos de oxidación, con actividades óptimas a valores de pH 11 y pueden resultar beneficiosos en la industria del detergente (De Castro *et al.*, 2016).

En biología molecular se ha explorado fuentes de enzimas termoestables para incluirlas en procesos como producción de fragmentos de *Klenow*, síntesis de péptidos, digestión de proteínas no deseadas durante la purificación de ácidos nucleicos, cultivo celular y disociación de tejidos, preparación de fragmentos de anticuerpos recombinantes para investigación, diagnóstico y terapia, exploración de las relaciones estructura-función mediante estudios estructurales, eliminación de etiquetas de afinidad de proteínas de fusión en técnicas de proteínas recombinantes, secuenciación de péptidos y digestión proteolítica de proteínas en proteómica donde son importantes los factores de temperatura y variación de pH (Da Silva, 2017; Mótyán *et al.*, 2013). También, la ingeniería de proteínas estudia estas enzimas con métodos para diseñar

proteasas y modificar la estructura, mejorando la actividad, especificidad y estabilidad térmica, importante en el momento de la formación de enlaces disulfuro, modificación de aminoácidos del sustrato y sitios de unión y la comparación de la homología de secuencia con otras enzimas producidas por mesófilos y termófilos (Banerjee y Ray, 2017).

Actualmente, en la industria láctea, algunas especies bacterianas termófilas como *Anoxybacillus flavithermus* y *Geobacillus sp* se emplean como indicadores de higiene de los productos procesados, ya que no presentan patogenicidad y su presencia puede informar sobre la acidez o alterar el sabor y calidad del producto (Mehta *et al*, 2016). Se puede explorar el uso de enzimas proteolíticas termoresistentes en la resolución de problemas locales, como el tratamiento de residuos provenientes de la industria láctea, ya que dichos residuos suelen ser el suero lácteo y sustancias como ácidos, álcalis, detergentes, desinfectantes y otros productos de limpieza que muchas veces se vierten al agua sin algún tratamiento previo alterando las propiedades físicas y químicas del ambiente (Vargas y Martínez, 2017). Los tratamientos usados en el manejo de aguas residuales lácteas están relacionados con métodos físico-químicos, tales como desemeulsificación, flotación, micro-electrólisis y procesos de oxidación avanzada, que tienen como desventaja el alto consumo de energía y la contaminación secundaria por lo que se restringe su uso. Por el contrario, los procesos biológicos como la digestión anaerobia suelen ser una opción económica y viable para el tratamiento de las aguas, sin embargo, este tipo de sustrato tiene inconvenientes para optimizar estos procesos (Armesto, García, Correa y Bello, 2016), y ha llamado la atención el uso de bacterias termófilas productoras de enzimas proteolíticas para el tratamiento de aguas residuales debido a que pueden ser rentables, amigables con el medio ambiente y altamente eficientes.

4. Estado del arte

El estudio de microorganismos a través del tiempo ha sido de interés por su capacidad de adaptación a diferentes ambientes y su aprovechamiento en distintos procesos, por esta razón y teniendo en cuenta que la termofilia es una característica primitiva, Singleton y Amelunxen (1973) plantearon hasta la época los posibles mecanismos de supervivencia, como lo son: la estabilización de membrana a partir de lípidos, la resíntesis de los componentes celulares y la presencia de diferentes complejos moleculares que permiten la estabilización térmica. En cuanto a la aplicación de los microorganismos termófilos y su utilidad a nivel industrial, se recopiló información de 20 enzimas, las cuales se aislaron y caracterizaron fisicoquímicamente, además se compararon como enzimas obtenidas a partir de microorganismos mesófilos (Singleton y Amelunxen, 1973).

La notable inclinación por la búsqueda de metabolitos producidos por microorganismos termófilos se fundamenta en importantes ventajas en los procesos de investigación, como la termoestabilidad y resistencia a diferentes valores de pH. Las proteasas se han estudiado desde las fuentes de obtención, descripción de la estructura y función teniendo en cuenta mecanismos de acción y su papel en la fisiología (Rao, Tanksale, Ghatge y Deshpande, 1998), también la búsqueda, utilidad y aplicación molecular son importantes para comprender los mecanismos de resistencia a las altas temperaturas. Con el paso del tiempo y el avance en la tecnología, estas enzimas se han caracterizado mediante técnicas moleculares y bioquímicas, conocimiento que conlleva al desarrollo de las ingenierías o estrategias eficientes para su aplicación a nivel biotecnológico o industrial (Banerjee y Ray, 2017; Vieille y Zeikus, 2001).

El desarrollo en técnicas moleculares permitió nuevos análisis de la información de secuenciación, tal es el caso de Ward *et al.* (2002) que compararon secuencias de diferentes

microorganismos adaptados a la termofilia (*Pyrococcus sp*, *Sulfolobus solfataricus* y *Thermotoga maritima*) y establecieron una relación a nivel general de las proteasas identificadas, su similitud y diferenciación, además evaluaron los mecanismos de proteólisis utilizados por cada uno de estos microorganismos. En Colombia aplicando estas diferentes técnicas se han realizado estudios de aislamiento, caracterización genotípica y fenotípica de bacterias termófilas, asimismo caracterizaciones cinéticas y enzimáticas (lipasas, proteasas, celulasas, amilasas) en fuentes termominerales de Boyacá (Gómez, 2008; Posada *et al.*, 2004; Rubiano, 2006). Complementariamente, en el departamento de Nariño existe un reporte de aislamiento e identificación con métodos fenotípicos de bacterias amilolíticas en la fuente termal “Baños Chiles” realizado por Cabrera y Díaz (2003).

El aislamiento y caracterización de bacterias termófilas en los diferentes ambientes y la producción de enzimas sigue siendo un reto. Encontrar biocatalizadores con propiedades distintas que sean resistentes y aplicables en variados procesos son enfoques que se vienen desarrollando en diversas investigaciones, las cuales usan técnicas de caracterización fenotípica y métodos genotípicos, ejemplo de estos métodos es la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, marcador usado para la identificación, diferenciación taxonómica y relación filogenética entre las cepas y discriminación de microorganismos que están genéticamente cerca uno del otro. Adiguzel *et al.*, (2009) realizaron un estudio empleando técnicas fenotípicas (análisis de ácidos grasos), genotípicas como análisis de secuencia de rRNA y perfiles genómicos de rep-PCR (REP, ERIC, BOX y (GTG) 5) para la identificación y caracterización de termófilos que se asocian con los géneros *Geobacillus*, *Anoxybacillus* y *Bacillus*.

Es importante comprender que la combinación de métodos fenotípicos y genotípicos nos acerca a conocer un poco más sobre los ambientes termales y sus microorganismos presentes.

Estudios realizados en Ecuador mediante técnicas microbiológicas y moleculares dan a conocer la diversidad de microorganismos (bacterias, hongos, algas) asociados a fuentes termales de origen volcánico que podrán ser aprovechados en próximas investigaciones (Molina y David, 2017; Rivas, 2017). En cuanto la actividad enzimática, reportes de microorganismos en ambientes naturales acoplan distintos métodos, El-Gayar *et al.* (2017) en Jazan, Arabia Saudí, identificaron mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA a *Brevibacterium Linens* y *Bacillus subtilis* con capacidad de producir proteasa a 50 °C y amilasas a 30 °C y pH de 7,5,

Por otra parte, Mohammad *et al.* (2017) reportan el aislamiento de diez bacterias termófilas en aguas termales de Jordania, las cuales fueron caracterizadas según la morfología, pruebas bioquímicas, y amplificación del gen 16S rRNA, encontrando que 9 cepas fueron *Bacillus licheniformis* y una *Thermomonas hydrothermalis*, adicionalmente los aislados revelaron capacidad de producir algunas enzimas termoestables tales como amilasa, proteasa, celulasa, gelatinasa y lecitinasa que podrán tener aplicaciones industriales o ambientales. Finalmente, se puede añadir que las nuevas técnicas de estudio de DNA como metagenómica junto con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), ha permitido la generación de grandes cantidades de información sobre termófilos, que permiten evaluar la diversidad taxonómica y funcional e integrar herramientas bioinformáticas y algunos métodos derivados del metagenoma para aislar sus termozimas, todo esto en función de comunidades ecológicas (De Castro *et al.*, 2016).

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Identificar bacterias termófilas proteolíticas aisladas de una fuente termal del volcán Chiles, Nariño, Colombia.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad proteolítica de bacterias termófilas aisladas de una fuente termal del volcán Chiles, Nariño, Colombia.
- Caracterizar bacterias termófilas proteolíticas aisladas de una fuente termal del volcán Chiles, Nariño, Colombia.
- Estimar la actividad proteolítica del mejor aislado, respecto a un medio remanente de la industria láctea (suero).

6. Métodos

6.1 Aislamiento de bacterias termófilas

6.1.1 Colecta de muestras

Se colectaron 3 muestras de agua en la fuente termal “Jesús del Río”, vereda Calera, corregimiento de Chiles, municipio de Cumbal. En el lugar de colecta se registraron parámetros fisicoquímicos como temperatura y pH, además de sus respectivas coordenadas geográficas y altura. Las muestras se colectaron manualmente en termos estériles con capacidad de 250 mL que permitieron mantener temperatura constante hasta su procesamiento en los laboratorios de Microbiología y Procesos microbianos de la Universidad de Nariño.

6.1.2 Procesamiento de muestras

Para el crecimiento de bacterias termófilas se utilizaron dos medios de cultivo preparados con agua previamente filtrada de la fuente termal “Jesús del Río”, el medio fue ajustado a pH 6,0. Los medios usados fueron *Luria Bertani* (triptona 1 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, NaCl 0,5 g/L, agar-agar 15 g/L) (Sen *et al.*, 2014) y un medio con adición de peptona 5 g/L, glucosa 5 g/L y agar-agar 15 g/L. Las muestras se inocularon por triplicado en los medios sólidos utilizando 100 µL de cada una y se realizó siembra masiva, las condiciones de cultivo estuvieron dadas a temperatura de 42°C durante 24 horas.

Obtenido el crecimiento, las colonias con características diferenciales se llevaron a cajas de *petri* de agar nutritivo y a través de pases repetitivos se obtuvo cultivos bacterianos axénicos, las condiciones de cultivo estuvieron dadas a temperatura de 50 °C durante 12 horas, cada aislado se almacenó por duplicado en tubo inclinado tipo *slant* a temperatura ambiente.

6.1.3 Conservación de bacterias termófilas

Para conservar las cepas de bacterias termófilas aisladas se utilizó método por congelación en suspensión con agente criogénico glicerol en concentración 30%, la concentración celular fue 10^8 cel/mL, por cada muestra se realizó diez réplicas (Sahay *et al.*, 2017).

Se verificó viabilidad celular y enzimática asociada a la actividad proteolítica durante todo el proceso de experimentación $N = \sqrt{0,4n}$, donde N: número de viales a utilizar para el ensayo y n: número de viales que conforman el banco (Poutou, Martínez y Frontela, 1994).

6.1.4 Actividad proteolítica

Después de obtener los cultivos bacterianos axénicos, se determinó la actividad proteolítica, para esto se utilizó un medio selectivo denominado agar leche descremada en concentración 1% p/v (leche descremada Hi calcio 1 g/L, glucosa 1 g/L, cloruro de calcio 0,5 g/L, sulfato de amonio 1 g/L, extracto de levadura 1 g/L, fosfato de sodio monobásico 0,5 g/L, fosfato de sodio dibásico 0,5 g/L, agar-agar 15 g/L) (Pedroza, Quevedo y Matiz, 2007). Las condiciones de cultivo fueron a temperatura de incubación de 50 °C durante 12 horas, la presencia de un halo transparente alrededor de las colonias indicó la actividad de las proteasas (El-Gayar *et al.*, 2017; Mohammad *et al.*, 2017; Sahay *et al.*, 2017). Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA que permitió relacionar el factor tipo de aislado bacteriano respecto a la variable dependiente actividad proteolítica, consecuentemente se seleccionaron 5 aislados bacterianos con el mayor tamaño de la media del halo de proteólisis.

Posterior a esto, para verificar la actividad proteolítica, se seleccionaron cinco aislados bacterianos con crecimiento y halo de proteólisis diferencial en el medio de agar leche descremada y se realizó un diseño factorial estándar en el cual se evaluaron los factores:

concentración de sustrato (2, 5 y 10 % p/v), temperatura (30, 37 y 50 °C) y tipo de aislado, transcurridas 12 horas y utilizando un calibrador se determinó el tamaño del halo de proteólisis en milímetros (Figura 1).

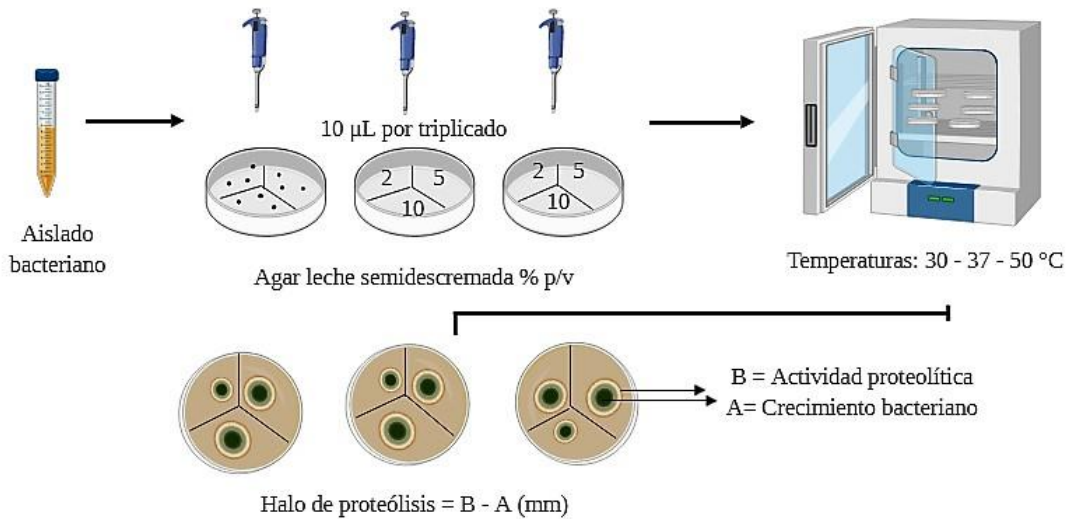


Figura 1. Diagrama experimental que describe la actividad proteolítica con respecto a los factores concentración de sustrato y temperatura por uno de los cinco aislados bacterianos termófilos seleccionados. (Fuente imagen: este estudio).

6.1.5 Registro y procesamiento de los datos

Los datos obtenidos se registraron en una hoja de cálculo, se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XVI* para analizar mediante estadísticos básicos y determinar la normalidad, homocedasticidad e independencia de residuos, dependiendo de esto, se realizó un análisis de varianza (ANOVA multifactorial) que permitió relacionar los factores categóricos concentración, temperatura y tipo de aislado bacteriano, respecto de la variable dependiente halo de hidrólisis. Se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho: No existen diferencias significativas en la actividad proteolítica con relación a la incidencia de la concentración, temperatura y tipo de aislado bacteriano.

Ha: Existen diferencias significativas en la actividad proteolítica con relación a la incidencia de la concentración, temperatura y tipo de aislado bacteriano.

6.2 Caracterización de bacterias termófilas proteolíticas

6.2.1 Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos se realizó atendiendo las características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas. Se examinó el aspecto de las colonias teniendo en cuenta la forma, margen, elevación, superficie, textura, propiedad óptica, tamaño y color (Gomri *et al.*, 2018). La morfología celular se determinó a través de tinción de *Gram* de las células y se observó usando un microscopio de luz *AmScope* equipado con una cámara digital *AmScope Microscope Digital Camera*.

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas y fisiológicas: actividad de catalasa y oxidasa; producción de indol y ureasa; reacciones de rojo de metilo (RM) y Voges-Proskauer (VP); fermentación y uso como fuente de carbono de D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-maltosa, D-sacarosa y D-lactosa; e hidrólisis de gelatina y almidón (Gomri *et al.*, 2018).

6.2.2 Caracterización molecular

6.2.2.1 Extracción de DNA

El DNA genómico total se extrajo de muestras bacterianas axénicas usando el método de *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) escala mínima modificado previamente y descrito por Burbano, Caetano, Otero y Álvarez (2016).

Inicialmente, se inoculó una colonia de cada aislado en 10 mL de caldo Trypticase de soya, se incubó a temperatura de 50 °C entre 12 y 18 horas. Transcurrido este tiempo, se transfirió a tubos falcón de 15 mL y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos, se descartó sobrenadante y al pellet celular obtenido se le adicionaron 567 µL de solución tampón TE 1M, 30 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) 10% y 9 µL de proteinasa K (20 mg mL⁻¹), se agitó por inversión y se incubó en baño maría a 37 °C durante una hora. Posterior a esto, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 100 µL de NaCl 5M, se agitó con vórtex y se agregaron 80 µL de CTAB precalentado a 65 °C, se agitó nuevamente en vórtex y se incubó en baño maría por 20 minutos a 65 °C. Después de este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 10000 rpm durante 25 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se agregó 1 µL de RNAsa (10 mg mL⁻¹), se incubó en baño maría a 37 °C durante 1 hora. Luego de este tiempo se adicionó igual volumen de cloroformo, se agitó con vórtex y se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se precipitó el DNA con 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico frío, se agitó lentamente por inversión y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó sobrenadante y se secó el pellet a 37 °C. Finalmente, el DNA se suspendió en 50 µL de agua mili-Q y se almacenó a -20 °C hasta su respectivo análisis (Burbano et al., 2016).

La cuantificación del material genético se realizó en gel de agarosa 1%, la muestra se preparó adicionando 2 µL de DNA y 1 µL de azul de bromofenol. Para verificar tamaño molecular se utilizó el marcador Lambda *Hind III* y *1 Kb* (Promega), las condiciones de corrida estuvieron dadas a 70 voltios durante 1 hora y 30 minutos en cámara *Multisub Electrophoresis System Cleaver Scientific*. El gel se registró en un fotodocumentador *Smart Doc Imaging Enclosure*

Bench Marck Accuris E300 UV a una longitud de onda de 590 nm. La concentración de DNA (ng/μL) de las muestras se estimó por comparación con las bandas del marcador comprendidas entre 6557 pb (135 ng) hasta 4361 pb (90 ng), el ajuste de concentraciones se realizó en *NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer with Wi-Fi* (Burbano et al., 2016).

6.2.2.2 Amplificación y secuenciación de 16S rRNA

Se amplificó selectivamente el gen 16S rRNA a partir de DNA genómico purificado mediante el uso de *primers* universales 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1041R (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') (Lane, 1991) atendiendo el protocolo modificado previamente y descrito por Burbano *et al.* (2016). La concentración final de la reacción de PCR fue: 0,4 μM de primers, mix de dNTPs a 0,05 mM, Taq DNA Polimerasa 0,025u/μL, MgCl 21 mM, 10 μL de Buffer *Colorless* (Promega) y H₂O ultrapura 32,75μL (Burbano *et al.*, 2016).

Los ciclos de amplificación fueron los siguientes: 2 minutos a 95 °C para desnaturalización inicial, después, 30 ciclos de 94 °C durante 3 minutos, 5 °C por 1 minuto y 74 °C por 3 minutos y una elongación final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR amplificados de aislados bacterianos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% - TAE 1X, las condiciones de corrida fueron 70 voltios durante 1 hora y 30 minutos en cámara *Multisub Electrophoresis System Cleaver Scientific* (Burbano *et al.*, 2016).

Los amplicones obtenidos se enviaron a CorpoGen (Orden de prestación de servicios No. VPR 1921130 suscrito entre la Universidad de Nariño y la corporación CorpoGen). La secuenciación se realizó por el método de Sanger, para ello se usó electroforesis capilar y secuenciador *ABI PRISM 3500 Analyzer* (8 capillary type). Las secuencias se editaron usando el

programa *Chromas lite V. 2.01* y se alinearon usando el programa *BioEdit*. La identificación se realizó por comparación con secuencias de 16S rRNA depositadas en la base de datos del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI GenBank) usando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y en la base de datos *Ribosomal Database Project* (RDP) usando la herramienta *Seqmatch*. Posteriormente, el análisis filogenético de secuencias se realizó mediante la construcción de un árbol para establecer distancia evolutiva utilizando el programa de libre acceso Mega X (Adiguzel *et al.*, 2009; Burbano *et al.*, 2016; Mohammad *et al.*, 2017).

6.2.2.3 Perfil genómico

A partir de DNA genómico purificado, se realizó perfiles genómicos de rep-PCR usando juegos de *primers* correspondientes a los elementos BOX y ERIC (Adiguzel *et al.*, 2009). Los *primers* usados fueron BOX A1R (5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT G 3') (Versalovic, Schneider, De Bruijn y Lupski, 1994), ERIC 1R (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT 3') y ERIC 2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GGT GAG C 3') (Adiguzel *et al.*, 2009). La concentración final de reacción fue 0,4 μ M de *primers*, mix de dNTPs a 0,05 mM, Taq DNA Polimerasa 0,025u/ μ L, MgCl 21 mM, 10 μ L de Buffer *Colorless* (Promega) y H₂O ultrapura 32,75 μ L. La PCR se realizó según el método modificado previamente y descrito por Adiguzel *et al.* (2009) así, el programa de termociclado para BOX PCR estuvo determinado por: desnaturalización inicial 95 °C por 7 minutos y 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anillamiento de 53 °C por 1 minuto, extensión final de 65 °C por 8 minutos y polimerización final de 65 °C por 15 minutos, refrigeración a 4°C; para ERIC PCR se realizó de la siguiente manera: desnaturalización inicial 95 °C por 7 minutos y 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anillamiento de 52 °C por 1 minuto, extensión final de 65 °C por 8 minutos y polimerización final de 65 °C por 15 minutos, refrigeración a 4°C. Posterior a esto, se analizó las muestras en geles de agarosa 1% % - TAE

1X, las condiciones de corrida fueron 70 voltios durante 1 hora y 30 minutos en cámara *Multisub Electrophoresis System Cleaver Scientific* (Burbano *et al.*, 2016). Finalmente, se determinó el tamaño molecular de los fragmentos usando el programa *Photocapwt*, se realizó una matriz binaria de caracteres ('1' para la presencia y '0' para la ausencia de banda en una posición particular) de cada fragmento, para el análisis se usó el programa *NTSYS Spc 2.1* (Licencia UH3071IX) que permitió evaluar la similaridad entre las especies y la construcción de un dendrograma (Adiguzel *et al.*, 2009; Burbano *et al.*, 2016).

6.3 Actividad proteolítica del mejor aislado respecto a un medio remanente de la industria láctea (suero)

Después de realizar la verificación de la actividad proteolítica y caracterización de los aislados bacterianos se seleccionó el aislado con mejor crecimiento y halo de proteólisis en el medio de leche descremada a diferentes concentraciones y temperatura. Se procedió a verificar crecimiento y actividad enzimática en un remanente de la industria láctea (suero) atendiendo el protocolo modificado y adaptado descrito por Pedroza *et al.*, (2007).

El protocolo consistió en determinar el crecimiento del aislado bacteriano en suero lácteo a través de un cultivo semidiscontinuo y evaluar la actividad enzimática, para esto, se elaboró una curva patrón para la cuantificación de proteínas del medio, la actividad enzimática se determinó en agar leche descremada en diferente concentración y temperatura; los detalles del experimento se describieron con detalle en el diseño experimental.

6.3.1 Análisis de suero lácteo

El suero lácteo fue colectado en “Lácteos buena vista” en el municipio de Guachucal, Nariño. El análisis del suero consistió en evaluar parámetros fisicoquímicos como pH, acidez y

determinar el contenido de proteína, grasa, sólidos totales, sólidos no grasos y crioscopía.

Durante el desarrollo del experimento, el suero lácteo se esterilizó en autoclave a 7 lb de presión durante 7 minutos con la finalidad de no desnaturalizar las proteínas (Pedroza *et al.*, 2007).

6.3.2 Curva patrón para la cuantificación de proteínas

Se realizó una curva patrón para la cuantificación de proteínas en suero lácteo mediante la técnica colorimétrica de *Bradford* fundamentada en la reacción específica entre los aminoácidos que forman las proteínas y el reactivo azul de *coomassie* G-250 que forman un complejo de color azul cuya absorción máxima se presenta a 595 nm, usando espectrofotómetro *Spectroquant Prove 300* (Pedroza *et al.*, 2007). Para esto, se preparó una solución de suero lácteo 1000 µL/mL, a partir de esta solución se prepararon soluciones de concentración conocida con volumen final 10 mL (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µL/mL). Consecutivamente, se tomó 100 µL de solución y se adicionaron en 5 mL del reactivo de Bradford, se homogeneizó, se protegió de la luz y se realizaron mediciones en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco (reactivo de *Bradford* 5 mL; NaCl 0,15 M 0,1 mL) (Pedroza *et al.*, 2007). Finalmente, se realizó una regresión lineal con los datos de absorbancia en función de la concentración y se determinó la ecuación de la línea recta:

$$Abs_{595\text{ nm}} = m * X + b$$

Donde:

- “X” es la concentración de suero lácteo µL/mL.
- “b” es el punto de corte con el eje Y.
- “m” es la pendiente de la recta.

6.3.2.1 Determinación de proteínas en el suero

Una vez obtenida la curva patrón, se realizó una comparación que permitió medir la concentración relativa de proteínas del suero lácteo en los tiempos establecidos y la curva de crecimiento del cultivo semidiscontinuo del aislado bacteriano termófilo y proteolítico en el espectrofotómetro *Spectroquant Prove 300* (Pedroza *et al.*, 2007). Las condiciones de cultivo se evaluaron según diseño experimental.

6.3.3 Diseño experimental

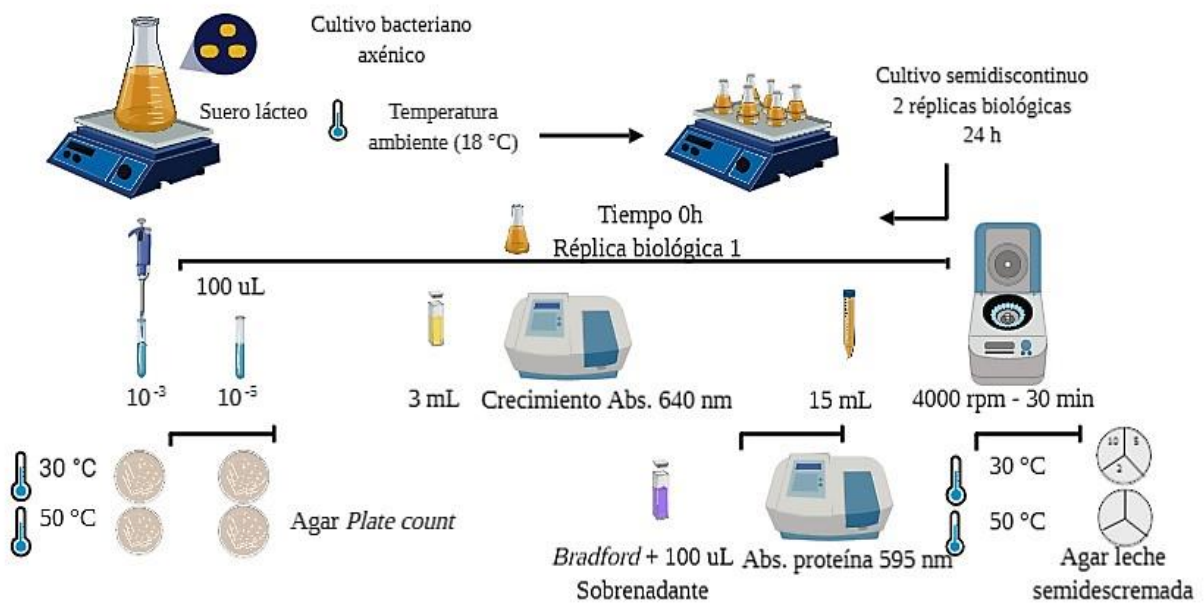


Figura 2. Diagrama experimental de la determinación de la actividad proteolítica del aislado bacteriano termófilo respecto al remanente de la industria láctea (suero), teniendo en cuenta los factores concentración de sustrato, temperatura y tiempo. (Fuente imagen: este estudio).

A partir de un cultivo axénico de la cepa bacteriana termófila que presentó el mejor crecimiento y halo de proteólisis diferencial en las diferentes concentraciones y temperatura en la actividad proteolítica se preparó un preinóculo, para esto se tomó una colonia del microorganismo y se transfirió a erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de suero lácteo en

su concentración inicial esterilizado en autoclave a 7 lb de presión durante 7 minutos (Pedroza *et al.*, 2007). Se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente con agitación constante en shaker *Orbital Shaker* (120 rpm) hasta que alcanzó la fase de crecimiento logarítmica (concentración celular 10^8 cel/mL). Se procedió a realizar el cultivo semidiscontinuo, para esto, el aislado bacteriano se inoculó en recipientes de 50 mL con 30 mL de suero lácteo esterilizado en autoclave a 7 lb de presión durante 7 minutos, las condiciones de cultivo fueron temperatura ambiente (18 °C) y agitación constante en shaker *Orbital Shaker* (140 rpm) durante 24 horas (Pedroza *et al.*, 2007). Durante los tiempos 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, se evaluó el crecimiento por densidad óptica utilizando espectrofotómetro *Spectroquant Prove 300* a una longitud de onda de 640 nm, además se realizó recuento en placa para establecer unidades formadoras de colonia (UFC) a través de la ecuación:

$$UFC \text{ mL}^{-1} = \frac{\text{Número de colonias} * \text{factor de dilución}}{100 \mu\text{L} (\text{factor de siembra})}$$

Las proteínas del medio se determinaron usando el reactivo de *Bradford* y realizando mediciones en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, se ajustó el cero de absorbancia con el blanco (reactivo de *Bradford* 5 mL; NaCl 0,15 M 0,1 mL). El protocolo para determinar la actividad proteolítica consistió en centrifugar el cultivo bacteriano y tomar 10 μ L del sobrenadante e inocular en agar leche descremada en diferente concentración (Figura 2). Se realizaron dos experimentos con siete tratamientos cada uno para analizar las variables independientes temperatura (30 y 50 °C) con nivel de factor 2 y concentración de leche descremada (2, 5 y 10 % p/v) con nivel de factor 3 (El-Gayar *et al.*, 2017). Las variables respuesta fueron el crecimiento bacteriano entendido como la absorbancia y unidades formadoras

de colonia (UFC) y la actividad proteolítica entendida como el halo de proteólisis. Para estos experimentos se utilizó un control negativo que fue el medio sin inóculo bacteriano.

6.3.4 Registro y procesamiento de datos

Los datos obtenidos se registraron en una hoja de cálculo, se utilizó el programa *Statgraphics Centurion XVI* para analizar mediante estadísticos básicos y determinar la normalidad, homocedasticidad e independencia de residuos, dependiendo de esto, se realizó un análisis de varianza (ANOVA multifactorial) que permitió relacionar los factores categóricos concentración de sustrato, temperatura y tiempo con respecto a la variable dependiente halo de proteólisis. Se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho: No existen diferencias significativas en la actividad proteolítica con relación a la incidencia de la concentración, temperatura y tiempo.

Ha: Existen diferencias significativas en la actividad proteolítica con relación a la incidencia de la concentración, temperatura y tiempo.

7. Resultados y discusión

7.1 Aislamiento de bacterias termófilas proteolíticas

Las muestras de agua se colectaron en la fuente termal “Jesús del Río” vereda Calera, (corregimiento de Chiles, municipio de Cumbal), la cual posee temperatura promedio de 42 °C y pH 6,04, las coordenadas geográficas registradas fueron N 00° 48’ 37’’; O 77° 51’ 48’ y altura 3260 m, hábitat favorable para el desarrollo de microorganismos termófilos. Durante el proceso de aislamiento y obtención de cultivos axénicos de bacterias termófilas se encontraron 18 formas de crecimiento cultivables con características diferenciales, la asignación de nombres a los aislados bacterianos se realizó dependiendo del medio en el cual se obtuvieron, *Luria Bertani* (LB): LB 302-3 A, LB 302-3 B, LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, LB 103-1 A, LB 103-1 B, LB 103-1, LB 102-1 y el medio con adición de peptona y glucosa: 102-2 A, 102-2 B1, 102-2 B2, 102-2 C, 203-2 A, 203-2 B, 302-2, 303-1 A, 303-1 B.

El aislamiento de bacterias termófilas en la fuente termal “Jesús del Río”, está relacionado con la capacidad de adaptación y crecimiento en medios con limitadas concentraciones de nutrientes, factores físicos o químicos como la temperatura y el pH y los diferentes mecanismos para la obtención de energía, características propias de estos ambientes (Aanniz *et al.*, 2015; Raddadi *et al.*, 2015). En la fuente termal “Baños Chiles” Cabrera y Diaz (2003), registraron parámetros de temperatura entre 40 y 42 °C y pH entre 5,98 y 6,0 que coinciden los datos registrados en este estudio, además obtuvieron 39 aislados bacterianos termófilos con características macroscópicas diferenciales y con formas microscópicas bacilares Gram positivas o Gram negativas asociadas con el género *Bacillus*. En otro estudio, en la fuente termal “Aguas Hediondas”, Ecuador, a una temperatura entre 50 y 56 °C y pH entre 5 y 6,5 se aislaron 47 microorganismos termófilos de los cuales, 37 corresponden a bacilos Gram positivos que a través

de técnicas moleculares se asocian con los géneros *Bacillus*, *Talaromyces* y *Chroococcidiopsis* (Rivas, 2017).

Por otra parte, en agar leche semidescremada 1% p/v se observó que 55% de los aislados bacterianos termófilos poseen actividad proteolítica (Figura 4). Los resultados indican que existe una diferencia estadísticamente significativa con valor-P igual a 0,0028 menor que 0,05, entre la media de halo de proteólisis (mm) y un nivel de un aislado bacteriano y otro, con un nivel de 5% de significancia. Teniendo en cuenta la medida de la media del halo de proteólisis en agar leche semidescremada 1% p/v, se seleccionó los aislados bacterianos: 102-2 B2, 102-2 C, 303-1 B, LB 302-2 A y LB 302-2 B (Figura 3), para verificar su actividad proteolítica con respecto a los factores concentración de sustrato y temperatura.

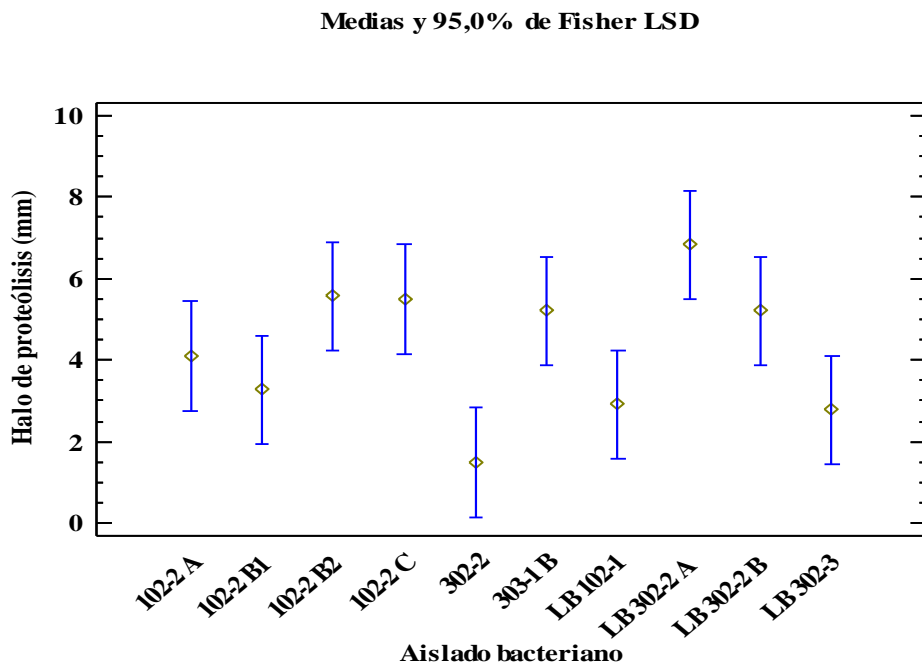
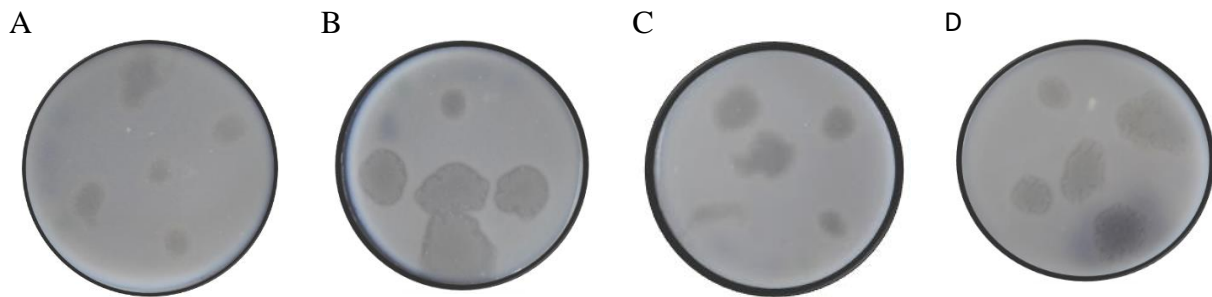


Figura 3. Gráfico de medias del análisis de varianza (ANOVA) de la variable dependiente Halo de proteólisis (mm) con respecto a 10 niveles del factor Tipo de aislado bacteriano. Se observa que los aislados: 102-2 B2, 102-2 C, 303-1 B, LB 302-2 A y LB 302-2 B tienen la mayor media con respecto al tamaño del halo de proteólisis.

La determinación de la actividad proteolítica de los aislados bacterianos termófilos a temperatura de 50 °C, se contrasta con estudios como el realizado por Aaniz *et al.* (2015), en fuentes termales de Marruecos, en el que reportaron que 50,41% de sus aislados poseen actividad proteolítica, 70,83% actividad amilolítica y algunos de estos produjeron todas las enzimas hidrolíticas extracelulares seleccionadas. Por su parte, Mohammad *et al.*, (2017), en fuentes termales de Jordania, aislaron e identificaron diez haplotipos de *Bacillus licheniformis* y *Thermomonas hydrothermalis*, de los cuales al menos uno produjo una enzima hidrolítica extracelular, 70% produjeron amilasas, 20% proteasas, 60% gelatinasas, 60% celulosas y 80% la enzima lecitinasa. Sahay *et al.* (2017) registraron en dos fuentes termales de la región del Himalaya (India) que de 140 aislados bacterianos 21,4% tenían actividad proteolítica, además de otras actividades enzimáticas y que en temperaturas entre 45 y 65 °C se confería estabilidad a la enzima. En este sentido, la producción de enzimas extracelulares está relacionada con el desarrollo de mecanismos genéticos y fisiológicos por parte de los microorganismos asociados a los ambientes denominados extremos para poder utilizar la materia orgánica disponible o cualquier tipo de nutriente y la adopción de estos sistemas para sobrevivir a las diferentes condiciones del ambiente (Aaniz *et al.*, 2015; Mohammad *et al.*, 2017).



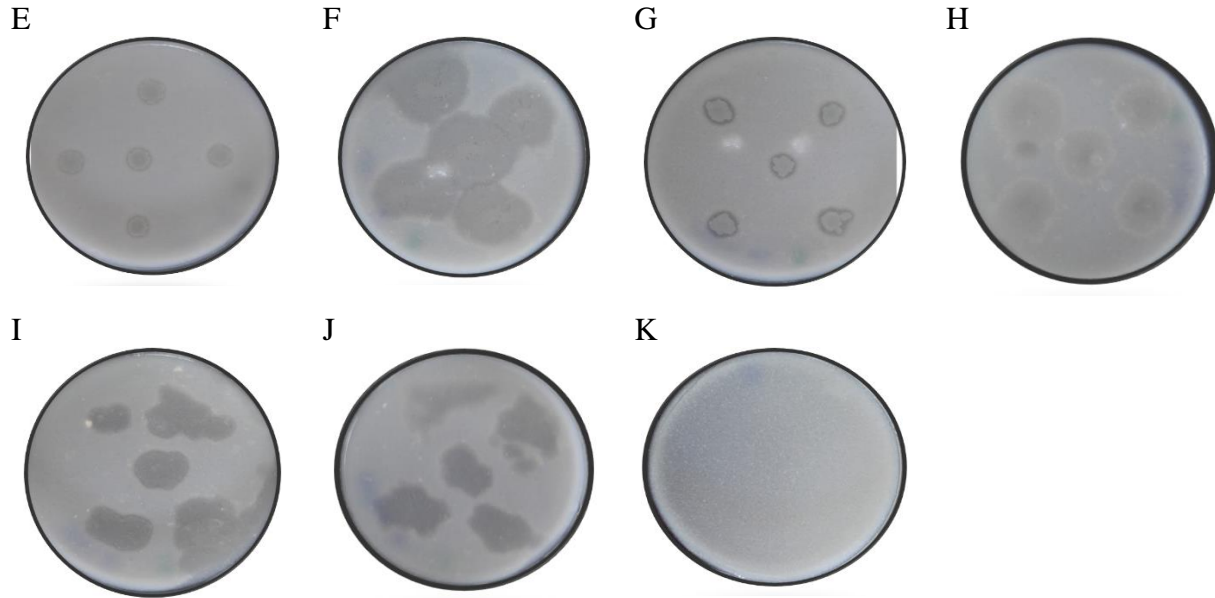


Figura 4. Fotografías de la actividad proteolítica en agar leche descremada 1% p/v por parte de los aislados: **A.** LB 302-2 A, **B.** LB 302-2 B, **C.** LB 302-3, **D.** LB 102-1, **E.** 102-2 A, **F.** 102-2 B1, **G.** 102-2 B2, **H.** 102-2 C, **I.** 302-2, **J.** 303-1 B, **K.** Control de crecimiento. Se observa el crecimiento bacteriano con su respectivo halo de proteólisis.

Verificando las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia de residuos, se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA multifactorial) de la actividad proteolítica de los cinco aislados bacterianos: LB 302-2 A, LB 302-2 B, 102-2 B2, 102-2 C y 303-1 B respecto a los factores: concentración de sustrato (2, 5 y 10 % p/v), temperatura (30, 37 y 50 °C) y tipo de aislado bacteriano. El ANOVA multifactorial generó valores-P menores que 0.05 que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores con 95,0% de nivel de confianza. Los valores-P obtenidos para los factores fueron: concentración 0,0010, temperatura 0,000 y tipo de aislado bacteriano 0,0000, además de los valores-P para las interacciones entre los factores: concentración-temperatura 0,0153, concentración-tipo de aislado bacteriano 0,0009, temperatura-tipo de aislado bacteriano 0,0000. Para entender el efecto de los factores sobre la

variable dependiente, se presentan los gráficos de interacciones obtenidos en el análisis de varianza (Figura 5, Figura 6, Figura 7).

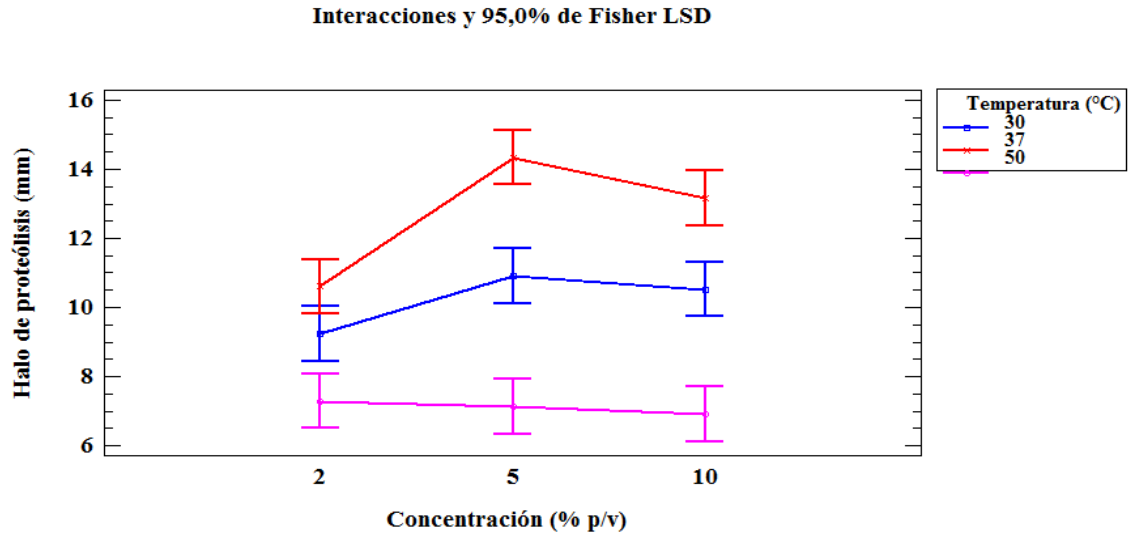


Figura 5. Gráfico de interacción de los factores concentración-temperatura respecto a la variable dependiente halo de proteólisis del experimento para los 5 aislados bacterianos termófilos.

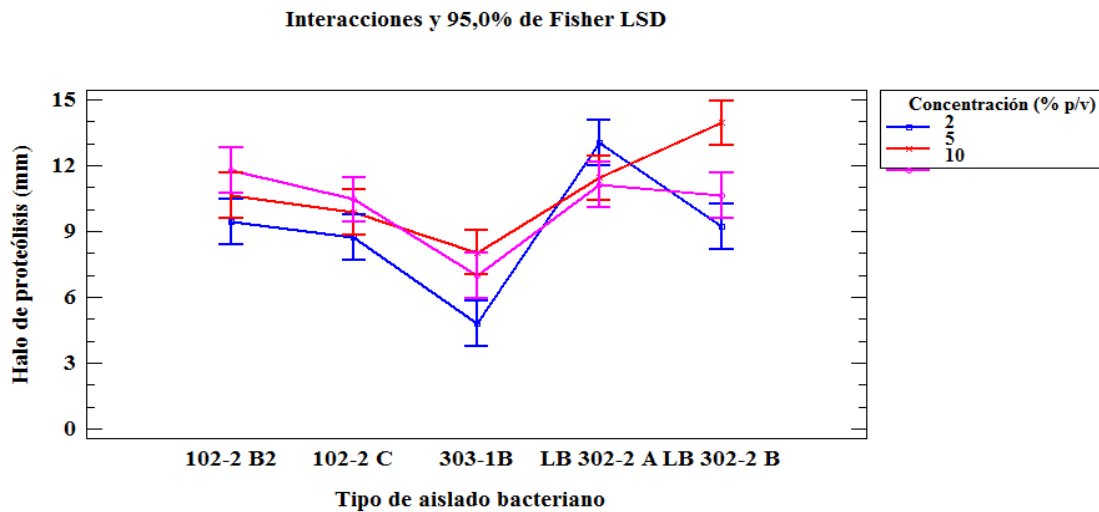


Figura 6. Gráfico de interacción de los factores tipo de aislado bacteriano-concentración de sustrato respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.

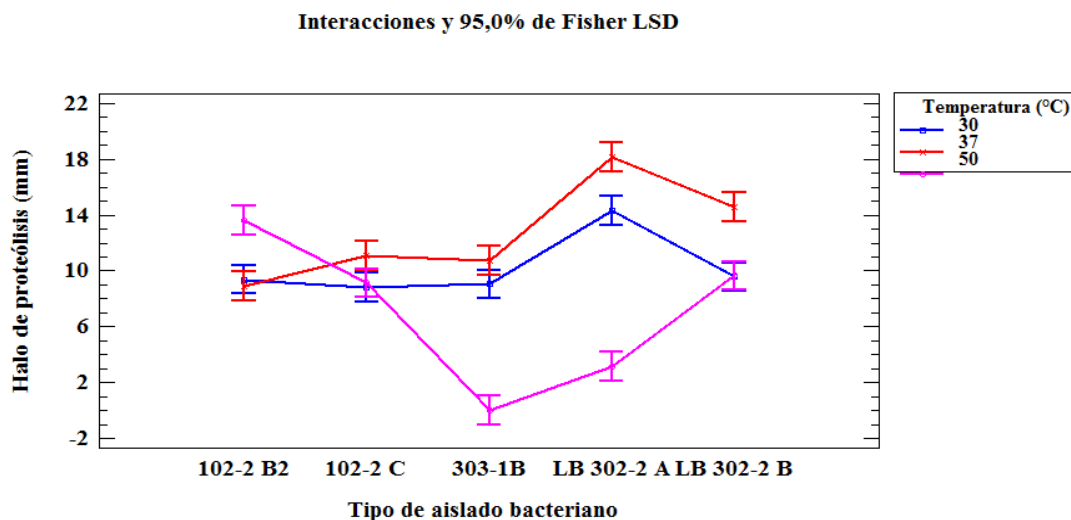


Figura 7. Gráfico de interacción tipo de aislado bacteriano-temperatura respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.

La temperatura y la concentración del sustrato fueron factores que incidieron en el crecimiento y la actividad proteolítica bacteriana, se observó que la concentración de 5 % y temperatura de 37 °C se obtuvieron los mayores halos de proteólisis durante el experimento (Figura 3, Figura 5). En cuanto al tipo de aislado bacteriano se determinó que LB 302-2 A presenta la mejor media del tamaño del halo de proteólisis en los diferentes niveles de concentración y temperatura (Figura 3).

El experimento de la incidencia de la concentración de sustrato y la temperatura en la actividad proteolítica bacteriana se compara con el estudio realizado por El-Gayar *et al.* (2017) quienes observaron la producción de proteasas y amilasas de *B. linens* y *B. subtilis* en temperaturas de 30, 37 y 50 °C, y concentraciones de sustrato de 5, 10 y 20 %. En este estudio se determinó que la producción de proteasas de *B. linens* y *B. subtilis* en agar de leche descremada se incrementa con el aumento de temperatura alcanzando la tasa máxima a 50 °C para las dos cepas; al mismo tiempo, la leche descremada 5% fue la concentración óptima para la producción

de proteasas. Según El-Gayar *et al.* (2017) las proteasas son enzimas inducibles que necesitan un sustrato para estimular la producción por la célula microbiana. En cuanto al factor temperatura sobre la actividad proteolítica, se observó que en 50 °C la producción de proteasas fue menor en todas las concentraciones de sustrato y en 37 °C la producción fue máxima (Figura 7), este efecto puede deberse a condiciones de estrés bacteriana debido al nuevo sustrato propuesto. La temperatura tiene un efecto fundamental en procesos de síntesis de proteínas y velocidad de las reacciones bioquímicas dentro de la célula y, en consecuencia, interviene en el crecimiento microbiano e incide o reprime la producción enzimática (El-Gayar *et al.*, 2017).

7.2 Caracterización de bacterias termófilas proteolíticas

7.2.1 Caracterización fenotípica

La caracterización macroscópica de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos indica variación en cuanto a la forma, margen, elevación, textura, propiedad óptica, color y tamaño de las colonias (Figura 8). La forma se definió como irregular o puntiforme, margen ondulado o entero, elevación plana o convexa, textura membranosa o viscosa, propiedad óptica opaca o brillante, color blanco o rosado y tamaño grande o mediano. La tinción de Gram indicó que los 18 aislados bacterianos corresponden a bacilos Gram positivos, algunos de ellos con presencia de esporas centrales, la descripción para cada aislado se presenta en la Tabla 1.

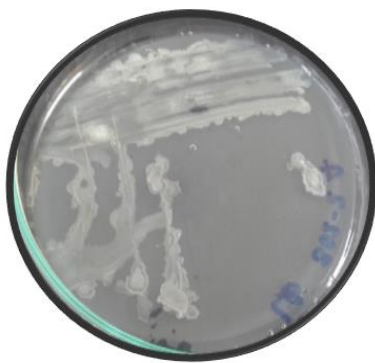
Tabla 1

Características morfológicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.

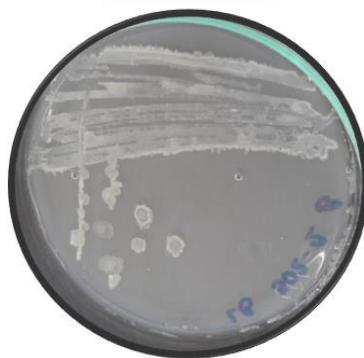
Aislado	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Textura	Propiedad óptica	Tamaño	Color
LB 302-3	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco
LB 302-2 A	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco
LB 302-2 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco
LB 102-1	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediana	Blanco
102-2 A	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Membranosa	Brillante	Mediana	Rosado
102-2 B1	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Blanco
102-2 B2	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Blanco
102-2 C	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Rosado
302-2	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Grande	Blanco
303-1 B	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Membranosa	Opaca	Mediano	Rosado

Las características morfológicas y microscópicas de los diez aislados bacterianos fueron similares a las descritas por Mohammad *et al.*, 2017 y corresponden al género *Bacillus*, el cual posee la capacidad de adaptación a las diferentes condiciones de los ambientes extremos.

A



B



C



D



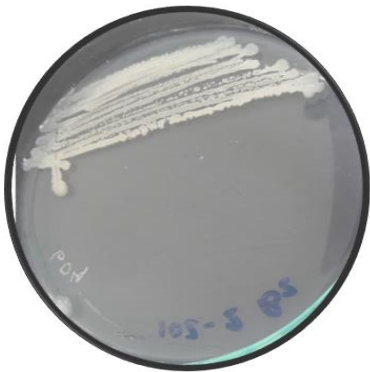
E



F



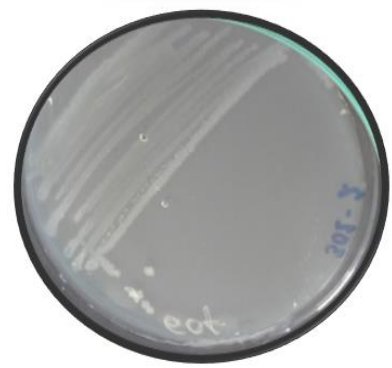
G



H



I



J



K



Figura 8. Fotografías de las colonias de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos **A.** LB 302-2 A, **B.** LB 302-2 B, **C.** LB 302-3, **D.** LB 102-1, **E.** 102-2 A, **F.** 102-2 B1, **G.** 102-2 B2, **H.** 102-2 C, **I.** 302-2, **J.** 303-1 B, **K.** Control de crecimiento.

En cuanto a las características bioquímicas variaron dependiendo del aislado bacteriano, sin embargo, utilizaron diferentes azúcares como fuentes de carbono y tuvieron la capacidad de fermentación (rojo de metilo positivo), además de que todos los aislados produjeron gelatinasas y 60% presentaron actividad amilolítica (Tabla 2).

Tabla 2

Características bioquímicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos.

Aislado	Catalasa	Oxidasa	Indol	Urea	RM	VP	Gelatina	Almidón	Glucosa	Fructosa	Galactosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa
LB 302-3	P	P	N	N	P	N	P	P	P	P	N	P	P	N
LB 302-2 A	N	P	N	N	P	N	P	P	P	P	N	N	N	N
LB 302-2 B	P	N	N	N	P	P	P	N	P	N	N	N	P	N
LB 102-1	N	N	N	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P	P
102-2 A	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	N	P	P	N
102-2 B1	P	P	P	N	P	N	P	N	P	N	P	P	P	N
102-2 B2	P	P	N	N	P	N	P	N	N	N	P	P	P	N
102-2 C	P	N	N	N	P	N	P	P	P	N	N	P	P	P
302-2	P	P	N	N	P	N	P	P	N	N	N	N	P	N
303-1 B	P	P	N	N	P	N	P	P	P	P	N	N	P	N

RM: Rojo de metilo, VR: Voges Proskauer, N: negativo, P: positivo.

Para el análisis de las características bioquímicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos se construyó un dendrograma usando el software NTSYS Spc 2.1 (Licencia UH3071IX) y tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). Los resultados indicaron que ninguno de los 10 aislados compartió algún patrón fenotípico, aunque existieron similitudes de 85% entre los aislado **A3** (LB 302-3) - **A18** (303-

1B) y los aislados **A10** (102-2 A) y **A11** (102-2 B1) (Figura 9). Autores como Mohammad *et al.*, (2017), asocian la diversidad fenotípica a las condiciones de estrés de ambientes considerados extremos, puesto que obliga a los microorganismos a desarrollar estrategias de supervivencia y adaptación. La diversidad fenotípica encontrada en este estudio fomenta a realizar nuevos trabajos para aplicaciones biotecnológicas, industriales y ambientales (Figura 9).

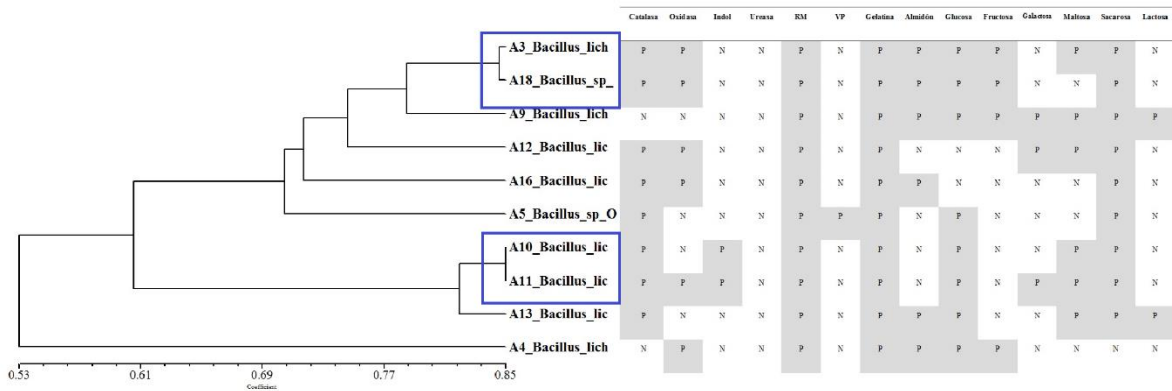


Figura 9. Dendrograma de características bioquímicas de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos **A3**. LB 302-3, **A4**. LB 302-2 A, **A5**. LB 302-2 B, **A9**. LB 102-1, **A10**. 102-2 A, **A11**. 102-2 B1, **A12**. 102-2 B2, **A13**. 102-2 C, **A16**. 302-2 y **A18**. 303-1 B. Las pruebas bioquímicas positivas se señalaron con color gris.

7.2.2 Caracterización genotípica

El proceso de extracción de DNA se realizó para los 18 aislados bacterianos termófilos, se obtuvieron concentraciones entre 40 y 100 ng/μL adecuadas para posteriores procedimientos moleculares (Figura 10). Las muestras de DNA para los 10 aislados bacterianos termófilos proteolíticos se ajustaron a concentración de 50 ng/μL para PCR (Figura 11).

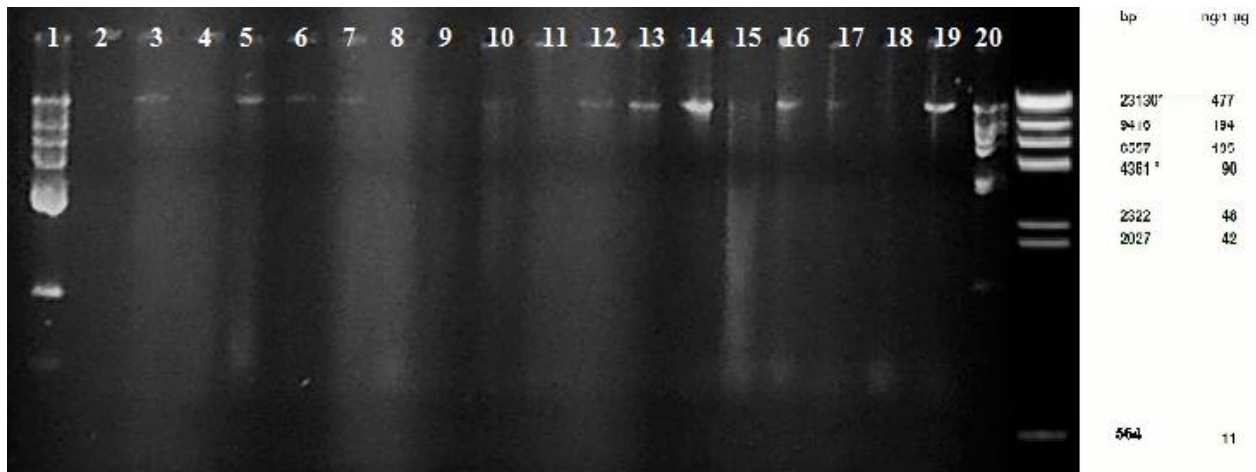


Figura 10. Extracción de DNA cromosomal de los aislados bacterianos termófilos. Gel agarosa 1%, intercalante usado *Ez vision*, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En poso 1 y 20 se encuentra el marcador molecular *Lambda DNA/HindIII* (Promega); en los posos 2 a 19, los aislados: LB 302-3 A, LB 302-3 B, LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, LB 103-1 A, LB 103-1 B, LB 103-1, LB 102-1, 102-2 A, 102-2 B1, 102-2 B2, 102-2 C, 203-2 A, 203-2 B, 302-2, 303-1 A, 303-1 B.

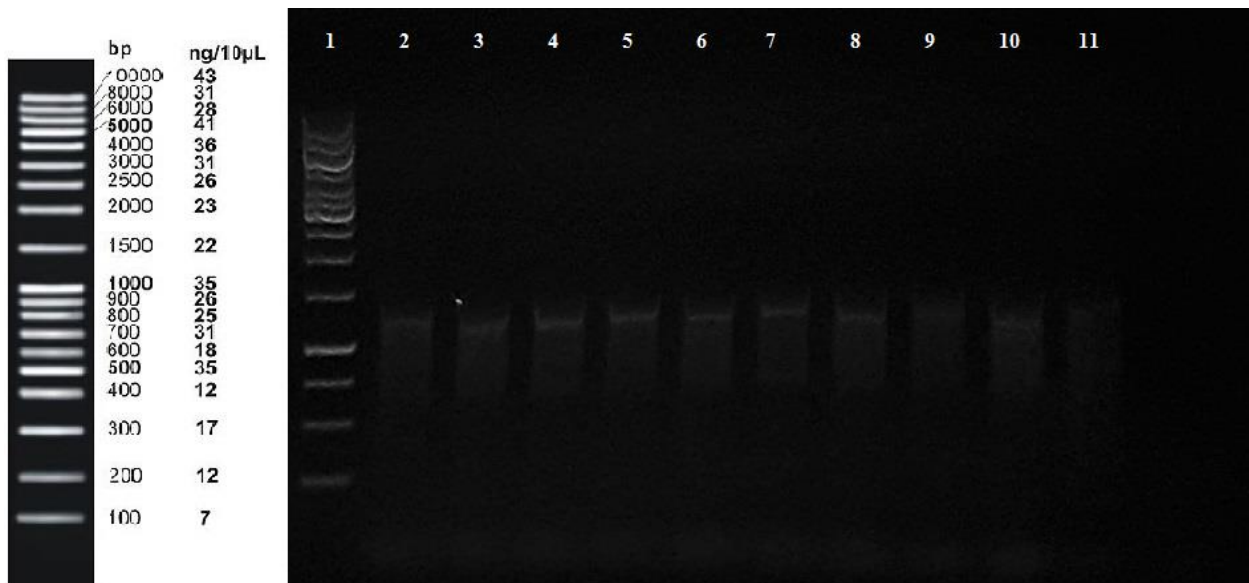


Figura 11. DNA cromosomal de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos. Gel agarosa 1%, intercalante usado Gel Red, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En el primer poso se encuentra el marcador molecular 1Kb

(Promega); en los posos 2 a 11, los aislados LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, LB 102-1, 102-2 A, 102-2 B1, 102-2 B2, 102-2 C, 302-2, 303-1 B.

Como esperado, la amplificación del gen 16S rRNA a través de PCR generó un producto de aproximadamente 1500 pb (Figura 11).

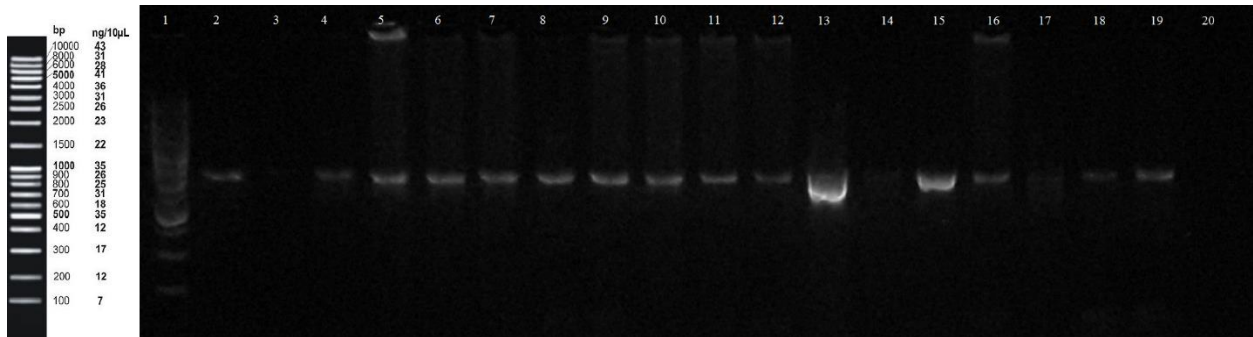


Figura 12. Amplificación de la subunidad 16S rRNA de los aislados bacterianos termófilos. Gel agarosa 1%, intercalante usado Gel Red, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 590 nm. En el primer poso se encuentra el marcador molecular *1Kb* (Promega); en los posos 2 a 19, los aislados: LB 302-3 A, LB 302-3 B, LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, LB 103-1 A, LB 103-1 B, LB 103-1, LB 102-1, 102-2 A, 102-2 B1, 102-2 B2, 102-2 C, 203-2 A, 203-2 B, 302-2, 303-1 A, 303-1 B, el poso 20 contiene el control negativo de la reacción.

La identificación de los aislados bacterianos como producto de la comparación de las secuencias con las bases de datos RDP y GenBank, teniendo en cuenta el porcentaje de identidad, cobertura y el posible origen (fuentes termales) indicó asociación de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos con el género *Bacillus* y las especies *Bacillus licheniformis* y *Bacillus sp.*, los resultados se describen en la Tabla 3.

Tabla 3

Identificación de las muestras por comparación en RPD y GenBank.

Aislado	Porcentaje de identidad%	RPD	Porcentaje de identidad %	GenBank	Identificación final
LB 302-3	96,5	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,92	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CICC 10108	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CICC 10108
	97,0	uncultured <i>Bacillus</i> sp.	98,84	<i>Bacillus aerius</i> strain CCMMB964	
LB 302-2 A	84,0	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,49	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CCMMB885	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CCMMB885
	83,9	<i>Bacillus</i> sp. DV9-58	98,41	<i>Bacillus</i> sp. CCMMB1015	
LB 302-2 B	96,2	<i>Bacillus</i> sp. DV9-5	98,76	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CCMMB933	<i>Bacillus</i> sp. strain OA113
	96,6	uncultured <i>Bacillus</i> sp.	98,97	<i>Bacillus</i> sp. strain OA113	
LB 102-1	92,3	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,25	<i>Bacillus licheniformis</i> strain 103D-012	<i>Bacillus licheniformis</i> strain 103D-012
	91,9	<i>Bacillus</i> sp. FPZSP532	98,24	<i>Bacillus paralicheniformis</i> strain FJAT-47825	
102-2 A	97,0	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,92	<i>Bacillus licheniformis</i> strain LOCK 1015	<i>Bacillus licheniformis</i> strain LOCK 1015
	97,1	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,92	<i>Bacillus licheniformis</i> strain BS1	
102-2 B1	95,9	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,36	<i>Bacillus aerius</i> strain CCMMB964	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CCMMB933
	95,9	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,36	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CCMMB933	
102-2 B2	93,8	<i>Bacillus</i> sp. DV9-5	98,79	<i>Bacillus licheniformis</i> strain IARI-NIAW2-3	<i>Bacillus licheniformis</i> strain IARI-NIAW2-3
	93,3	uncultured <i>Bacillus</i> sp.	98,79	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SCD 121044	
102-2 C	88,6	<i>Bacillus licheniformis</i>	97,92	<i>Bacillus licheniformis</i> strain IARI-NIAW2-3	<i>Bacillus licheniformis</i> strain IARI-NIAW2-3
	88,9	<i>Bacillus</i> sp. CCMMB1021	97,92	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SCD 121044	
302-2	89,2	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,35	<i>Bacillus licheniformis</i> strain GBPI48	<i>Bacillus licheniformis</i> strain GBPI48
	89,5	<i>Bacillus</i> sp. FPZSP532	98,27	<i>Bacillus paralicheniformis</i> strain SO3	

	95,1	uncultured <i>Bacillus</i> sp.	98,96	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CCMMB881	
303-1 B	89,2	<i>Bacillus</i> sp. DV9-5	97,24	<i>Bacillus</i> sp. CCMMB1021	<i>Bacillus</i> sp. CCMMB1021
	89,2	<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i>	97,24	<i>Bacillus licheniformis</i> strain IARI-NIAW2-3	

La variedad limitada de especies bacterianas en la fuente termal “Jesús del Río” se puede explicar por las condiciones del ambiente, como los bajos nutrientes y los factores fisicoquímicos (Alrumman et al., 2018; Mohammad *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Mohammad *et al.*, (2017), donde en fuentes termales de Jordania a través de la secuenciación del 16S rRNA identificaron 9 cepas como *Bacillus licheniformis* y una como *Thermomonas hydrothermalis*. Asimismo, en fuentes termales Arabia Saudí por secuenciación del gen 16S rRNA se identificó a *Bacillus aerius*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus sonorensis* con potencial para producir enzimas α -amilasas, proteasas y lipasas, respectivamente (Alrumman *et al.*, 2018).

Se ha reportado la presencia del género *Bacillus* en aguas termales de países como: Marruecos, Jordania, Arabia Saudí, Turquía, Ecuador, India, entre otros ambientes, y, se explica por el transporte bacteriano que se produce en las regiones y continentes, además, de que el género *Bacillus* tiene capacidad de producir esporas que le permiten una mejor adaptación al estrés ambiental y no requiere nutrientes específicos para el crecimiento, es así que puede colonizar nichos oligotróficos como marismas, aguas termales y suelos desérticos (Aaniz *et al.*, 2015; Alrumman *et al.*, 2018; Mohammad *et al.*, 2017; Sahay *et al.*, 2017; Salem *et al.*, 2016; Rivas, 2017).

El árbol resultante del análisis filogenético evidenció la formación de dos clusters, uno constituido por los aislados termófilos proteolíticos pertenecientes al género *Bacillus*, que también incluye la raíz interna *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 y el segundo cluster lo integra el outgroup o raíz externa *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661. Entre las especies del género *Bacillus* se observa que la distancia evolutiva es mínima, sin embargo, se ha podido inferir que existen características propias de cada aislado relacionadas con el fenotipo (Figura 13).

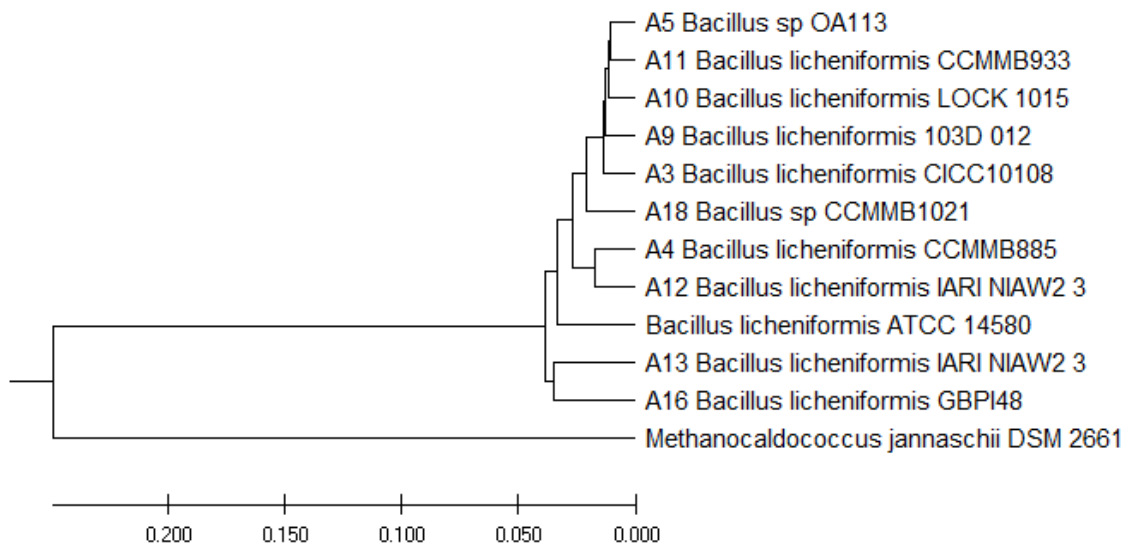


Figura 13. Árbol filogenético de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos construido usando el software Mega X y tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). Los aislados corresponden a: **A3.** LB 302-3, **A4.** LB 302-2 A, **A5.** LB 302-2 B, **A9.** LB 102-1, **A10.** 102-2 A, **A11.** 102-2 B1, **A12.** 102-2 B2, **A13.** 102-2 C, **A16.** 302-2 y **A18.** 303-1 B.

Aunque el análisis basado en 16S rRNA indicó que 80 % de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos corresponden a *Bacillus licheniformis*, por medio de los perfiles genómicos de BOX y ERIC PCR se reveló una considerable diversidad intraespecífica (Figura

14, Figura 15), que se respalda por las diferencias encontradas en las características morfológicas y bioquímicas.

A través del peso molecular de los amplificados de BOX-PCR se determinaron cuatro perfiles genómicos, perfil **A** (4.9, 4.3, y 2,6 Kb) con los aislados LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, 302-2 y 303-1 B, el perfil **B** (4.0 y 2.6 Kb) con los aislados 102-2 A, 102-2 B1 y 102-2 C, el perfil **C** (2.6, 2.4 y 2.2 Kb) con el asilado LB 102-1 y el perfil **D** (2.6, 2.2, 2.0 y 1.7 Kb) con el aislado 102-2 B2.

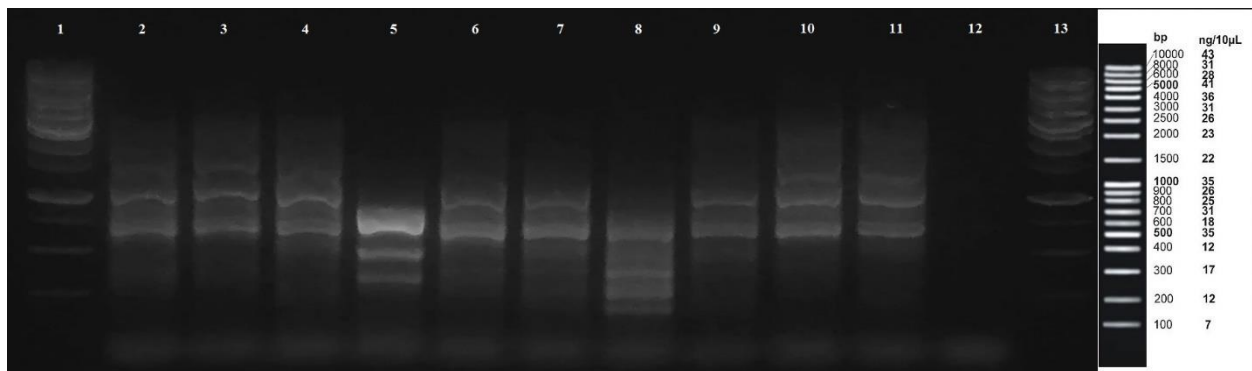


Figura 14. Amplificación BOX-PCR de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos. Gel agarosa 1%, intercalante usado Gel Red, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 590 nm. En los posos 1 y 13 se encuentra el marcador molecular *1Kb* (Promega); en los posos 2 a 11, los aislados LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, LB 102-1, 102-2 A, 102-2 B1, 102-2 B2, 102-2 C, 302-2, 303-1 B y el poso contiene 12 el control negativo de la reacción.

Por su parte, en la amplificación de ERIC-PCR se determinaron cinco perfiles genómicos, perfil **A** (0.7 y 0.6 Kb), al que corresponden los aislados LB 302-3, LB 302-2 B, 302-2 y 303-1 B, el perfil **B** (2.0, 0.7 y 0.6 Kb) con los aislados LB 302-2 A y 102-2 A, el perfil **C** (5.0, 0.8,

0.7, 0.6 y 0.2 Kb) al que corresponde LB 102-1, perfil **D** (7.1, 0.7 y 0,6 Kb) con los aislados 102-2 B1, 102-2 C y perfil **E** (4.6, 0.7 y 0.6 Kb) al que corresponde 102-2 B2 .

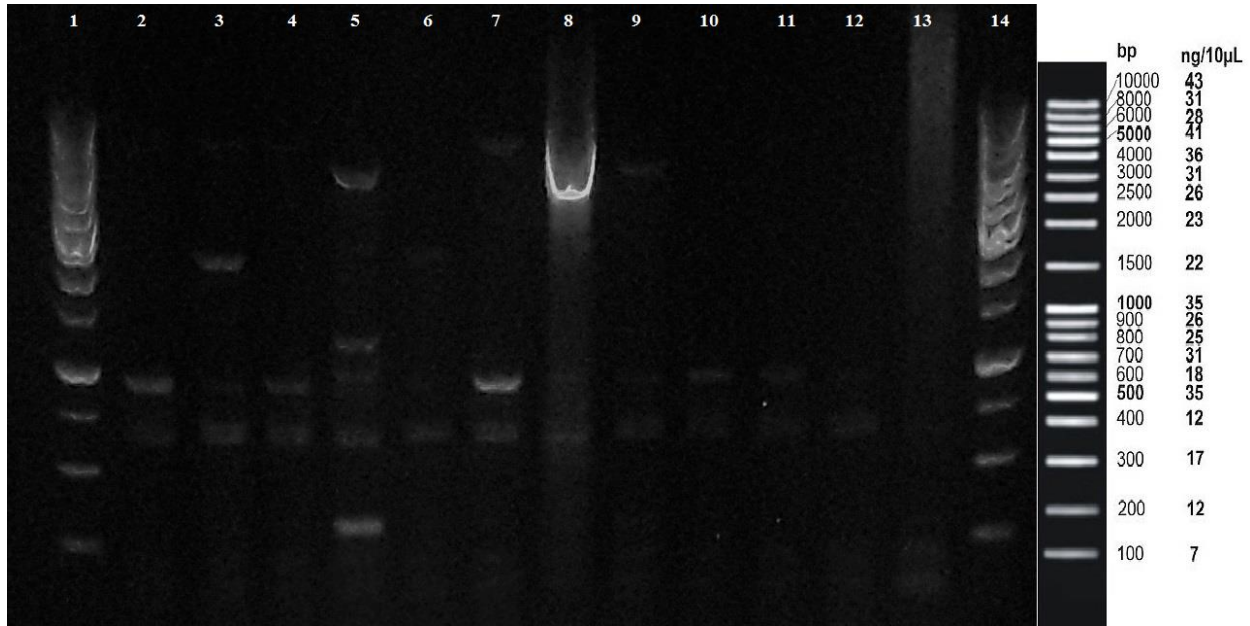


Figura 15. Amplificación ERIC-PCR de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos. Gel agarosa 1%, intercalante usado Gel Red, corrido en buffer TBE 1X a 80 V durante 1 hora y 30 minutos. Fotodocumentado en el equipo *Smart Doc Imaging Enclosure Bench Marck Accuris E300 UV* a una longitud de onda de 302 nm. En los posos 1 y 14 se encuentra el marcador molecular *1Kb* (Promega); en los posos 2 a 11, los aislados LB 302-3, LB 302-2 A, LB 302-2 B, LB 102-1, 102-2 A, 102-2 B1, 102-2 B2, 102-2 C, 302-2, 303-1 B, en el poso 12 el aislado LB 302-2 como control positivo y en el 13 contiene el control negativo de la reacción.

Para el análisis de los perfiles genómicos de BOX y ERIC – PCR (Figura 13, Figura 14) se construyó un dendrograma usando el software NTSYS Spc 2.1 (Licencia UH3071IX) y tomando los criterios *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA). Los resultados indicaron que los aislados A3 (LB 302-3), A5 (LB 302-2 B), A18 (303-1 B) y A16 (302-2) comparten una similaridad de 100 % en la amplificación de las regiones conservadas. Con respecto al fenotipo, no se observa algún patrón entre los aislados bacterianos termófilos proteolíticos (Figura 16).

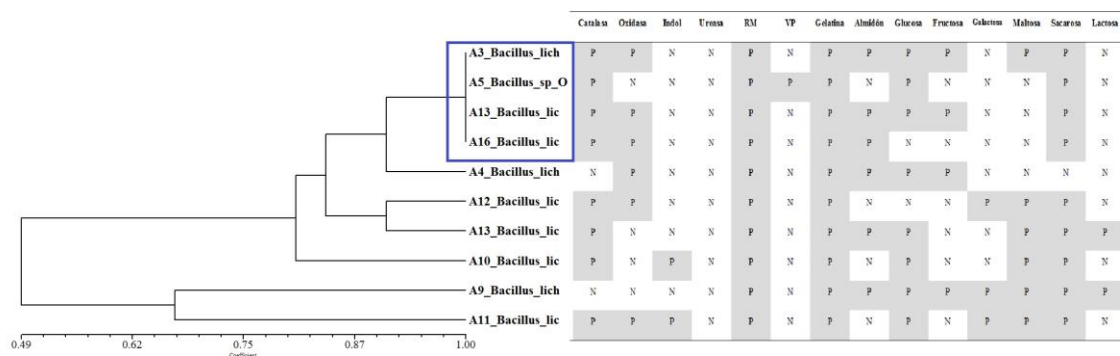


Figura 16. Dendrograma de los perfiles genómicos de BOX y ERIC – PCR de los aislados bacterianos termófilos proteolíticos **A3**. LB 302-3, **A4**. LB 302-2 A, **A5**. LB 302-2 B, **A9**. LB 102-1, **A10**. 102-2 A, **A11**. 102-2 B1, **A12**. 102-2 B2, **A13**. 102-2 C, **A16**. 302-2 y **A18**. 303-1 B. Las pruebas bioquímicas positivas se señalaron con color gris.

La diversidad genotípica obtenida en este estudio es similar a los resultados generados por Aaniz *et al.*, (2015), Adiguzel *et al.*, (2007) y Mohammad *et al.*, (2017) los cuales han utilizado técnicas de BOX, ERIC, (GTG)5 e ITS-PCR para estimar relaciones genéticas y realizar identificación y caracterización bacteriana. Tanto la secuenciación de 16S rRNA, como los perfiles genómicos se han descrito como herramientas moleculares de rápido y fácil acceso para distinguir bacterias termófilas a nivel de especie y subespecie. Distinguir las subespecies permite la posibilidad de diferenciar el fenotipo y el nicho entre los organismos, al parecer tanto los métodos fenotípicos como genotípicos dan una información completa y detallada que permite la caracterización de los microorganismos (Aaniz *et al.*, 2015; Adiguzel *et al.*, 2007; Mohammad *et al.*, 2017).

7.3 Actividad proteolítica del mejor aislado respecto al remanente de la industria láctea (suero)

Las características fisicoquímicas iniciales del suero lácteo utilizado durante el experimento fueron: pH 5,65, acidez 27,1, proteína 2,72 %, grasa 0,07 %, sólidos totales 6,96 %, sólidos no grasos 6,89 % y crioscopia 0,541. El suero lácteo contiene más de la mitad de los sólidos de la leche entera original, incluidas las proteínas suero (20% de la proteína total), la lactosa, la mayoría de minerales y vitaminas solubles en agua. Dichas proteínas incluyen α -lactoalbúmina (α -La), β -lactoglobulina (β -Lg), lactoferrina (Lf), lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, glycomacropeptidos (GMP) y proteosa-peptona que tienen efectos biológicos importantes como actividades fisiológicas que incluyen la unión de vitaminas, actividad antibacteriana y efectos inmunomoduladores, entre otros. (Dullius *et al.*, 2018; Mann, Athira, Sharma, Kumar y Sarkar, 2019)

Los resultados del ajuste del modelo para describir la relación de la concentración de suero lácteo ($\mu\text{L}/\text{mL}$) y absorbancia (595 nm) indicaron en el análisis de varianza (ANOVA) un valor-P igual a 0.000 menor que 0,05, una relación estadísticamente significativa y nivel de confianza del 95,0%. La ecuación del modelo ajustado se presenta a continuación:

$$\text{Concentración } \left(\frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \right) = -364,768 + 787,661 * \text{Absorbancia (595nm)}$$

El estadístico R-Cuadrado indicó que el modelo ajustado explica 87,2312% de la variabilidad en concentración ($\mu\text{L}/\text{mL}$) y el coeficiente de correlación es igual a 0,933977, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 197,034.

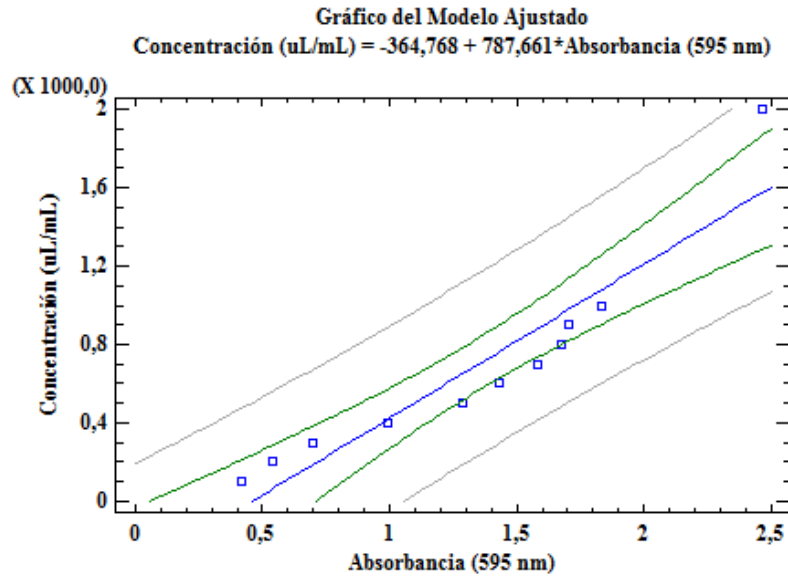


Figura 17. Gráfico de la curva de calibración para el ajuste de la concentración del suero lácteo en función de la absorbancia (595 nm).

A partir de la ecuación del modelo ajustado, se determinó la concentración de proteínas del sustrato durante 24 horas, los resultados se presentan en la Figura 18.

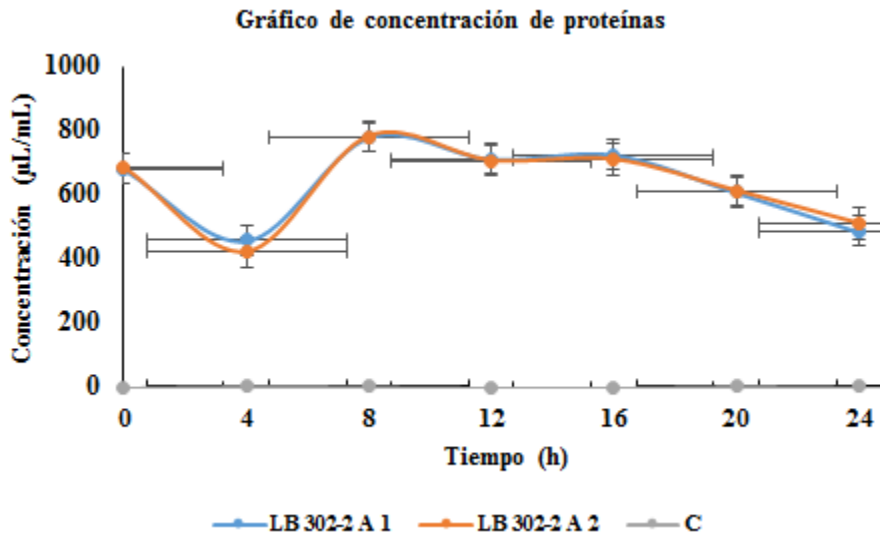


Figura 18. Gráfico de la concentración de proteínas del suero lácteo en función del tiempo. Se observa el comportamiento de dos réplicas biológicas y el control.

Se determinó la cinética de crecimiento microbiano, a través de absorbancia y células viables en función del tiempo, los resultados se presentan en la Figura 19 y Figura 20.

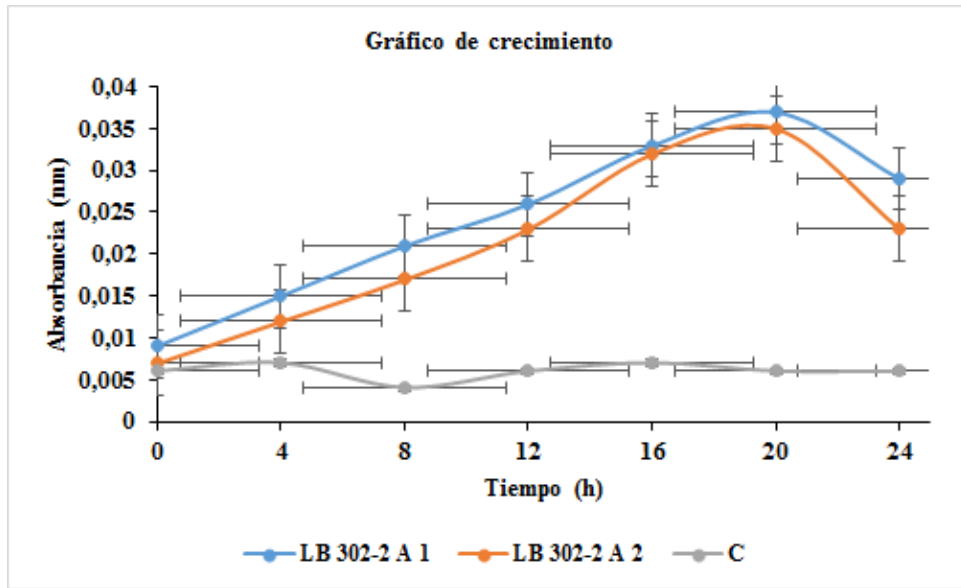


Figura 19. Cinética de crecimiento bacteriana, absorbancia (nm) en función de tiempo. Se observa dos réplicas biológicas y el control del crecimiento (medio sin inóculo).

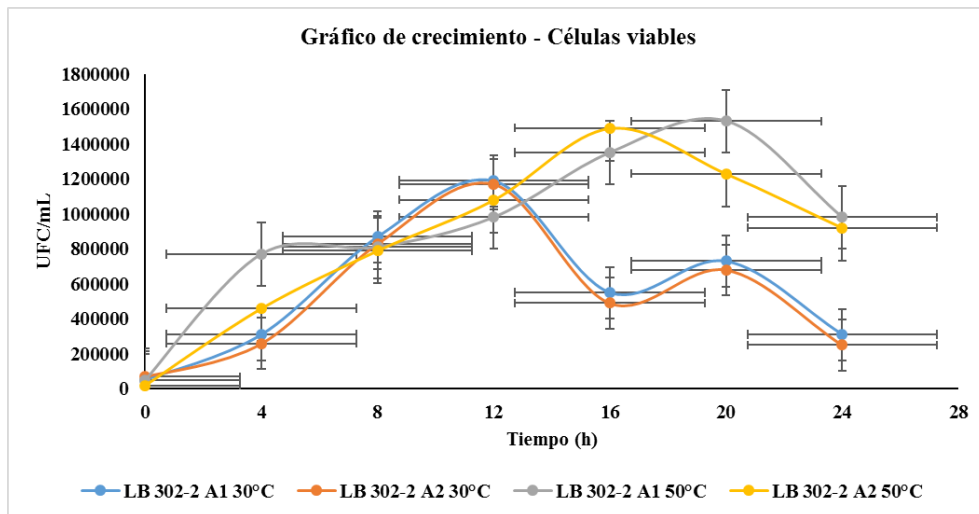


Figura 20. Cinética de crecimiento bacteriana, número de células viables en función del tiempo. Se observan dos réplicas biológicas. La incubación se realizó a temperaturas de 30 y 50°C, la dilución utilizada fue 10^{-3} .

En la gráfica de crecimiento de absorbancia en función del tiempo se observa que el aislado bacteriano identificado como *Bacillus licheniformis* CCMMB885 alcanza la fase de crecimiento exponencial en un tiempo de 20 horas (Figura 19), se debe tener en cuenta que la temperatura de cultivo fue ambiente (aproximadamente 18 °C), pH 5,65 y agitación constante 140 rpm. Los factores temperatura y pH de cultivo influyen fuertemente en el transporte de diversos componentes a través de las membranas celulares que inciden en el crecimiento celular, la formación de productos y el control de la expresión génica de las enzimas (Ahmad, AbdEl-Salam, Yaser y Taha, 2018; Alrumman *et al.*, 2018). Por otra parte, en el gráfico de células viables en función del tiempo (Figura 20), se determinó que en temperatura de 30 °C se alcanza la fase exponencial con un número de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL y en temperatura de 50 °C la fase exponencial se alcanza en tiempos entre 12 y 20 horas con un número mayor de unidades formadoras de colonia, se observó que *Bacillus licheniformis* CCMMB885 exhibió un amplio espectro de crecimiento con respecto al factor temperatura y utilización de sustrato.

En cuanto a la concentración de proteínas del suero lácteo entre 12 y 16 horas se mantiene constante y luego disminuye (Figura 18), correspondiente a los tiempos donde la fase exponencial bacteriana y la actividad proteolítica es mayor, este comportamiento se asocia con las condiciones del cultivo y el metabolismo activo de las bacterias y, es posible comparar con el estudio realizado por Calero, Llanos, Villena, Quispe, Málaga y Cabrera (2015) en el que los aislados bacterianos termófilos *Bacillus licheniformis* y *Geobacillus thermoleovorans* degradaron caseína en concentración de 2,9 g/L y 1,5 g/L en tiempos de 51 y 52 horas de incubación respectivamente, registrando la máxima actividad proteolítica al final de la fase logarítmica y comienzo de la fase estacionaria, adicional a esto se determinó que los extractos proteolíticos actuaron a una temperatura óptima estimada de 57 °C y 64 °C, con un pH óptimo

alcalino de 7,7 y 8,0 respectivamente. Según autores como Banerjee y Ray (2017), la tasa de producción de enzimas microbianas depende en gran medida de diversos parámetros de cultivo como la temperatura, el pH, el contenido de humedad, el tamaño de los inóculos, la duración, la velocidad de agitación, los carbonos y las fuentes de nitrógeno, entre otros y, la optimización de estos factores es importante en respuesta a la mejora del producto, la rentabilidad y el tiempo.

Verificando las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia de residuos, el análisis de varianza (ANOVA multifactorial) de la actividad proteolítica resultó con valores-P menores que 0,05% que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores con un 95,0% de nivel de confianza. Los valores-P para los factores fueron: concentración de sustrato 0,0000, temperatura 0.0023 y tiempo 0,0017. Adicional a esto, el valor-P para la interacción temperatura-concentración es 0,0000. Para entender el efecto de los factores sobre la variable dependiente, se presentan los gráficos de interacciones obtenidos en el análisis de varianza (Figura 21, Figura 22, Figura 23).

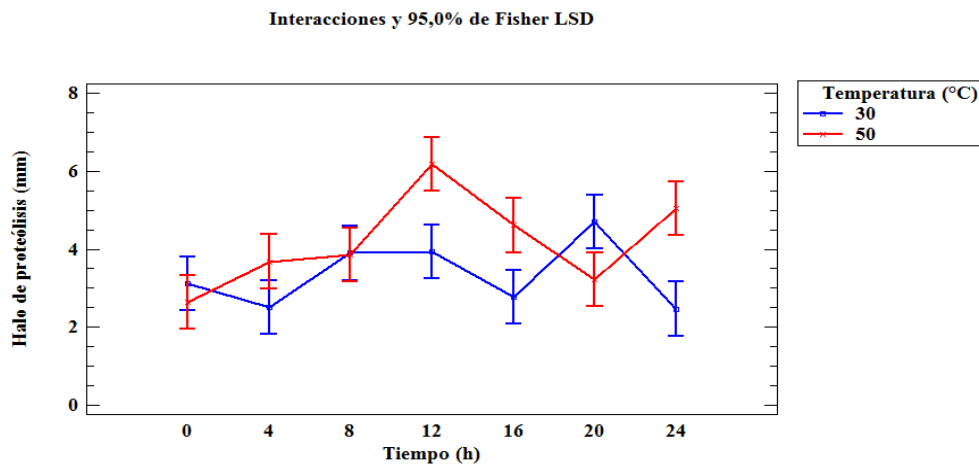


Figura 21. Gráfico de interacción temperatura-tiempo respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.

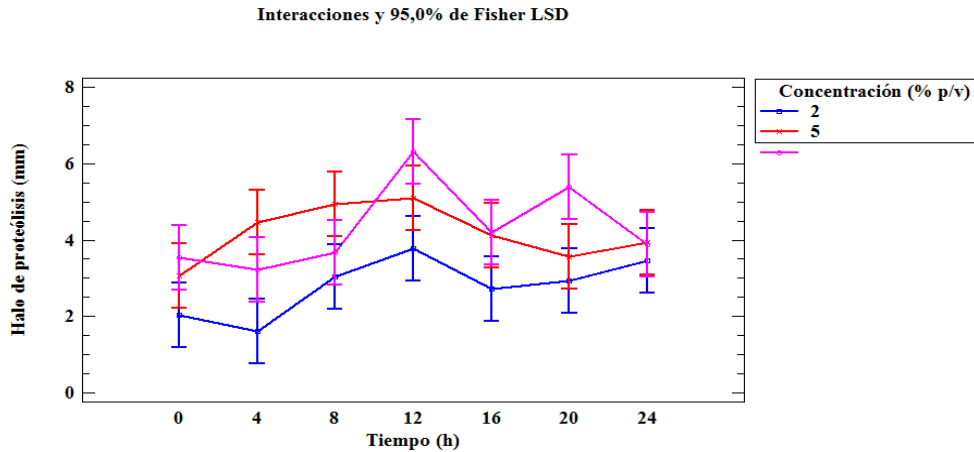


Figura 22. Gráfico de interacción concentración-tiempo respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.

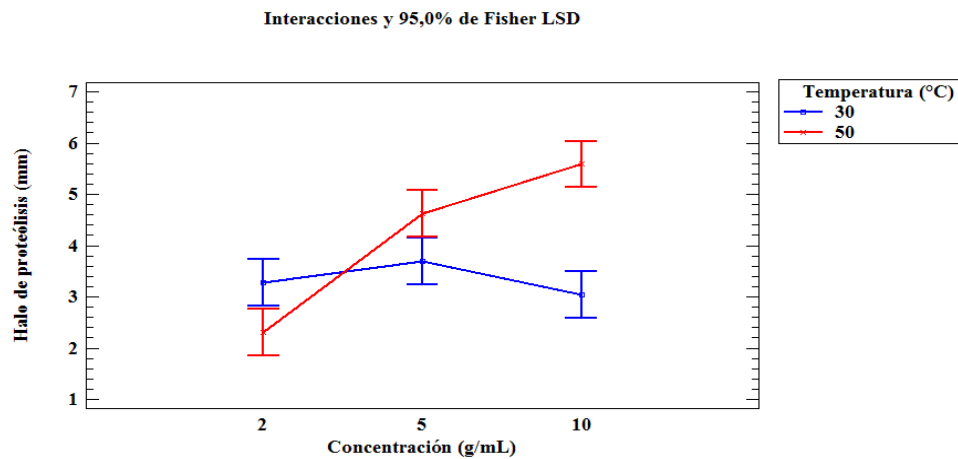


Figura 23. Gráfico de interacción temperatura-concentración respecto a la variable dependiente halo de proteólisis.

Aunque inicialmente a temperatura de 37 °C se exhibió la mejor actividad proteolítica de los aislados bacterianos, se seleccionó las temperaturas de 30 y 50 °C para observar el comportamiento de las proteasas con respecto al remanente de la industria láctea (suero) puesto que en temperatura de 30 °C se reduce la necesidad de consumo energético y a temperaturas

elevadas se mejora la solubilidad del sustrato, se disminuye la viscosidad, se limita los contaminantes microbianos y se reduce el tiempo de reacción, importante en los procesos biotecnológicos e industriales (Raddadi *et al.*, 2015). Es importante resaltar que, en el tiempo de crecimiento de 12 horas, la actividad proteolítica entendida como halo de proteólisis fue máxima tanto a temperatura de 50 °C y concentración de sustrato de 10 % p/v (Figura 21, Figura 22) en comparación a los tiempos entre 51 y 52 horas reportados por Calero *et al.*, 2015 o la actividad de la proteasa alcalina termófila extracelular obtenida de *Bacillus sp* que es máxima después de 25 horas de fermentación (Tavea, Fossi, Fabrice, Ngoune, y Ndjouenkeu, 2016). Aunque este comportamiento difiere según las condiciones de cultivo y los sustratos seleccionados, también se explica por las características genéticas de las especies bacterianas (Alrumman *et al.*, 2018; Tavea *et al.*, 2016).

El aislado bacteriano identificado como *Bacillus licheniformis* CCMMB885 exhibió actividad proteolítica en tiempos entre 12 y 20 horas en diferentes concentraciones de sustrato y temperatura (Figura 21, Figura 22), se observa que concentraciones de sustrato de 5 y 10 % p/v y temperatura de 50 °C le permitieron alcanzar la máxima producción de proteasas (Figura 23). Atendiendo estos factores, se reportan estudios de la actividad proteolítica de este microorganismo, es el caso de *Bacillus licheniformis* RBS 5 aislado de un manantial termal en Túnez, con capacidad amilolítica y proteolítica en el que la actividad de las proteasas fue óptima a 80 °C, pH 12 y con estabilidad en temperatura de 60 °C en el rango de pH entre 10 y 12 (Salem *et al.*, 2016). De igual manera en fuentes termales de Arabia Saudí se reportó la producción de proteasas por *Bacillus licheniformis* que actúan óptimamente a pH 8,5 y temperatura de 60 °C (Alrumman, *et al.*, 2018). Con base en esto, los resultados obtenidos en este estudio no difieren de investigaciones realizadas en otros países y se evidencia que *Bacillus licheniformis*

CCMMB885 posee potencial enzimático de importancia en los procesos biotecnológicos, ambientales e industriales (Alrumman *et al.*, 2018; Salem *et al.*, 2016; Mohammad *et al.*, 2017).

Desde otra perspectiva, el suero lácteo con proteína 2,72% fue un sustrato que permitió la expresión enzimática bacteriana, lo que concuerda con El-Gayar *et al.*, (2017) al referir que las proteasas son enzimas inducibles que necesitan un sustrato para alentar a la célula microbiana a producirla. El sustrato tuvo pH 5,65 considerado ácido pero próximo al valor de las condiciones de hidrólisis de suero lácteo reportadas, es decir, pH entre 6 y 8 y temperatura entre 40 y 60 °C útiles en la degradación del sustrato, considerado uno de los mayores contaminantes de la industria láctea o en el desarrollo de componentes nutricionales biológicamente activos (Dullius *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2019; Sinha, Radha, Prakash y Kaul, 2007). Al ser el suero lácteo el resultado de procesos como la producción de queso o coagulación de la leche, posee un alto valor nutricional y las proteínas son consideradas de alta calidad puesto que son ricas en aminoácidos esenciales para el hombre, aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos que contienen azufre que promueven la regulación metabólica y el plegamiento de proteínas; es así que el suero lácteo es fuente de péptidos bioactivos que se obtienen a través de hidrólisis enzimática de moléculas de proteínas completas (Da Silva, 2017; Dullius *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2019).

La hidrólisis de proteínas en suero lácteo se lleva a cabo mediante peptidasas ácidas y alcalinas, durante este proceso las proteínas se descomponen en péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos libres, como resultado de la escisión de los enlaces peptídicos (Da Silva, 2017; Mann *et al.*, 2019; Sinha *et al.*, 2007). Se ha observado que la hidrólisis ácida y alcalina tiende a ser un proceso difícil de controlar que muchas veces genera productos con cualidades nutricionales reducidas y otros procesos como la hidrólisis química genera sustancias tóxicas

como la lisino-alanina. En este sentido, el proceso de proteólisis en suero lácteo realizado por las bacterias termofílicas y el aislado identificado como *Bacillus licheniformis* CCMMB885, se convierte en una alternativa rentable y económicamente viable en la transformación de sustrato, la obtención de enzimas hidrolíticas o la producción de péptidos bioactivos que tienen beneficios para la salud en los sistemas inmunológico, cardiovascular, nervioso, gastrointestinal y de utilidad en los procesos biotecnológicos, ambientales e industriales (Ahmad *et al.*, 2018; Dullius *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2019).

8. Conclusiones

En la fuente termal “Jesús del Río”, Nariño, (Colombia), se logró aislar 18 bacterias con características diferenciales de las cuales el 55% manifestó actividad proteolítica. Las bacterias termófilas proteolíticas exhiben esta actividad en diferentes concentraciones de sustrato y temperatura.

Las bacterias termófilas con actividad proteolítica se identificaron en un 80% como *Bacillus licheniformis* y 20% *Bacillus sp.*, se determinó que presenta diferentes perfiles genómicos, así como también diferentes características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos.

El aislado bacteriano identificado como *Bacillus licheniformis* CCMMB885 tiene capacidad de transformar el sustrato suero lácteo y exhibe actividad proteolítica máxima en un tiempo de 12 horas, teniendo preferencia por concentración de sustrato de 10% p/v y temperatura de 50°C, convirtiéndolo en candidato potencial para procesos biotecnológicos, ambientales o industriales.

9. Recomendaciones

Realizar un proceso de aislamiento o utilizar otras técnicas que permita obtener un mayor número de especies bacterianas asociadas a las fuentes termales del volcán Chiles, Nariño, Colombia.

La diversidad fenotípica encontrada en este estudio fomenta a realizar nuevos trabajos para aplicaciones biotecnológicas, industriales y ambientales.

Verificar la actividad proteolítica del aislado bacteriano termófilo proteolítico en suero lácteo teniendo en cuenta otros factores como el pH, distintos nutrientes, concentración de iones metálicos, entre otros.

10. Aportes

Aislamiento y obtención de cultivos axénicos de bacterias termófilas provenientes de la fuente termal “Jesús del Río”, Nariño, Colombia.

Realización de un banco de células primarias con futuro uso biotecnológico, ambiental o industrial.

Bacterias identificadas según gen 16S rRNA, usando información de bases de datos actualizadas. Datos de secuenciación sometidos y publicados en el Genbank.

En el departamento de Nariño se realizó identificación de una especie bacteriana termófila con actividad proteolítica con potencial uso en áreas de descontaminación ambiental y transformación de residuos provenientes de la industria láctea.

11. Referencias

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibjibijen, J. y Amar, M. (2015). Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 443–453. Doi: 10.1590/S1517-838246220140219
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M. y Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 79(3), 321-328.
- Ahmad, M. S., AbdEl-Salam, B. A., Yaser, M. M. y Taha, S. S. (2018). Optimization and characterization of bacterial proteinase enzyme using whey as a fermentation medium. *Metabolism*, 4, 5.
- Alrumman, S., Mostafa, Y. S. M., Al-Qahtani, S., y Taha, T. H. T. (2018). Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sciences*, 13(1), 470-480.
- Armesto, D. F. T., García, L. A. G., Correa, D. A. y Bello, J. A. M. (2016). Biotratamientos de aguas residuales en la industria láctea. *Producción + limpia*, 11(1), 171-184.
- Banerjee, G., y Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143. Doi: 10.1080/02648725.2017.1408256
- Boteva, N. y Kambourova, M. (2018). Thermophiles and their exploration for thermostable enzyme production. *Extremophiles in Eurasian Ecosystems, Ecology, Diversity, and Applications* (pp. 167-186). Springer, Singapore. Doi: 10.1007/978-981-13-0329-6_6

- Burbano, E., Caetano, B., Otero, I. y Álvarez, S. (2016). *Manual de biología molecular - Procedimientos básicos*. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño.
- Cabrera, A., y Díaz, R. (2003). *Aislamiento y caracterización parcial de bacterias termófilas amilolíticas de las fuentes termales del volcán Chiles departamento de Nariño*. (Tesis de pregrado). Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.
- Calero, A. J. N., Llanos, A. Z. Z., Villena, C. I. F., Quispe, I. J. S., Málaga, H. B. Z y Cabrera, R. C. (2015). Caracterización de dos bacterias termófilas (BP-2 Y BP-4) con capacidad proteolítica aislados en los géiseres de Candarave. Tacna-Perú. *Ciencia & Desarrollo*, (19), 49-53.
- Campbell, R., (2005). *Ecología microbiana*. México, Limusa. Vol 2. 268 p.
- Chong, P. L.-G., Ayesa, U., Prakash Daswani, V., y Hur, E. C. (2012). On physical properties of tetraether lipid membranes: Effects of cyclopentane rings. *Archaea*. Doi: 10.1155/2012/138439
- Da Silva, R. R. (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(1), 1-19.
- Daniel, R. M. y Cowan, D. A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57(2), 250–264.
- De Castro, M. E., Rodríguez, B. E., y González, S. M. I. (2016). Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozyms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1521. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01521

- Dullius, A., Goettert, M. I. y De Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58–74. Doi: 10.1016/j.jff.2017.12.063
- Dumorné, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., y Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol*, 27(4), 649-659.
- El-Gayar, K. E., Al Abboud, M. A., y Essa, A. M. (2017). Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 743-753.
- Gómez, G. J. A. (2008). *Caracterización cinética y enzimática de Thermoanaerobacter italicus cepa usba 18 aislada de un manantial termomineral en Paipa, Boyacá*. (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Gomri, M. A., Rico-Díaz, A., Escuder-Rodríguez, J.-J., El Moulouk Khaldi, T., González-Siso, M.-I., y Kharroub, K. (2018). Production and characterization of an extracellular acid protease from Thermophilic *Brevibacillus* sp. OA30 isolated from an Algerian Hot Spring. *Microorganisms*, 6(2), 31. Doi: 10.3390/microorganisms6020031
- Haki, G. D. y Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Lane D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. Oodfellow, M. (Ed). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. England: John Wiley & Sons, Chichesters, p. 115-163.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H y Stahl, D. A. (2015). *Brock, Biology of microorganisms*. 14 Edition. Southern Illinois University Carbondate: Pearson Educación.
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R. y Sarkar, P. (2019). Bioactive Peptides from Whey Proteins. *Whey Proteins*, 519–547. Doi: 10.1016/b978-0-12-812124-5.00015-1
- Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., y Sharma, A. K. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, 6(1), 81.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., y Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International journal of microbiology*. Doi: 10.1155/2017/6943952
- Molina, M. y David, F. (2017). *Identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal “Chachimbiro” mediante técnicas microbiológicas y moleculares*. (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador.
- Mótyán, J. A., Tóth, F., y Tózsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3(4), 923–942. Doi: 10.3390/biom3040923
- Muñoz, G. K. B. (2015). *Estudio de factibilidad del montaje de una planta de derivados lácteos en el municipio de La Cruz (Nariño)*. (Tesis de posgrado), Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Colombia.

- Palladino, M. A., Spencer, C. A., Cummings, M. R., y Klug, W. S. (2015). *Concepts of Genetics*. 11 Edition. Pearson Higher Education.
- Patwardhan, A., Ray, S., y Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*. *Biol*, 2-131. Doi: 10.4172/2329-9002.1000131
- Pedroza, A., Quevedo, B. y Matiz, A. (2007). *Manual de laboratorio de procesos biotecnológicos*. Bogotá, Colombia: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Posada, Y., Agudelo, A., Álvarez, E., Díaz, C., Joulían, C., Ollivier, B., y Baena, S. (2004). Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyacá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(2), 90-99.
- Poutou, R., Martínez, E. y Frontela, M. (1994). *Banco de células primario (bcp): caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes*. Centro de ingeniería, genética y biotecnología. La Habana, Cuba: Biotecnología aplicada, 11(1).
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., y Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 7907-7913.
- Ranawat, P. y Rawat, S. (2017). Stress response physiology of thermophiles. *Microbiology*. 199 (3), 391-414. Doi: 10.1007/s00203-016-1331-4.

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., y Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635.
- Rivas, P. R. G. (2017). *Aislamiento e identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal “Aguas Hediondas”, ubicada en la provincia Carchi, cantón Tulcán, Ecuador.* (Tesis de pregrado), Universidad de las Fuerzas Armada ESPE, Ecuador.
- Rubiano, L. C. (2006). *Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de Paipa e Iza Boyacá.* (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Sahay, H., Yadav, A. N., Singh, A. K., Singh, S., Kaushik, R., y Saxena, A. K. (2017). Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. *3 Biotech*, 7(2), 118. Doi: 10.1007/s13205-017-0762-1
- Salem, R. B., Abbassi, M. S., Cayol, J. L., Bourouis, A., Mahrouki, S., Fardeau, M. L y Belhadj, O. (2016). Thermophilic *Bacillus licheniformis* rbs 5 isolated from hot tunisian spring co-producing alkaline and thermostable [alpha]-amylase and protease enzymes. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(6), 557.
- Sarmiento, F., Peralta, R., y Blamey, J. M. (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 148.

- Sen, S. K., Raut, S., Satpathy, S., Rout, P. R., Bandyopadhyay, B., y Das Mohapatra, P. K. (2014). Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani Hot Spring, Odisha, India. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(12), e11800. Doi: 10.5812/jjm.11800
- Servicio Geológico Colombiano. (2017). *Inventario Nacional de Manifestaciones Hidrotermales*. Recuperado de: <http://www.sgc.gov.co/>
- Singleton, R., y Amelunxen, R. E. (1973). Proteins from thermophilic microorganisms. *Bacteriological Reviews*, 37(3), 320–342.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chemistry*, 101(4), 1484–1491. Doi: 10.1016/j.foodchem.2006.04.021
- Tavea, F., Fossi, B. T., Fabrice, N. T., Ngoune, L. T y Ndjouenkeu, R. (2016). Production and Partial Characterization of an Extracellular Thermophile Alkaline Protease from a Selected Strain of Bacillus sp Isolated from Abattoir Soil in the North Region of Cameroon. *J Bioprocess Biotech*, 6(279), 2.
- Vargas, K. G., y Martínez, A. B. (2017). Codigestión anaerobia de aguas residuales de la industria láctea y lodos residuales para la recuperación de efluentes y biogás. *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 1273-1277.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. y Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell Biol.* 5: 25-40.

Vieille, C., y Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43. Doi: 10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001

Ward, D. E., Shockley, K. R., Chang, L. S., Levy, R. D., Michel, J. K., Connors, S. B., y Kelly, R. M. (2002). Proteolysis in hyperthermophilic microorganisms. *Archaea*, 1(1), 63–74

12. Anexos

A. Medida del halo de proteólisis (mm) de los aislados que presentaron actividad proteolítica en agar leche semidescremada 1% p/v.

Tabla 4

Actividad proteolítica en agar leche semidescremada 1 % p/v.

Aislado	Réplica 1					Réplica 2					Réplica 3				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
LB 302-3	0	0	0	0	0	4,11	6,06	5,79	6,8	4,72	5,42	3,04	2,11	2,65	1,14
102-2 A	7,21	7,91	0	0	0	6,28	5,89	3,05	4,59	4,26	5	5,3	2,96	2,5	6,5
102-2 B1	0	0	0	0	0	6,77	6,28	6,16	6,22	3,61	4,75	2,7	3,91	3,84	4,81
LB 102-1	0	0	0	0	0	3,67	5,16	0,09	5,12	5,88	3,35	4,47	4,99	4,97	6,04
LB 302-2 A	3,24	4,77	3,73	3,95	4,77	5,71	4,68	4,98	6,01	4,65	5,93	5,35	6,79	6,8	6,87
LB 302-2 B	4,93	3,57	5,35	0	0	4,15	5,92	4,79	6,66	6,54	11,21	6,92	8,89	5,9	3,45
102-2 B2	5,09	5,7	3,5	3,26	3,84	7,45	6,37	5,8	6,07	5,81	5,2	6,47	5,92	6,62	6,39
102-2 C	8,26	5,25	5,58	5,42	6,98	4,39	3,86	4,43	3,33	3,41	8,34	5,81	5,07	5,85	6,43
302-2	4,77	4,6	5,57	3,15	2,68	5,52	3,67	3,45	3,69	4,08	29,21	1,81	8,51	0	0
303-1 B	6,74	4,22	3,17	4,73	3,07	12,27	4,49	11,64	8,98	15,14	13,17	3,6	7,56	2,39	1,4

Medida del halo de proteólisis (mm) de los aislados que presentaron actividad proteolítica en agar leche semidescremada 1% p/v. En la tabla se observa que para cada aislado se realizó tres réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas.

B. ANOVA para Halo de proteólisis (mm) por Aislado bacteriano.

Tabla 5

ANOVA para Halo de proteólisis (mm) por Aislado bacteriano.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	365,532	9	40,6147	2,98	0,0028

Intra grupos	1909,6	140	13,64
Total (Corr.)	2275,13	149	

La razón-F, que en este caso es igual a 2,97762, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Halo de proteólisis (mm) entre un nivel de Aislado bacteriano y otro, con un nivel del 5% de significación.

C. Medida de halo de proteólisis de 5 aislados bacterianos con respecto a los factores concentración de sustrato y temperatura.

Tabla 6

Medida de halo de proteólisis (mm) con respecto a los factores concentración de sustrato y temperatura.

Aislado bacteriano	Temperatura °C	Concentración de agar leche semidescremada								
		2% p/v			5% p/v			10% p/v		
LB 302-2 A	30	11,63	12,84	12,91	13,75	16,4	13,37	14,19	14,7	18,89
LB 302-2 B	30	8,31	7,52	10,7	11,49	10,22	10,17	10,27	8,53	8,94
102-2 B2	30	8,86	10,56	8,71	9,59	10,14	9,44	11,22	9,3	6,59
102-2 C	30	10,72	6,82	7,76	10,51	10,37	7,88	8,73	7,98	8,65
303-1 B	30	7,04	7,44	6,83	9,47	11,2	9,52	12,64	8,71	8,56
LB 302-2 A	37	14,98	20,84	23,51	16,87	16,08	18,68	18,5	16,41	17,53
LB 302-2 B	37	9,11	10,43	12,79	20	20	20	11,15	12,99	14,73
102-2 B2	37	8,03	5,81	7,37	8,25	8,71	9,3	12,79	9,3	10,57
102-2 C	37	7,92	7,62	8,87	10,41	11,25	13,46	11,25	17,56	11,69
303-1 B	37	6,32	7,45	7,96	14,07	16,21	11,87	8,91	12,57	11,47
LB 302-2 A	50	10,74	9,73	0	7,71	0	0	0	0	0
LB 302-2 B	50	6,21	8,9	9,06	13,06	8,07	12,46	11,71	9,84	7,69
102-2 B2	50	11,98	11,62	12,13	15,06	10,09	15,3	15,09	15,76	15,57
102-2 C	50	11,12	10,44	7,38	7,98	8,89	8,26	9,55	8,45	10,19
303-1 B	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D. Análisis de Varianza para Halo de proteólisis de la actividad proteolítica de 5 aislados bacterianos.

Tabla 7

Análisis de Varianza para Halo de proteólisis - Suma de Cuadrados Tipo III de la actividad proteolítica por 5 aislados bacterianos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Concentración	71,0938	2	35,5469	7,35	0,0010
B: Temperatura	706,093	2	353,046	72,96	0,0000
C: Tipo de aislado bacteriano	462,512	4	115,628	23,90	0,0000
Interacciones					
AB	62,4267	4	15,6067	3,23	0,0153
AC	140,862	8	17,6078	3,64	0,0009
BC	1288,15	8	161,019	33,28	0,0000
Residuos	512,905	106	4,83873		
Total (corregido)	3244,04	134			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Halo de proteólisis en contribuciones debidas a varios factores (concentración de sustrato y temperatura). Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 6 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de proteólisis con un 95,0% de nivel de confianza.

E. Medidas de absorbancia en longitud de onda 595 nm de las concentraciones $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la dilución suero lácteo para realizar la curva de calibración para proteínas.

Tabla 8

Medidas de absorbancia (595 nm) para concentraciones de suero lácteo ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

Concentración $\mu\text{L}/\text{mL}$	Absorbancia 595 nm
100	0,414
200	0,541
300	0,696
400	0,992
500	1,287
600	1,433
700	1,582
800	1,674
900	1,702
1000	1,831

F. Análisis de varianza de la curva de calibración de proteínas.

Tabla 9

Análisis de varianza de la curva de calibración de proteínas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,38696E6	1	2,38696E6	61,48	0,0000
Residuo	349400,	9	38822,2		
Total (Corr.)	2,73636E6	10			

Coefficiente de Correlación = 0,933977

R-cuadrada = 87,2312 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 85,8125 por ciento

Error estándar del est. = 197,034

Error absoluto medio = 148,7

Estadístico Durbin-Watson = 0,842904 (P=0,0041)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,293798

G. Medida de halo de proteólisis con respecto a los factores concentración de sustrato, temperatura y tiempo de la actividad proteolítica del aislado LB 302-2 A en suero lácteo.

Tabla 10

Medida de halo de proteólisis (mm) con respecto a los factores concentración de sustrato, temperatura y tiempo.

Tiempo (h)	Temperatura	Concentración agar leche			Temperatura	Concentración agar leche		
	°C	semidescremada			°C	semidescremada		
		2% p/v	5% p/v	10% p/v		2% p/v	5% p/v	10% p/v
0	30	2,25	3,96	3,63	50	0,65	2,21	5,05
0	30	3,31	4,01	1,51	50	1,93	2,09	3,97
4	30	2,02	4,67	2,14	50	0,87	6,12	2,58
4	30	1,82	3,535	0,86	50	1,7	3,51	4,94
8	30	3,42	4,82	3,85	50	1,03	3,17	3,23
8	30	5,16	3,27	2,86	50	2,54	8,44	4,69
12	30	4,61	3,52	3,87	50	3,03	6,89	8,89
12	30	3,67	4	3,92	50	3,74	5,95	8,53
16	30	3,35	3,61	1,87	50	3,07	3,65	7,75
16	30	2,45	4,22	1,09	50	2,05	5	6,13
20	30	2,91	3,15	8,18	50	2,97	3,58	3,47
20	30	4,05	4,19	5,73	50	1,82	3,3	4,15
24	30	3,04	2,58	1,5	50	3,97	6,34	6,43
24	30	3,9	2,25	1,54	50	2,92	4,56	6,05

H. Análisis de varianza de la actividad proteolítica del aislado bacteriano LB 302-2 A en suero lácteo con respecto a los factores concentración de sustrato, temperatura y tiempo.

Tabla 11

Análisis de Varianza para Halo de proteólisis - Suma de Cuadrados Tipo III para la actividad proteolítica en suero lácteo.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Tiempo	35,3129	6	5,88549	4,14	0,0017
B: Temperatura	14,6042	1	14,6042	10,28	0,0023
C: Concentración	39,2348	2	19,6174	13,81	0,0000
Interacciones					
AB	41,9606	6	6,99344	4,92	0,0004
AC	21,2152	12	1,76794	1,24	0,2784
BC	43,5697	2	21,7848	15,34	0,0000
Residuos	76,6992	54	1,42035		
Total (corregido)	272,597	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 5 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Halo de proteólisis con un 95,0% de nivel de confianza.