



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento De Ciencias Químicas

“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SAL Y LA
TEMPERATURA EN LA FISIOLOGÍA Y EN EL
PROTEOMA DEL EXTREMÓFILO *VIBRIO* sp.
AISLADO DESDE EL SALAR DE ATACAMA”

Memoria para optar al grado de Magíster en Ciencias Mención Química

KAREM DANIELA GALLARDO ALCAYAGA

Tutor: Dr. Francisco Remonsellez
Co-tutor: Dra. Cecilia Demergasso

Antofagasta, Chile
2011

DEDICATORIA

Durante estos tres años pude tener gratas vivencias, momentos de éxitos y también de angustias para poder cumplir mis objetivos y así poder alcanzar uno de mis más grandes anhelos, culminar mi grado académico. Los deseos de superarme y de lograr mi meta eran tan grandes que logré vencer todos los obstáculos, y es por ello que debo dedicar este triunfo a quienes en todo momento me llenaron de amor y apoyo, y por sobre todo me brindaron su amistad:

Primero que todo a Dios, que sin Él nada hubiese logrado, porque me ama y me ha permitido llegar hasta donde estoy, quién me da la fuerza para luchar día a día para obtener éxitos y ver los frutos de ello, Él es mi guía y dueño de mi vida y quién será por siempre el primero en mi corazón.

A mis padres, Norberto y Marina, por confiar en mis decisiones, que sin su apoyo y constante amor este éxito no tendría significado alguno, que son mis primeros educadores y de los cuales estoy muy orgullosa, agradecida, y siempre los amaré, junto a mi hermana Andrea y mis sobrinos Ignacio y Agustina, que me han llenado la vida de felicidad y me han entregado siempre una caricia, un beso y un te quiero.

A mi esposo Rodrigo, que siempre me ha apoyado y me ha hecho sentir que soy exitosa y que lo tengo todo, de quien estoy muy agradecida porque no pasa un día en el que no me dé un te amo, y siempre me está regalando una sonrisa como mostrándome que la vida es lo más hermoso que existe.

A Claudia, que ha sido mi amiga del alma, quién siempre me ha dado fortaleza, consuelo, alegrías y sobretodo apoyo en todos los momentos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi director de Tesis, Dr. Francisco Remonsellez, por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su persistencia, su motivación y por sobretodo su paciencia, las cuales han sido fundamentales para mi formación como investigador. También me gustaría agradecer a la Dra. Cecilia Demergasso, quién ha sido mi co-tutor y la persona que me ha facilitado todo lo necesario para poder realizar mi trabajo de investigación, y porque siempre ha tenido una buena disposición para atenderme y me ha apoyado en todo lo que me he propuesto.

Al Centro de Biotecnología Profesor Alberto Ruiz de la Universidad Católica del Norte, por permitir la realización práctica de mi investigación, y a todos quienes trabajan en este laboratorio, por la disponibilidad, la enseñanza y el apoyo constante que me entregaron. Especialmente estaré eternamente agradecida de mis compañeras y amigas de laboratorio, Pierina, Karina, Lorena y Dayana, quienes creaban un ambiente de trabajo simplemente perfecto, su visión, motivación y optimismo me han ayudado en momentos muy críticos de la Tesis.

A los profesores del departamento de Química que me brindaron su apoyo y que han sido formadores en mi vida universitaria.

A Conicyt por la beca de magíster nacional otorgada.

Y finalmente a la Universidad Católica del Norte por acogerme y entregarme todas las herramientas necesarias para la formación de mi grado académico de Magíster.

RESUMEN

Los halotolerantes son microorganismos que pueden tolerar y crecer en ausencia de sal y en altas concentraciones de la misma. En general, los microorganismos halotolerantes utilizan algunos mecanismos fisiológicos tales como la pigmentación, la composición lipídica, la acumulación de compuestos osmoprotectores, la movilidad y la síntesis de flagelo para enfrentar el estrés osmótico. Por otro lado, los microorganismos psicrófilos son capaces de crecer a bajas temperaturas (alrededor de los 0 °C). Estos microorganismos presentan mecanismos de adaptación en macromoléculas como proteínas, lípidos celulares y también relacionado con la captación de solutos a través de sus lípidos de membrana.

Actualmente, solo un pequeño número de los microorganismos que habitan en los Salares del Norte de Chile han sido aislados y caracterizados. La mayoría de los mecanismos de adaptación a altas concentraciones de sal se han descrito en microorganismos aislados desde ambientes marinos. Por lo tanto, se conoce muy poco sobre los mecanismos fisiológicos de respuesta al estrés osmótico en psico- y halotolerantes aislados desde Salares. Es por ello que en este estudio se planteó como objetivo determinar los efectos de la concentración de sal y la temperatura en respuestas fisiológicas como el crecimiento, la movilidad, la pigmentación, los ácidos grasos y la expresión global de proteínas en una cepa bacteriana perteneciente al género *Vibrio* aislada desde el Salar de Atacama. Para ello se utilizaron técnicas de cultivo, además se realizaron ensayos de movilidad en placas con medio de cultivo definido sólido, técnica de cromatografía gaseosa (enviados a la Universidad Católica de Temuco) para identificar los ácidos grasos y cuantificar en porcentaje su presencia, finalmente se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional de proteínas y tinciones de plata y coomassie.

Estudios de crecimiento en diferentes condiciones revelaron que esta especie de *Vibrio* fue capaz de crecer en presencia de concentraciones de hasta 100 g/L de NaCl, como también en ausencia de esta sal. Además, el microorganismo toleró un amplio rango de temperaturas comprendido entre 4 y 49 °C, que se alcanzó en presencia de 25 g/L de NaCl. Por otro lado, se detectó la producción de un pigmento rojo, presumiblemente de la familia de los Prodiginines, la cual se genera de manera dependiente de la concentración de sal y la temperatura de cultivo. Se determinó además, que el microorganismo presenta movilidad dependiente de la concentración de sal, lo cual se correlaciona con la aparición de un único flagelo polar cuya presencia ha sido determinada mediante microscopía electrónica de transmisión. Finalmente, con el fin de encontrar nuevos mecanismos de adaptación a la sal se utilizaron herramientas de expresión de proteínas en geles de poliacrilamida. Mediante

SDS-PAGE se detectó la sobreexpresión de un grupo de proteínas de a los 40 y 60 KDa en células expuestas a la presencia de sal, lo cual fue corroborado mediante electroforesis bidimensional de proteínas, en el que se identificaron 3 proteínas sobreexpresadas, P40, P60 y P70. Estas tres proteínas fueron identificadas desde extractos provenientes de cultivos de *Vibrio sp.* crecidos con 25 g/L de NaCl. Asimismo, se identificó una proteínas sobreexpresada, P50, de un extracto cuyo cultivo de *Vibrio sp.* fue crecido en ausencia de sal. Para realizar la electroforesis bidimensional se utilizaron en la primera dimensión tiras IPG de un rango de pH 3-10, interesantemente, todas las proteínas identificadas (P40, P50, P60, P70) en ambas condiciones de estrés (presencia y ausencia de sal) aparecieron en un rango de pH ácido. En conclusión, nuestros resultados respaldan la hipótesis de que el microorganismo *Vibrio sp.* es un psicro- y halotolerante, capaz de crecer en un amplio rango de sal y temperatura, generando una amplia gama de respuestas fisiológicas frente al estrés osmótico.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	10
INTRODUCCIÓN	12
I. EXTREMÓFILOS: Halófilos y Psicrófilos	14
I.1 Definición de extremófilo.....	14
I.2 Hábitats de extremófilos	14
II. MICROORGANISMOS HALÓFILOS	16
II.1 Respuesta al estrés osmótico	17
II.1.1 Compuestos osmoprotectores	17
II.1.2 Composición lipídica de las membranas	18
II.2 Enzimas.....	19
II.3 Pigmentación	19
II.4 Biotecnología.....	21
III. MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS	23
III.1 Definición.....	23
III.2 Clasificación	23
III.3 Características de crecimiento y adaptación al frío	23
III.3.1 Enzimas	23
III.3.2 Membranas	24
III.4 Potencial Biotecnológico	24
IV. PROTEÓMICA	25
V. MICROORGANISMOS DEL GÉNERO <i>Vibrio</i>.....	26
V.1 Descripción General.....	26
V.2 Composición lipídica	26
Estudio realizado por Lambert y col., en 1983, en el que muestra los porcentajes de ácidos grasos encontrados en las distintas especies de la familia <i>Vibrionaceae</i> . ^a corresponde el número de la izquierda indica la cantidad de átomos de carbono, y el número de la derecha indica la cantidad de dobles enlaces. Un, indica los ácidos grasos no identificados. Δ^9 , Δ^{11} y Δ^{12} , indican las formas <i>cis</i> de isómeros con el doble enlace en las posiciones 9-10, 11-12 y 12-13; ^b indica los valores en porcentajes de todos los ácidos grasos; - ácidos grasos no detectados; + ácidos grasos detectados no cuantificados; ^c valores cercanos al 1% de ácidos grasos 14:1 fueron encontrados en todos los cultivos; ^d valores que incluyen el porcentaje total de ambos isómeros de 17:1.....	27
V.3 Movilidad	27
V.4 Regulación Frente al Estrés.....	28
V.4.1 Efecto de la temperatura	28
V.4.2 Regulación frente al estrés osmótico	28

V.5 Pigmentación	29
V.6 Proteómica.....	29
V.7 Microorganismo en estudio, <i>Vibrio sp.</i>	29
VI. HIPÓTESIS DE TRABAJO	31
VII. OBJETIVOS	32
VII.1 Objetivo General	32
VII.2 Objetivos Específicos	32
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
VIII.1 Cepas y condiciones de cultivo	33
VIII.2 Adaptación inmediata de <i>Vibrio sp.</i> a la sal.....	33
VIII.3 Identificación de condiciones óptimas de crecimiento de <i>Vibrio sp.</i>.....	33
VIII.4 Efecto de la concentración de NaCl en la movilidad de <i>Vibrio sp.</i>	34
VIII. 5 Microscopía electrónica de transmisión	34
VIII.6 Determinación de ácidos grasos	34
VIII. 7 Métodos de análisis de proteínas	35
VIII.7.1 Obtención de pellet celular	35
VIII.7.2 Obtención de extracto de proteínas para gel monodimensional SDS-PAGE	35
VIII.7.3 Obtención de extracto de proteínas para gel bidimensional (2DE)	35
VIII.7.4 Cuantificación de Proteínas	36
VII.7.5 Precipitación con fenol.....	36
VII.7.6 Geles monodimensional SDS-PAGE	36
VIII.7.7 Electroforesis bidimensional de proteínas (2DE).....	37
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
IX.1 Obtención de cultivos de <i>Vibrio sp.</i> aislados desde el Salar de Atacama	40
IX.2 Obtención de condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo <i>Vibrio sp.</i>.....	41
IX.2.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento del <i>Vibrio sp.</i>	41
IX.2.2 Efecto de la sal en el crecimiento del <i>Vibrio sp.</i>	43
IX.3 Adaptación inmediata del microorganismo <i>Vibrio sp.</i>	46
IX.4 Efecto de la concentración de NaCl en la movilidad del <i>Vibrio sp.</i>.....	47
IX.4.1 Efecto de la salinidad en la movilidad del <i>Vibrio sp.</i> crecido a 30 °C.....	47
IX.4.2 Efecto de la salinidad en la movilidad del <i>Vibrio sp.</i> a bajas temperaturas.....	50
IX.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	52
IX.6 Efecto de la concentración de NaCl en la pigmentación del <i>Vibrio sp.</i>.....	55
IX.6.1 Efecto de la salinidad en la pigmentación del <i>Vibrio sp.</i> a 30 °C.	55
IX.6.2 Efecto de la temperatura en la pigmentación del <i>Vibrio sp.</i>	56
IX. 7 Determinación de ácidos grasos en <i>Vibrio sp.</i>	57
X.8 Expresión global de proteínas en <i>Vibrio sp.</i>.....	59

X. CONCLUSIONES.....	70
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	71
XII. ANEXO: ABREVIATURAS	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipo de prodigininas y las bacterias que lo producen	20
Tabla 2: Aplicaciones industriales de las enzimas provenientes de psicrófilos	24
Tabla 3: Estudio de ácidos grasos en especies de la familia <i>Vibrionaceae</i>:	27
Tabla 4: Características fisicoquímicas de la zona de muestreo.....	30
Tabla 5: Constante de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>Vibrio sp.</i>.....	46
Tabla 6: ácidos grasos obtenidos de <i>Vibrio sp.</i>	58

INDICE DE ILUSTRACIONES

Fig. 1: Crecimiento del microorganismo <i>Vibrio sp.</i> en medio líquido y sólido.....	40
Fig. 2: Crecimiento del microorganismo <i>Vibrio sp.</i> en medio definido líquido y sólido.....	41
Fig. 3: Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>Vibrio sp.</i>	42
Fig. 4: Adaptación de <i>Vibrio sp.</i> a distintas concentraciones de NaCl.	44
Fig. 5: Curva de crecimiento del microorganismo <i>Vibrio sp.</i> crecido en medio líquido definido con distintas concentraciones de NaCl y a 30 °C.....	45
Fig. 6: Curva de crecimiento de <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de NaCl y traspasado a distintas concentraciones de NaCl y a 30 °C.	47
Fig. 7: Movilidad tipo “Swarming” de <i>Vibrio sp.</i> a las 72 horas de crecimiento.. ...	48
Fig. 8: Movilidad tipo “Swimming” en <i>Vibrio sp.</i>	49
Fig. 9: Ensayos de movilidad tipo “swimming” en <i>Vibrio sp.</i> no adaptado a crecer en presencia de sal.....	50
Fig. 10: Movilidad tipo “swimming” en <i>Vibrio sp.</i> , adaptado a 17 °C.....	51
Fig. 11: Imagen obtenida de <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de NaCl mediante TEM.....	52
Fig. 12: Imagen obtenida de <i>Vibrio sp.</i> crecido en presencia de NaCl mediante TEM.....	54
Fig. 13: Efecto de la concentración de NaCl en la pigmentación del <i>Vibrio sp.</i> a 30 °C.	55
Fig. 14: Efecto de sales sin iones cloruro en la pigmentación del <i>Vibrio sp.</i> a 30 °C	56
Fig. 15: Efecto de la temperatura en la pigmentación de <i>Vibrio sp.</i>	57
Fig. 16: Perfil de proteínas de <i>Vibrio sp.</i> en un gel SDS-PAGE.	60
Fig. 17: Gel 2DE teñido con plata de un extracto de proteínas precipitado con fenol ácido desde un cultivo de <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de sal.	62

Fig. 18: Gel 2DE teñido con plata de un extracto de proteínas tratado con microcolumnas desaladoras desde un cultivo de <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de sal.	63
Fig. 19: Gel 2DE de un extracto de proteínas de un <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de sal cargando la muestra directamente para su focalización, y teñido con plata.....	64
Fig. 20: Gel 2DE teñido con Coomassie G-250 de 2000 µg un extracto de proteínas sin tratamiento de <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de NaCl..	66
Fig. 21: Gel 2DE teñido con Coomassie G-250 de 2000 µg de un extracto de proteínas sin tratamiento de <i>Vibrio sp.</i> crecido en presencia de 25 g/L NaCl..	67
Fig. 22: Gel 2DE teñido con Coomassie G-250 de 2000 µg de un extracto de proteínas sin tratamiento de <i>Vibrio sp.</i> crecido en ausencia de NaCl.	68

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunas décadas ha quedado demostrado que algunas comunidades microbianas pueden ser encontradas en condiciones extremas, incluyendo temperaturas, presión, salinidad y pH. A estos microorganismos se les conoce como extremófilos (Van den Burg, 2003). Se han descrito una amplia cantidad de ambientes extremos donde se ha detectado vida, debido a las alternativas que existen actualmente para detectar microorganismos (Gómez and Steiner, 2004).

Generalmente los microorganismos extremófilos viven en ambientes que presentan una combinación de condiciones extremas, como por ejemplo baja temperatura y alta presión, o baja temperatura y alta concentración de sal (Feller and Gerday, 2003; Deming, 2002). Los extremófilos se encuentran estructurados a nivel fisiológico y molecular para poder superar estas condiciones, lo que se refleja en que ofrecen nuevas oportunidades de biocatálisis y biotransformación con potencialidad para ser aplicadas a diversos procesos industriales (Feller and Gerday, 2003).

Dentro de los microorganismos extremófilos se encuentran los psicrófilos, lo cuales se definen como microorganismos capaces de adaptarse y crecer a bajas temperaturas (Feller and Gerday, 2003). La adaptación fisiológica de los psicrófilos frente a bajas temperaturas es el resultado de las características únicas en sus membranas y estructuras de proteínas. Además las membranas parecen incorporar lípidos específicos para mantener la fluidez y la capacidad crítica para el transporte de nutrientes y sustratos a bajas temperaturas (Feller and Gerday, 2003). También dentro de los extremófilos están los halófilos y halotolerantes, los primeros se caracterizan por crecer en presencia de altas concentraciones de sal (por ejemplo KCl o NaCl), y los segundos se caracterizan porque a pesar de que habitualmente viven en ausencia de sal, son capaces de crecer en presencia de ella (Soria, 2004). Los microorganismos halófilos y halotolerantes presentan diversas adaptaciones fisiológicas que les permiten responder frente al estrés osmótico. Una de estas adaptaciones es la composición lipídica de las membranas celulares, donde se incluyen modificaciones en los fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (Russell, 1993). Otra de las adaptaciones de estos microorganismos se basa en la acumulación masiva de compuestos iónico o no iónicos en el citoplasma, estos compuestos mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular (Brown, 1976).

El uso de enzimas de organismos mesófilos como biocatalizadores para la formación de varios productos con aplicaciones industriales han sido estudiados ampliamente, pero la aplicación de estas enzimas está limitado por la

estabilidad de las macromoléculas en condiciones extremas de temperaturas, pH y fuerza iónica. Los microorganismos extremófilos son una potente fuente de extremoenzimas, los cuales muestran un alto grado de estabilidad bajo condiciones extremas (Feller and Gerday, 2003). La mayoría de los extremófilos identificados y caracterizados pertenecen al dominio Arquea, sin embargo también existen extremófilos identificados de los dominios Bacteria y Eucaria (Deming, 2002).

Finalmente, la proteómica es una herramienta que proporciona información sobre la expresión global de las proteínas en las células. Por lo tanto, esta tecnología permite caracterizar las proteínas expresadas diferencialmente en células expuestas a diferentes condiciones ambientales. La electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) en combinación con la espectrometría de masas son actualmente algunas de las tecnologías más utilizadas para el estudio de la proteómica comparativa en bacterias (Margesin and Schinner, 2001). Por lo tanto, esta aproximación entrega la posibilidad de estudiar, tanto mecanismos de adaptación a distintas condiciones ambientales, como también la expresión diferencial de proteínas con un posible potencial biotecnológico.

I. EXTREMÓFILOS: Halófilos y Psicrófilos

I.1 Definición de extremófilo

La vida y el crecimiento de los organismos son gobernados por numerosos factores físicos y químicos de sus ambientes (Madigan y col., 1997). Los organismos vivos habitan en la superficie de la Tierra donde las temperaturas son generalmente desde 4 a 40 °C; el pH es aproximadamente neutro, entre 5 y 8; y donde la salinidad, presión hidrostática y las radiaciones iónicas son bajas. Por lo tanto, es natural considerar que todos los organismos que viven en condiciones que no son compatibles con el crecimiento y sobrevivencia de la mayoría son llamados extremófilos (Madigan y col., 1997).

Los factores importantes para el crecimiento de los microorganismos extremófilos son: la altura, la temperatura, el pH, la presión, la salinidad, entre otros. Los microorganismos que habitan en ambientes basados en los factores mencionados anteriormente, son calificados como termofílicos (altas temperaturas), psicofílicos (bajas temperaturas), alcalofílico (altos valores de pH), acidofílico (bajos valores de pH) y halofílico (altas concentraciones de sal), respectivamente (Madigan y col., 1997). Esta clasificación abarca varios ambientes naturales en los cuales las condiciones ambientales extremas son más frecuentes que las encontradas usualmente en la naturaleza. Considerando la alta variedad de ambientes en la Tierra, las respuestas fisiológicas en los organismos que habitan ambientes extremos se pueden observar en una escala gradual desde la tolerancia hasta una necesidad absoluta (Madigan y col., 1997).

I.2 Hábitats de extremófilos

Los ambientes extremos más importantes que han sido encontrados en la naturaleza son (Prescott y col., 1999):

- Regiones polares (temperaturas menores a 0 °C)
- Profundidad del mar (temperaturas de 0 a 4 °C)
- Aguas termales (temperaturas 65 a 95 °C)
- Salmueras (salinidad > 6%)
- Zonas geotermales ricas en sulfuros (pH 3 o menor)
- Lagos (pH 10 o mayor)
- Fondo marino (presión de 500 a 1034 atm)
- Centrales nucleares (radiación de 3 a 5 mrad)

Gran parte de la superficie de la Tierra tiene bajas temperaturas, los océanos por ejemplo, los cuales cubren un 71% de esta superficie tienen un

promedio anual de 5 °C de temperatura, y los fondos marinos tienen una temperatura constante entre 1 y 4 °C. Las regiones polares que representan el 14% de la superficie de la Tierra, están permanentemente congelados o sobre la temperatura de congelación sólo por un corto período de tiempo. Estos ambientes son favorables para los organismos psicrófilos, que son capaces de crecer a bajas temperatura en la que el agua se mantenga líquida (Madigan y col., 1997).

Por otro lado, el agua de mar contiene aproximadamente un 3% de cloruro de sodio (NaCl), y las concentraciones de sal que son superiores al 3% en el agua son raras en la naturaleza. Sin embargo, es posible encontrar microorganismos que crecen en altas concentraciones de sal, tales como los halotolerantes y los halófilos, los cuales crecen generalmente desde 1 a 20% de NaCl, y algunos pueden crecer en concentraciones saturadas de sal (>30%) (Grant, 1991).

II. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Los halófilos son microorganismos que viven en presencia de altas concentraciones de sal (por ejemplo KCl o NaCl) tales como zonas litorales, salinas y lagunas salobres. Estos microorganismos tienden a agruparse en función del rango de sales que necesitan para tener un crecimiento óptimo: halófilos moderados (5-20% de NaCl) y halófilos extremos (20-30% de NaCl). No obstante, algunos autores también clasifican a los microorganismos que viven en ambientes con una salinidad cercana a la del agua de mar (óptimo entre 2-5% de NaCl) como halófilos débiles. Además, existe un grupo de microorganismos denominados halotolerantes, que aunque habitualmente viven en ausencia de sal, toleran cierta concentración de ella en su medio ambiente (Soria, 2004).

La mayoría de los microorganismos halófilos extremos que han sido aislados son procariontes pertenecientes al dominio Arquea (haloarquea) (Oren, 2000). Además estos microorganismos son capaces de vivir bajo una intensa radiación solar, condiciones en las que prácticamente ningún organismo es capaz de sobrevivir. Las haloarqueas, son por lo tanto los halófilos más extremos y por lo tanto han desarrollado mecanismos de adaptación a la sal únicos, que se manifiestan en la naturaleza de sus componentes celulares, su metabolismo y su fisiología. Además, las haloarqueas presentan pigmentos carotenoides en sus membranas celulares que les proporciona protección frente a la fuerte radiación solar a que están sometidas (Oren, 2000).

Además de los pigmentos carotenoides algunas especies de haloarqueas producen otro tipo de pigmentos, entre los cuales destaca la bacteriorrodopsina "bacteriorhodopsin" que permiten a los microorganismos utilizar la energía luminosa para generar gradientes de protones y cloruro. Estos gradientes son utilizados por los microorganismos para realizar distintos procesos bioenergéticos (Lanyi, 2004).

Entre los microorganismos halófilos moderados no se encuentran las arqueas, ya que, aunque algunas especies son capaces de vivir al 12% de sales totales sus condiciones óptimas están por encima del 20% de sales (Ventosa y col., 1998). Tampoco se encuentran muchas eucariotas, salvo algunas algas, hongos filamentosos, levaduras y protozoos. Sin embargo, mucho más abundantes son las bacterias halófilas moderadas que presentan una gran diversidad y muestran metabolismos muy variados (Ventosa y col., 1998).

II.1 Respuesta al estrés osmótico

En general, el problema más importante con que se encuentran los microorganismos en los ambientes hipersalinos, es el de evitar la pérdida de agua citoplasmática debido a la elevada osmolaridad del medio. Para combatir este problema los halófilos moderados y extremos, han desarrollado mecanismos que consisten en acumular moléculas osmoprotectoras en sus citoplasmas regulando su turgencia interna sin producir inhibición del metabolismo celular (Oren, 2000).

II.1.1 Compuestos osmoprotectores

En algunos microorganismos halotolerantes el balance osmótico se establece mediante moléculas (solutos compatibles) que son sintetizadas por las células o que son tomadas del medio en donde se encuentran disponibles (González-Hernández y col., 2004).

Los solutos compatibles son moléculas polares sencillas, altamente solubles y sin carga, o bien con carga neta neutra a pH fisiológico, que tiene una capacidad estabilizadora de proteínas frente al calor, a la desecación o a la congelación (Galinski and Louis, 1998).

Ciertamente, algunos solutos compatibles son más eficientes que otros en la protección de las enzimas contra los efectos de altas concentraciones de sal y otros tratamientos de estrés. Hay una gran diversidad de solutos compatibles que se han encontrado en los microorganismos halófilos y halotolerantes, dentro de los cuales encontramos algunos polioles, como el glicerol y arabinitol, azúcares y sus derivados (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol), aminoácidos y derivados de aminas cuaternarias como la glicina betaína (González-Hernández y col., 2004).

No se conoce bien la naturaleza de las interacciones entre los solutos compatibles y las proteínas, por lo tanto, no es posible por ahora predecir la posible estructura molecular que confieren los solutos compatibles a las estructuras y actividades de las enzimas. Sin embargo, la concentración intracelular de los solutos orgánicos compatibles permite un alto grado de adaptabilidad de las células a los cambios de la concentración de sal en el medio (González-Hernández y col., 2004).

Existen dos diferentes estrategias en los microorganismos que les permiten sobrellevar el estrés osmótico (González-Hernández y col., 2004). El mecanismo "Salt in" es típico de arqueas y bacterias halófilas moderadas, que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- . El

aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas frente a altas concentraciones salinas (Dennis and Shimmin, 1997). Los organismos que utilizan este mecanismo tienen una limitada capacidad para adaptarse a los cambios en la osmolaridad del medio, por lo que su crecimiento se restringe a ambientes con concentraciones salinas muy elevadas (Oren, 1999).

El mecanismo “Salt out” es utilizado por las bacterias halófilas y las halotolerantes, y también por las arqueas metanógenas halófilas moderadas (Ramírez y col., 2006). Este es un sistema más flexible ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante su síntesis a nivel celular, como sucede por ejemplo cuando las bacterias se cultivan en medio mínimo (Galinski, 1995). El transporte de estas moléculas es preferido a la síntesis “*de novo*” debido al ahorro energético que supone para la célula (Oren, 1999).

II.1.2 Composición lipídica de las membranas

La membrana citoplasmática debe jugar un papel importante en la respuesta de las células a cambios en las concentraciones de sal. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente al estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (Russell, 1993). Con respecto a los fosfolípidos, a medida que aumenta la salinidad, la membrana se enriquece en fosfatidilglicerol (PG) y/o en difosfatidilglicerol (DPG) (cardiolipina), los cuales son fosfolípidos cargados negativamente, a costa de una disminución en la fosfatidiletanolamina (PE), el cual es un fosfolípido neutro (Russell, 1993).

Una mayor densidad de carga negativa en la membrana debido al incremento en la concentración de sal, tiene relación con que el aumento de las cantidades de lípidos aniónicos que permiten el equilibrio de carga en la superficie de la membrana expuesta a altas concentraciones de Na^+ . Actualmente, es aceptado que el cambio en la composición de lípidos polares es un mecanismo para preservar la estructura de la bicapa lipídica (Ventosa y col., 1998).

En resumen, estas modificaciones en la composición de lípidos polares aportan consistencia a la membrana, y también son necesarias para mantener la estructura en doble capa lipídica, ya que en respuesta a la salinidad PE tiende a formar fases en una única capa (Russell, 1993).

II.2 Enzimas

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores acelerando la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio químico y son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos (García y col., 2000).

El término extremoenzima ha sido utilizado para referirse a enzimas que son activas bajo cualquier condición ambiental extrema como temperaturas extremadamente altas ó bajas, elevada concentración salina, pH muy ácido o muy alcalino (Adams y col., 1995; Poulos, 2003; Sanchez- Porro, 2003). Las enzimas que están asociadas a la membrana celular de los halófilos, presentan una actividad óptima en la concentración de 4 M de NaCl o KCl (Cavicchioli y col., 2002).

Los microorganismos halófilos moderados producen exoenzimas hidrolíticas extracelulares entre ellas: amilasas, proteasas, lipasas, DNAsas, entre otras, las cuales tienen diferentes aplicaciones en diversas áreas, tales como: industria de alimentos, detergentes, textiles, ciencias bioquímicas e industrias químicas (Rao y col., 1998; Kulkarni y col., 1999; Niehaus y col., 1999; Pandey y col., 1999; Pandey y col., 2000; Kamekura, 1986).

II.3 Pigmentación

Las prodigininas son una familia de tripirroles de pigmentos rojos que presentan cuatro clases de estructuras: El primer grupo es prodigiosin, el cual tiene una cadena de sustituyentes alquilo de cadena recta, tales como prodigiosin y undecilprodigiosin. Los otros tres grupos contienen derivados cíclicos de prodigininas (Tabla 1), además estos pigmentos son comunes en algunos halófilos (Williamson y col., 2006).

Tabla 1: Tipo de prodigininas y las bacterias que lo producen (Williamson y col., 2006).

Prodiginina	Bacteria
 <p>Prodigiosin</p>	<p><i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Hahella chejuensis</i> <i>Pseudomonas magnesorubra</i> <i>Vibrio psychroerythreus</i></p>
 <p>Undecylprodigiosin</p>	<p><i>Streptomyces longisporus ruber</i> <i>Streptoverticillium rubriretuculi</i> <i>Actinomadura madurae</i> <i>Saccharopolyspora sp. nov.</i></p>
 <p>Butyl-meta-cycloheptylprodiginine</p>	<p><i>Saccharopolyspora sp. nov.</i> <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i></p>
 <p>Cycloprodigiosin</p>	<p><i>Vibrio gazogenes</i> <i>Alteromonas rubra</i> <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i></p>
 <p>Cyclononylprodigiosin</p>	<p><i>Actinomadura pelletieri</i> <i>Actinomadura madurae</i></p>

El interés por las prodigininas ha aumentado debido a su actividad fungicida, antibacteriana, antiprotozoal y antimalarial. Por otro lado, las prodigininas han sido asociadas con la adherencia a superficies y la movilidad bacteriana. Las prodigininas son producidas por *Serratia* spp., actinomicetes y varias bacterias marinas (Tabla 1) (Williamson y col., 2006).

Tal como ocurre con algunos metabolitos secundarios, el verdadero rol fisiológico de las prodigininas en organismos que las producen no está claro aún. Además, la ubicación celular precisa de las prodigininas no son claras, debido a que han sido detectadas en fracciones intracelulares y extracelulares (Williamson y col., 2006).

II.4 Biotecnología

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico. No sólo son capaces de producir compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. A continuación se describen algunas de las aplicaciones más interesantes de estos microorganismos (Kikura y col., 1998).

- Pigmentos: Existen algunos microorganismos halófilos que contienen pigmentos unidos a las membranas, como la bacteriorrodopsina (BR) y la halorrodopsina, en el que estos microorganismos utilizan estos pigmentos en sus procesos bioenergéticos mediante la generación de gradiente de H^+ y Cl^- (Oren y col., 1997). Otra aplicación de la BR es la renovación de la energía bioquímica; por ejemplo la conversión de ADP hacia ATP; tal como el sistema de reciclamiento solar el cual puede ser de interés en los procesos biotecnológicos que necesitan gran cantidad de ATP (Groß, 1997; Margesin and Schinner, 2001).

- Solutos Compatibles: Los solutos compatibles tienen aplicaciones como biomoléculas estabilizadoras en las células, antagonistas de las sales y agentes protectores contra el estrés (Galinski, 1995). Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un importante efecto protector sobre enzimas, tales como lactato deshidrogenasa y fructoquinasa. Así, en diversos estudios en donde se compararon el efecto protector de distintos solutos compatibles (glicina-betaína, trehalosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares) sobre estas enzimas, se pone de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores del calor y los procesos de congelación y descongelación (Ramirez y col., 2004). Otra de las aplicaciones de la ectoína es el uso como estabilizador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en la industria farmacéutica y cosmética (Sauer and Galinski, 1998). La trehalosa, es un osmolito que está presente en varias bacterias halotolerantes, que puede utilizarse como protector para el congelamiento de biomoléculas, y también para la conservación de los microorganismos frente a la desecación (Galinski and Tindall, 1992).

- Enzimas: La mayoría de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento provienen de bacterias halófilas moderadas. De esta manera se han descrito varias hidrolasas de interés industrial del tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y 5'- nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas (Ramirez y col., 2004).

- Biodegradación de Residuos: Las bacterias halófilas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos

tóxicos, ya que constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales como por ejemplo en aguas residuales hipersalinas. Esto sucede, por ejemplo, en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, productos farmacéuticos y herbicidas, también en los procesos de extracción de petróleo y gas. Un ejemplo de bioremediación es la contaminación medioambiental por metales pesados, ya que se han aislado y caracterizado un gran grupo de bacterias halófilas moderadas resistentes a cinco de los más importantes contaminantes industriales tales como: cadmio, cobre, cinc, cromo y mercurio. Estas cepas, resistentes a metales pesados, podrían emplearse en procesos de destoxificación o como bioindicadores de ambientes hipersalinos contaminados (Ramirez y col., 2004).

- Fermentación: Los microorganismos halotolerantes juegan también un rol esencial en varios procesos de fermentación que ocurren en presencia de sal, debido a que estos microorganismos pueden catalizar la fermentación produciendo varios compuestos que dan el sabor y aroma de los productos finales. Un ejemplo es la fermentación de chucrut o repollo cocido que ocurre en presencia de 2,25 – 2,5% de NaCl; o los llamados “pickles” o encurtidos, el cual es fermentado en salmuera desde los 5 - 15,9% de NaCl (DasSarma and Arora, 2001).

III. MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS

III.1 Definición

Los microorganismos psicrófilos (bacterias Gram negativas o positivas, arqueas o levaduras), tienen una temperatura óptima de crecimiento de 15 °C o inferior, una temperatura máxima de crecimiento por debajo de 20 °C y una temperatura mínima de crecimiento de 0 °C o menor (Cavicchioli y col., 2002). En muchos materiales congelados existen pequeñas zonas microscópicas con agua líquida en donde los microorganismos pueden metabolizar y crecer. Aunque la congelación evita el crecimiento microbiano, no causa necesariamente la muerte celular (Cavicchioli y col., 2002).

III.2 Clasificación

Los microorganismos capaces de crecer a temperaturas alrededor de 0 °C, pueden ser clasificados en dos grupos: psicrófilos y psicrotolerantes. Los psicrófilos generalmente tienen un estrecho rango de temperatura de crecimiento, y temperaturas óptimas y máximas de crecimiento más baja comparado con los psicrotolerantes (Russel and Hammamoto, 1998). Los psicrófilos son en general aislados desde hábitats permanentemente fríos, mientras que los psicrotolerantes tienden a dominar los ambientes que experimentan fluctuaciones térmicas. La capacidad de los psicrófilos y los psicrotolerantes de crecer en temperaturas bajas pero no en moderadas depende de cambios adaptativos en sus proteínas y sus lípidos celulares (Kohshima, 2000).

III.3 Características de crecimiento y adaptación al frío

III.3.1 Enzimas

Los psicrófilos producen enzimas que están adaptadas al frío. Se caracterizan por tener una alta eficiencia catalítica, ya que son activas a bajas temperaturas (Lonhienne y col., 2001). Esta propiedad apoya la hipótesis de que sus enzimas están relacionadas con cambios a nivel estructural, mejorando sus velocidades de movimiento ya que tienen un alto grado de flexibilidad estructural. El incremento en la flexibilidad estructural facilita los cambios conformacionales resultando en un decrecimiento en la energía de activación requerida para la catálisis a bajas temperaturas (Lonhienne y col., 2001).

III.3.2 Membranas

El estado funcional de la bicapa de los psicrófilos es una fase líquida cristalina, pero una disminución en la temperatura induce a una transición de fase gel de transición y a una drástica pérdida de sus propiedades, tal como permeabilidad. La temperatura a la cual esta transición de fase de ocurre depende principalmente de la composición lipídica, particularmente de la cadena de ácidos grasos dentro de la membrana. Por lo tanto, los psicrófilos tienen una composición lipídica específica para mantener la fluidez de la membrana (Feller and Gerday, 2003), ya que presentan un mayor contenido en ácidos grasos no saturados lo que facilita el estado semifluido (las membranas compuestas de ácidos grasos saturados se harían poco fluidas y no funcionales a bajas temperaturas) (Cavicchioli y col., 2002).

III.4 Potencial Biotecnológico

La actividad de las enzimas de los psicrófilos ofrecen beneficios económicos potenciales. Dentro de las aplicaciones más importantes de los psicrófilos está la capacidad de degradar sustancias poliméricas tales como: almidón, celulosa, xilano, pectina, quitina, proteínas y lípidos; debido a la producción de enzimas como amilasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, quitinasas, proteasas y lipasas, respectivamente (Russell, 1993). Asimismo, las enzimas de los psicrófilos podrían utilizarse para producir grasas y aceites insaturados de forma natural, lo que permite la elaboración de productos alimenticios más sanos. Algunas enzimas y sus aplicaciones se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2) (Russell, 1993).

Tabla 2: Aplicaciones industriales de las enzimas provenientes de psicrófilos (Russell, 1993)

Enzimas	Aplicación
Proteasas	Detergentes, alimentos (productos lácteos)
Amilasas	Detergentes y panadería
Celulasas	Detergentes, alimentos y textiles
Deshidrogenasas	Biosensores
Lipasas	Detergentes, alimentos y cosméticos

IV. PROTEÓMICA

La mayoría de las actividades en las células son realizadas por proteínas, y para estudiar todas las proteínas expresadas por el genoma de un organismo es necesario analizar el proteoma. El proteoma es una fotografía instantánea de la expresión de proteínas en un momento en particular y bajo condiciones específicas. La proteómica permite obtener una descripción cuantitativa de expresión de proteínas y sus cambios bajo la influencia de perturbaciones biológicas, y la distribución de proteínas específicas dentro de la célula (López, 2007).

La electroforesis bidimensional (2DE) es una técnica con gran potencial, ya que ha sido ampliamente usada para separar y visualizar proteínas. Por medio de esta técnica, es posible separar las proteínas de acuerdo a dos parámetros independientes, tales como el punto isoeléctrico (pI) en la primera dimensión, y la masa molecular (M_r) en la segunda dimensión. Teóricamente, la electroforesis bidimensional es capaz de resolver sobre 10,000 proteínas simultáneamente, siendo de rutina aproximadamente 2,000 proteínas, determinado cantidades de proteínas menores que 1 ng por mancha ("spot"). Los "spots" de proteínas de interés pueden ser secuenciados e identificados utilizando espectrometría de masa (MS) y una base de datos para su identificación (López, 2007).

A pesar de su gran potencial, existen limitaciones en los geles 2DE, que se reflejan en la poca solubilidad de las proteínas de membrana y las dificultades en la visualización e identificación debido a la baja abundancia de proteínas. A pesar de estas limitaciones, los geles 2DE continúan siendo una herramienta potente y versátil, y es una de las técnicas mayormente usada en el análisis de proteomas (López, 2007).

V. MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Vibrio*

V.1 Descripción General

La familia *Vibrionaceae* (clase γ -*proteobacteria*) está comprendida por microorganismos Gram-negativos quimiorganotrofos móviles, que tienen al menos un flagelo polar (Farmer and Janda, 2005; Thompson and Swings, 2006). Los microorganismos del género *Vibrio* son anaerobios facultativos que pueden presentar metabolismos de respiración y de fermentación (Farmer and Janda, 2005). Las células de la familia *Vibrionaceae* tienen usualmente un tamaño de 1 μm de ancho y 2-3 μm de longitud. La mayoría de estos microorganismos requieren iones sodio (Na^+) para crecer y sobrevivir, y usualmente 0,5-3% de NaCl para un crecimiento óptimo (Thompson and Swings, 2006).

La familia *Vibrionaceae* se encuentra ampliamente distribuida en los ambientes acuáticos, aguas dulces y marinas, incluyendo ríos, estuarios, lagos, costas marinas, aguas oceánicas profundas y lagunas salinas (Madigan and Martinko, 2006; Urakawa and Rivera, 2006). Aunque han sido asignados ocho géneros en esta familia, los más estudiados son *Vibrio* y *Photobacterium*. Además, es importante mencionar un tercer género, *Salinivibrio*, cuyos miembros tienen una inusual capacidad de crecer en un amplio rango de salinidad (0-20% de NaCl) y temperatura (5-50 °C) (Thompson and Swings, 2006).

Interesantemente, un gran número de microorganismos pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* son capaces de formar biopelículas, las cuales pueden constituir una estrategia para sobrevivir durante estrés ambiental (Thompson y col., 2004). Mediante las biopelículas los microorganismos pueden nutrirse, resistir a los antibióticos, y establecer una relación favorable con otras bacterias o huéspedes en un determinado ambiente (Thompson y col., 2004).

V.2 Composición lipídica

Está bien documentado que todos los organismos vivos adaptan su composición lipídica de la membrana dependiendo de las condiciones ambientales y fisiológicas. Estudios en bacterias moderadamente halófilas, del género *Vibrio* y *Pseudomonas*, y en algunas gram-positivas como *Planococcus*, han mostrado un incremento en la fracción de fosfatidilglicerol (PG) o difosfatidilglicerol (DPG), y una disminución en la fracción fosfatidiletanolamina (PE), como un resultado del aumento de la salinidad en los medios de crecimiento (Danevčič y col., 2005).

Las especies del género *Vibrio* presentan lípidos de membrana del tipo PG, DPG, PE y liso-PE (Danevčič y col., 2005). Algunos estudios en especies de la familia *Vibrionaceae* han determinado la presencia de ácidos grasos insaturados de 16 y 18 carbonos (16:1 y 18:1), y además se han detectado ácidos grasos saturados de 16 carbonos (16:0). Los isómeros más abundantes encontrados son los ácidos 16:1 y 18:1, como por ejemplo el ácido *cis*-9-hexadecenoico (Δ^9 -16:1) y el ácido *cis*-11-octadecenoico (Δ^{11} -18:1). En menor proporción, respecto a los ácidos anteriormente nombrados, se han detectado el ácido *cis*-11-hexadecenoico (Δ^{11} -16:1) y el ácido *cis*-12-octadecenoico (Δ^{12} -18:1). La Tabla 3 muestra con más detalle la composición de ácidos grasos de varias especies de la familia *Vibrionaceae* (Lambert y col., 1983).

Tabla 3: Estudio de ácidos grasos en especies de la familia *Vibrionaceae*:

Cultivo	Cadena de ácido grasos												
	a 12:0	14:0	15:0	Un 16:1	Δ^9 16:1	Δ^{11} 16:1	16:0	17:1 _d	17:0	Δ^9 18:1	Δ^{11} 18:1	Δ^{12} 18:1	18:0
<i>V.fluvialis</i>	3 ^b	4 ^c	1	+	20	18	12	3	2	-	10	-	1
<i>V.parahaemolyticus</i>	2	4	2	-	25	6	12	4	5	-	13	5	1
<i>V.alginolyticus</i>	2	4	3	-	31	7	13	8	3	-	24	2	+
<i>V.harveyi</i>	4	7	1	-	33	6	15	2	2	-	17	1	1
<i>V.splendidus</i>	5	6	+	-	42	6	22	-	+	-	13	-	1
<i>V.vulnificus</i>	-	2	+	1	17	22	18	1	+	-	11	11	1
<i>V.cholerae</i>	-	5	+	1	36	12	16	1	+	1	13	2	1
<i>V.gazogenes</i>	6	8	+	+	37	-	22	+	+	-	14	-	1
<i>V.angillarum</i>	5	6	+	+	36	+	21	1	+	-	15	-	1
<i>V.metschnikovii</i>	4	6	+	+	43	+	17	+	+	-	26	+	1

Estudio realizado por Lambert y col., en 1983, en el que muestra los porcentajes de ácidos grasos encontrados en las distintas especies de la familia *Vibrionaceae*. ^a corresponde el número de la izquierda indica la cantidad de átomos de carbono, y el número de la derecha indica la cantidad de dobles enlaces. Un, indica los ácidos grasos no identificados. Δ^9 , Δ^{11} y Δ^{12} , indican las formas *cis* de isómeros con el doble enlace en las posiciones 9-10, 11-12 y 12-13; ^b indica los valores en porcentajes de todos los ácidos grasos; - ácidos grasos no detectados; + ácidos grasos detectados no cuantificados; ^c valores cercanos al 1% de ácidos grasos 14:1 fueron encontrados en todos los cultivos; ^d valores que incluyen el porcentaje total de ambos isómeros de 17:1.

V.3 Movilidad

Los flagelos actúan como hélices helicoidales semirígidas compuestos principalmente por la proteína flagelina, que permiten a las bacterias un eficiente desplazamiento. Las hélices son accionadas por un motor rotacional reversible ubicado en la membrana celular, y la energía para este motor se obtiene ya sea desde los iones sodio o protones. El número y la disposición de los flagelos varían dependiendo de la especie y sus ubicaciones celulares

pueden ser del tipo polar o peritricoso. Los flagelos pueden cumplir otros roles además de desplazamiento en medios líquidos (efecto “swimming”), tales como la posibilidad de moverse y colonizar superficies (efecto “swarming”). Además, los flagelos participan en la adhesión a superficies, y son claves para los pasos iniciales de adsorción de la bacteria a las superficies, formación de biopelículas e invasión de huéspedes. Es importante destacar que muchas bacterias, incluyendo especies de *Vibrios* marinos, *Vibrio cholerae* y *Helicobacter pylori* presentan flagelos. (McCarter, 2001).

V.4 Regulación Frente al Estrés

La mayoría de las bacterias que pertenecen a la familia *Vibrionaceae* son encontradas en condiciones ambientales de estrés. Estas condiciones se deben a la gran diversidad de hábitats en los que son encontrados, tales como sedimentos acuáticos, aguas saladas y dulces, océanos, simbioses de organismos, entre otros. (Nishiguchi and Jones, 2004; Urakawa and Rivera, 2006; Dunlap y col., 2007).

V.4.1 Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor determinante en la distribución ecológica de los microorganismos del género *Vibrio*, encontrándose en el rango observado en los hábitats marinos. Estas condiciones ambientales han permitido que los microorganismos del género *Vibrio* respondan de buena forma frente a un “shock” de bajas temperaturas, lo cual involucra cambios en la expresión en las proteínas CSPs (“Cold shock proteins”) que alcanzan niveles máximos durante la climatización a bajas temperaturas (Ermolenko and Makhatadze, 2002). Además tal como se mencionó anteriormente, los *Vibrios* aumentan la composición de los ácidos grasos insaturados para mantener la fluidez en sus membranas celulares (Barlett, 2006).

V.4.2 Regulación frente al estrés osmótico

Los microorganismos del género *Vibrio* también viven en ambientes con una gran variabilidad de salinidad, por lo tanto pueden experimentar tanto un alto como un bajo estrés osmótico. Durante un bajo estrés osmótico las células deben mantener concentraciones citoplasmáticas apropiadas de metabolitos e iones, previniendo la lisis celular, y preservando la fuerza iónica y el pH (Barlett, 2006). Por otro lado, un alto estrés osmótico, promueve la deshidratación de las células; por lo tanto los microorganismos deben ser capaces de introducir o sintetizar solutos compatibles para sus funciones fisiológicas y metabólicas, tal como se describió en la sección II.1 (Bartlett, 2006).

V.5 Pigmentación

Varios estudios han descrito la pigmentación roja producida por algunos *Vibrios*. A pesar de que se sabe que este pigmento pertenece a la familia de los prodiginines no es claro aún su rol fisiológico en estos microorganismos. En un estudio realizado por Starič y col., (2010), se aisló un microorganismo *Vibrio* sp. desde un estuario, el cual es capaz de sobrevivir en variaciones de temperaturas desde 1 a 29 °C, y de salinidad desde 0 a 37 g/L de sal. Este microorganismo presentó el pigmento perteneciente a la familia de los prodiginines. Se concluyó que los factores ambientales, tales como luz, temperatura, entre otros, y la suplementación de los medios como nutrientes, tienen un efecto en la producción de prodigiosin (Starič y col., 2010). Otros estudios han demostrado sólo la presencia de pigmentos del tipo prodigiosin y no su funcionalidad en *Vibrio ruber sp.nov.* y *Vibrio gazogenes* (Shieh y col., 2003; Allen y col., 1983).

V.6 Proteómica

Prácticamente es desconocida la fisiología y proteómica de *Vibrios* aislados desde lagunas salinas, por lo cual sólo es posible comprender hasta el momento la proteómica de estos microorganismos a partir de aquellos aislados y caracterizados desde aguas marinas.

Un estudio realizado por Kao y col., (2009) en *Vibrio anguillarum* identificó cinco proteínas que se sobreexpresaron y reprimieron cuando el microorganismo fue sometido a estrés osmótico, llamadas OmpU, Maltoporina, FlaB, Omp26La y OmpW. La proteína Omp26La es una proteína de membrana externa, OMP (“Olfactory Marker Protein”), que respondió a las bajas concentraciones de sal, por lo tanto cuando fue sometida a estrés osmótico esta proteína se vio reprimida. La proteína OmpW es también un OMP y se sobreexpresó frente al estrés salino. Ambas proteínas Omp26La y OmpW fueron definidas como osmoreguladores. La proteína OmpU también se sobreexpresó frente al estrés salino, y se ha descrito que tiene un rol en la resistencia a la bilis y en la formación de biopelículas. La proteína Maltoporina es responsable de la penetración de mono-, di y oligosacáridos a través de la membrana, afectando el crecimiento y la sobrevivencia. La proteína FlaB corresponde a un único flagelo polar del *Vibrio anguillarum*, la cual se expresó gradualmente al aumentar la salinidad en el medio cultivo (Kao y col., 2009).

V.7 Microorganismo en estudio, *Vibrio* sp.

El microorganismo extremófilo utilizado en este trabajo fue obtenido desde la laguna Tebenquiche, en el Salar de Atacama por un equipo de investigadores

del Centro de Biotecnología de la Universidad Católica del Norte, cuyas características químicas están descritas con el nombre “tebenquiche 5” (Tabla 4):

Tabla 4: Características fisicoquímicas de la zona de muestreo

Localidad	Coordenadas		Temp. °C	UV 320nm	Hora	pH	O ₂ mg L ⁻¹	Conductividad mS	Salinidad g L ⁻¹	Dapi cél mL ⁻¹	FISH Bacteroidetes cél mL ⁻¹	Refractometro %	Fecha muestreo
	Este	Norte											
Tebenquiche 1	577686	7442157	28,1	0,232	13:30	7,27	1,96	161,1	307	6,0*10 ⁶	3,1*10 ⁵	27,2	11-May-06
Tebenquiche 2	577614	7441745	21,7	0,24	14:00	8,16	1,43	103,6	30,1	4,1*10 ⁶	7,0*10 ⁵	3,6	11-May-06
Tebenquiche 3	577400	7441748	18,3	0,173	14:30	7,87	5,8	109,2	90,3	3,4*10 ⁶	2,3*10 ⁵	10	11-May-06
Tebenquiche 4	577335	7441699	18,1	0,142	14:45	7,83	4,51	113	88,3	1,8*10 ⁶	1,4*10 ⁵	10	11-May-06
Tebenquiche 5	577363	7441644	23,4	0,14	15:07	7,85	5,33	102,5	85,1	1,20*10 ⁶	8,9*10 ⁵	9,4	11-May-06
Tebenquiche 6	577338	7441804	24,2	0,103	15:20	7,08	2,96	177,1	337	6,4*10 ⁶	2,1*10 ⁵	>28	11-May-06
Chaxa	5044353	7424617	9,6	0,155	10:15	7,8	4	83,3	60,1	1,4*10 ⁶	1,1*10 ⁵	6,9	12-May-06
Cejar	580677	7449674	18,5	0,215	11:20	7,47	3,76	153,9	194	1,7*10 ⁶	2,7*10 ⁴	21,4	11-May-06
Tebenquiche2A	577452	7441732	16,7	ND	10:20	8,55	1,6	18,15	10,2	5,2*10 ⁶	5,4*10 ⁵	1,8	28-Feb-07
Tebenquiche2B	577407	7441719	18	ND	10:55	8,10	4,6	44,2	28,1	8,0*10 ⁶	8,9*10 ⁵	3,2	28-Feb-07
Tebenquiche2C	577386	7441722	18,3	ND	11:10	7,90	5,2	126,6	72,4	9,7*10 ⁵	8,5*10 ⁵	>28	28-Feb-07

Los análisis realizados por investigadores anteriores a este trabajo de la cepa obtenida, llamada Teb5a1, determinó que es una bacteria Gram negativa, con forma de bacilo y móvil. También tiene un crecimiento rápido, tanto en medio sólido, caldo marino, medio marino o agua de mar filtrada suplementada con peptona y extracto de levadura. En placa petri, las colonias tienen una coloración marrón y su cultivo en medio líquido se vuelve de color rojo. Se corrió el espectro UV/Vis del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado, resultando en un máximo de absorbancia de 533 nm.

VI. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Basado en los antecedentes planteados y en el interés de conocer mecanismos fisiológicos y moleculares como respuestas a condiciones extremas tales como alta concentración de sal y bajas temperaturas en microorganismos aislados desde el Salar de Atacama, nos planteamos como hipótesis de trabajo que la movilidad, tipo de ácidos grasos, producción de pigmento y cambios en la expresión de proteínas son mecanismos que utiliza el microorganismo *Vibrio* sp. frente a cambios en la concentración de sal y en la temperatura.

Para probar esta hipótesis se propone estudiar cada uno de estos mecanismos de respuesta con el fin de aumentar el conocimiento acerca de la forma de sobrevivencia del microorganismo *Vibrio* sp. a estas condiciones extremas y visualizar la expresión global de proteínas en condiciones de ausencia y presencia de sal.

VII. OBJETIVOS

Basado en los antecedentes y en la hipótesis planteada anteriormente se tiene como objetivo lo siguiente:

VII.1 Objetivo General

Estudiar los mecanismos de respuestas fisiológicas y moleculares del extremófilo *Vibrio* sp. frente a cambios en la concentración de sal y temperaturas

VII.2 Objetivos Específicos

1. Estudiar las condiciones óptimas de crecimiento del extremófilo *Vibrio* sp. (temperatura y concentración de sal).
2. Estudiar el efecto de la concentración de sal en la fisiología y en los mecanismos de adaptación en el extremófilo *Vibrio* sp.
3. Estudiar el efecto de la concentración de sal en la movilidad en el extremófilo *Vibrio* sp.
4. Estudiar el efecto de la temperatura en la composición de ácidos grasos.
5. Estudiar el efecto de la concentración de sal en la expresión global de proteínas en el extremófilo *Vibrio* sp.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Las metodologías utilizadas para llevar a cabo esta investigación involucraron áreas tales como la microbiología, bioquímica y biología molecular.

VIII.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se trabajó con una cepa del género *Vibrio* aislada desde la laguna de Tebenquiche del Salar de Atacama.

Inicialmente, el microorganismo *Vibrio* sp. se creció a 30 °C y a 100 rpm (agitación orbital) en un medio salino compuesto por agua de mar (salinidad aproximada 3%), 1 g/L de extracto de levadura (Difco) y 5 g/L de peptona (Difco). Los aislamientos de este microorganismo se realizaron en placas con en el mismo medio más 15 g/L de agar bacteriológico (Difco).

Se trabajó en la modificación de estos medios para encontrar las condiciones ideales de crecimiento y así realizar los experimentos fisiológicos y de expresión global de proteínas. Para esto se diseñó un medio basado en lo descrito por Shieh y col, 2003 para el microorganismo *Vibrio ruber* sp. nov., con algunas modificaciones. La composición en g por litro fue: 6 de peptona (Difco), 2 de extracto de levadura (Difco), 3 de MgSO₄ x 7H₂O (Merck), 0,01 de CaCl₂ (Merck), 0,55 de KCl (Merck) y concentraciones variables de NaCl (Merck). Además se realizaron aislamientos en placas con este medio definido solidificado con 15 g/L de agar bacteriológico (Difco).

VIII.2 Adaptación inmediata de *Vibrio* sp. a la sal

Para realizar el ensayo de adaptación inmediata se creció el microorganismo en el medio definido en ausencia de sal (0 g/L de NaCl) hasta el comienzo de su fase exponencial, y posteriormente este cultivo se utilizó como inóculo para medios con distintas concentraciones de NaCl (desde 0 g/L hasta 150 g/L). Las adaptaciones se realizaron a 30 °C con agitación orbital a 100 rpm (revoluciones por minuto).

VIII.3 Identificación de condiciones óptimas de crecimiento de *Vibrio* sp.

Para la identificación de las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo se utilizó el medio líquido definido descrito anteriormente (sección VIII.1) y se realizaron curvas de crecimiento. Para identificar la temperatura y concentración de NaCl óptima se creció el microorganismo con

agitación orbital a 100 rpm (revoluciones por minuto) en rangos de temperaturas de 4 a 49 °C y de 0 a 150 g/L de NaCl. Los crecimientos se chequearon utilizando una cámara de Neubauer de 0,01 mm de profundidad (Labolan) en un microscopio (Olympus), y medición de la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda en forma regular mediante espectroscopía UV/visible (Perkin Elmer).

VIII.4 Efecto de la concentración de NaCl en la movilidad de *Vibrio sp.*

Se realizaron dos tipos de ensayos de movilidad basados en la metodología utilizada por Joshua y col., (2006), para ver los fenómenos “Swarming” y “Swimming”.

Para observar el fenómeno “Swarming” se utilizó el medio definido sólido con 0,5 % de agar bacteriológico (Difco), luego el microorganismo se sembró con asas de inoculación atravesando el agar en el centro de la placa.

Para observar el fenómeno “Swimming” se utilizó el medio definido sólido con 0,3 % de agar bacteriológico, luego el microorganismo se sembró poniendo una gota sobre el agar en el centro de la placa.

Ambos ensayos se realizaron tanto en presencia como en ausencia de sal y a distintas temperaturas.

VIII. 5 Microscopía electrónica de transmisión

El análisis visual de células para determinar la morfología y la presencia de flagelos, tanto en presencia como en ausencia de sal, se realizó según González y Jensen (1998). Las células provenientes de cultivos crecidos con 0, 25, 50 y 100 g/L de NaCl hasta su fase estacionaria temprana se lavaron con agua bidestilada. Luego las células se resuspendieron a una A_{600} de 0,5, y alícuotas de 10 μ L de las suspensiones celulares se aplicaron sobre grillas de níquel cubiertas con carbón, y se dejaron sedimentar. El exceso de líquido se absorbió con papel de filtro y las grillas se secaron al aire. Para el análisis se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM) operado a 80 kV (Philips Tecnai 12).

VIII.6 Determinación de ácidos grasos

Para la determinación de ácidos grasos se prepararon 4 L de un cultivo de *Vibrio sp.* crecido a dos temperaturas (37 y 10 °C), en un caldo marino comercial (Difco) con una salinidad aproximada de 30 g/L de NaCl. Luego se prepararon los extractos celulares centrifugando el cultivo a 13200 rpm por 10

minutos. Finalmente, una vez obtenido los extractos celulares se enviaron a la Facultad de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco donde se realizaron los análisis cromatográficos para la determinación de ácidos grasos. Basados en Pritam y col., (1988) se realizó la identificación del perfil lipídico y su cuantificación, utilizando un cromatógrafo de gases con detector FID en columna capilar de fase reversa y los estándares correspondiente a los diferentes ácidos grasos poliinsaturados (Pritam y col., 1988).

VIII. 7 Métodos de análisis de proteínas

VIII.7.1 Obtención de pellet celular

Para la obtención del pellet celular se prepararon cultivos de 80 mL de *Vibrio sp.* en el medio definido en la sección VIII.1. Se prepararon cultivos con 0 y 25 g/L de NaCl, y se incubaron durante 24 horas a 30 °C con agitación orbital de 100 rpm.

Una vez crecidos ambos cultivos, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, y luego se centrifugó a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C para obtener el pellet celular. Finalmente, este pellet fue pesado y luego se extrajeron las proteínas de cada uno de los extractos crudos.

VIII.7.2 Obtención de extracto de proteínas para gel monodimensional SDS-PAGE

Para realizar un gel monodimensional de proteínas de los cultivos descritos previamente, a los “pellet” celulares se les agregó un amortiguador de sonicación en la proporción 10 µL de amortiguador por mg de peso húmedo. El amortiguador está compuesto por Tris-HCl pH 8,15 (50 mM) y ácido etilendiaminotetraacético, EDTA (10 mM), y además se añadió fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) a una concentración final de 100 µg/mL, el cual es un inhibidor de proteasas.

Finalmente se agregó buffer de corrida 3X compuesto por 1 mL de Tris- HCl 0,5M pH 6.8, 1,6 mL SDS al 10%, 0,8 mL de Glycerol al 30%, 0,4 mL de 2-β-mercaptoetanol 5% y Azul de bromofenol a una concentración final 1X, las muestras se hierven por 5 minutos en baño maría y luego se cargaron en el gel SDS-PAGE.

VIII.7.3 Obtención de extracto de proteínas para gel bidimensional (2DE)

Para realizar los geles 2DE, la obtención de proteínas es distinta respecto a los geles monodimensionales. A los extractos crudos obtenidos se agregó

amortiguador de sonicación e inhibidor de proteasas en la misma proporción que en lo descrito en la sección VIII.7.2. Una vez resuspendidas las células se congelaron a -80 °C por media hora y se sonicaron las células en 3 ciclos de 15 segundos cada uno. Este procedimiento se realizó hasta que las células se rompieron completamente. Finalmente, se cuantificaron las proteínas de los extractos preparados.

VIII.7.4 Cuantificación de Proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó según el método de Bradford (1976) utilizando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce), con un rango de concentración de estándar de albumina diluida desde 2,5 a 25 µg/mL.

VII.7.5 Precipitación con fenol

Se realizó la precipitación de proteínas basados en el protocolo entregado por el Dr. Francisco Chávez (Universidad de Chile) con las siguientes modificaciones: A 500 µg de proteínas se les agregó volumen de fenol ácido (Winkler) (1:1), luego se mezcló vigorosamente durante 1 minuto y se calentó a 70 °C por 10 minutos. Posterior a este paso, las muestras se enfriaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 5000 g por 10 minutos a 4 °C. Una vez terminado este paso se eliminó la fase acuosa y se lavó con un volumen de agua bidestilada (1:1). Finalmente, una vez eliminada la fase acuosa, se realizaron dos lavados agregando 2 volúmenes de acetona (Merck) y se agitó vigorosamente durante 1 min. Luego se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante, dejándose secar a temperatura ambiente para eliminar la acetona.

VII.7.6 Geles monodimensional SDS-PAGE

Para realizar el gel SDS-PAGE se prepararon dos soluciones llamadas "stacking" y "running". La primera solución está compuesta por "upper buffer" (0,5 M Tris HCl pH 6,8 y 0,4% SDS), acrilamida 30%, temed, PSA (10%) y agua bidestilada. La segunda solución se preparó al 10 % de acrilamida, estaba compuesto por glicerol 1%, "lower buffer" (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS), acrilamida, temed, PSA y agua bidestilada. Finalmente se cargaron 50 y 65 µg de ambos extractos de proteínas obtenidos junto con un estándar de proteínas (BenchMark™ ladder, Invitrogen). El gel monodimensional se corrió a 70 V toda la noche.

VIII.7.7 Electroforesis bidimensional de proteínas (2DE)

VIII.7.7.1 Preparación de la muestra para el isoelectroenfoque

Los extractos de proteínas obtenidos en la sección VIII.7.3 se utilizaron para realizar el isoelectroenfoque. Para cada muestra de proteína se utilizaron 250 μL de un amortiguador IEF de rehidratación que contiene algunas modificaciones descritos en la tesis doctoral del Dr. Francisco Remonsellez (2008, Universidad de Chile). El amortiguador contiene 8 M de urea (Biorad), 2 M tiourea (Merck), 2% (p/v) CHAPS (CALBIOCHEM), 0,27% (v/v) anfolitos Bio-Lyte[®] 3-10, 0,13% (v/v) anfolitos Bio-Lyte[®] 5-8, y 0,001% (p/v) azul bromofenol. Las muestras se incubaron con el amortiguador a 25 °C durante 40 minutos. Luego, al amortiguador IEF se le agregó 0,03 g de Ditiotreitól (64,5 mM concentración final de DTT). Generalmente, se utilizaron 1000 μg de proteínas de los extractos obtenidos, se agregó al amortiguador IEF para alcanzar un volumen final de 300 μL de solución. Las muestras que contenían el amortiguador IEF y las distintas cantidades de proteínas se incubaron a temperatura ambiente por una hora, pasado este tiempo los 300 μL se agregaron con una micropipeta a la bandeja de focalización de proteínas. Los geles inmovilizados RadyStrips IPG (Biorad) de 17 cm de largo, con rangos de pH 3-10 no lineal (NL), se pusieron en contacto con la muestra y el amortiguador de rehidratación IEF, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente se agregó 2,5 mL de aceite mineral (Biorad) con una pipeta sobre cada gel inmovilizado para prevenir la deshidratación y precipitación de urea, este procedimiento se realizó para ambos cultivos, tanto el crecido en ausencia como en presencia de sal. Se realizó también la misma experiencia, pero esta vez se utilizó un gel inmovilizado RadyStrips IPG (Biorad) de 17 cm de largo, con rango de pH 5-8 no lineal (NL), para el cultivo crecido en ausencia de sal.

VIII.7.7.2 Isoelectroenfoque (primera dimensión)

La corrida del isoelectroenfoque se programó en el equipo PROTEAN IEF (Biorad) con una temperatura fija de 20 °C en la plataforma de Peltier. La rehidratación de los geles inmovilizados se realizó pasivamente (sin voltaje) durante 18 horas. Luego del tiempo de rehidratación comenzó el programa de focalización, el cual contiene un paso a 250 V por 15 minutos, un segundo paso a 2000 V por 2 horas, un tercer paso a 8000 V por 4 horas, un cuarto paso a 10000 V por 11 horas y un quinto paso a 50 V por 4 horas, alcanzando 100000 V/h.

VIII.7.7.3 Equilibrio de los geles inmovilizados ReadyStrip IPG

Para preparar los geles inmovilizados para la segunda dimensión se quitaron de la bandeja de focalización y se traspasaron a otra bandeja especial para ser equilibrados. El equilibrio se realizó con algunas modificaciones según esta descrito en la tesis doctoral del Dr. Francisco Remonsellez (2008, Universidad de Chile). En una primera etapa los geles inmovilizados se equilibraron con 2,5 mL de un amortiguador compuesto por 24 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M urea, 2% (p/v) SDS, 30% (v/v) glicerol y 156 mM DTT, durante 15 minutos. Luego los geles se secaron con papel absorbente y se equilibraron con 2,5 mL de un segundo amortiguador compuesto por 24 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M urea, 2% (p/v) SDS, 30% (v/v) glicerol y 135 mM yodoacetamida. Finalmente, los geles inmovilizados se secaron nuevamente, y se dejaron con 2,5 mL de amortiguador de electroforesis de proteínas o de corrida 1X compuesto por 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 1% (p/v) SDS de un "stock" de 10X, hasta que fueron corridos en la segunda dimensión.

VIII.7.7.4 SDS-PAGE (segunda dimensión)

Los geles inmovilizados se transfirieron a geles SDS-PAGE, con porcentajes de 10% de acrilamida y se cubrieron con 1% de agarosa con azul de bromofenol en 1X de amortiguador de electroforesis de proteínas, luego de aplicar el patrón de peso molecular. Los geles se corrieron toda la noche a 70 V.

VIII.7.7.5 Tinción de geles de acrilamida

Tinción con plata

La tinción con plata se realizó según lo descrito por Shevchenko y col., (1996), con las siguientes modificaciones: luego de la electroforesis los geles se fijaron con 50% (v/v) de metanol, 5% (v/v) ácido acético en agua destilada durante 20 minutos. Después se lavaron por 10 minutos con 50% (v/v) metanol en agua destilada, adicionalmente una vez con agua destilada durante 10 minutos para remover el ácido remanente. Los geles se sensibilizaron durante 1 minuto con una solución que contiene 0,25 g/L de diotinito, y estos se lavaron con dos cambios de agua destilada durante 1 minuto cada uno. Posterior al lavado, los geles se sumergieron en una solución de 0,2% (p/v) de AgNO_3 , 1 mM formaldehído, y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. La solución de plata se descartó y los geles se lavaron con agua destilada por 1 minuto. Los geles se desarrollaron con una solución que contiene 6% (p/v) de Na_2CO_3 , 6 mM formaldehído, 20 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y se agitó vigorosamente hasta que la solución adquirió un color amarillo. En este momento se descartó la solución y se reemplazó por una porción fresca. Es fundamental que el

desarrollo se realice en una solución transparente. Una vez que adquirió la intensidad deseada, la solución de desarrollo se descartó, y se agregó 5% (v/v) de ácido acético en agua destilada, y se dejó en agitación por 10 minutos. Finalmente, los geles se lavaron cuatro veces con agua destilada.

Tinción con azul de Coomassie G-250

La tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 se realizó según lo descrito por Giavalisco y col., (2005), con las siguientes modificaciones: luego de la electroforesis se prepararon dos soluciones, una solución A con 34% de metanol y 0,250g de azul de Coomassie G-250, y una solución B con 15% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 100 mL agua bidestilada. Posterior a la preparación, ambas soluciones se mezclaron y se homogeneizaron completamente, y finalmente se les adicionó 5 mL de H_3PO_4 y se completó con agua bidestilada hasta los 250 mL. Los geles se tiñeron durante 1 día.



Fig. 2: Crecimiento del microorganismo *Vibrio sp.* en medio definido líquido y sólido. A, imagen obtenida del crecimiento del microorganismo *Vibrio sp.* en el medio definido líquido descrito en el capítulo VIII. B, imagen obtenida de colonias aisladas del microorganismo *Vibrio sp.* en el medio definido sólido descrito en el capítulo VIII.

El microorganismo *Vibrio sp.* se adaptó de buena forma al medio definido con una concentración de NaCl de 25 g/L. Se observó similar crecimiento y pigmentación con respecto a crecimiento en el medio marino (Fig. 2).

IX.2 Obtención de condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo *Vibrio sp.*

IX.2.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento del *Vibrio sp.*

Se determinó el efecto de la temperatura en el crecimiento del microorganismo en presencia y ausencia de sal. Para ello se creció el microorganismo en temperaturas de 4, 17, 26, 30, 40 y 49 °C en medio definido tanto en ausencia (0 g/L NaCl) como en presencia de sal (25 g/L NaCl).

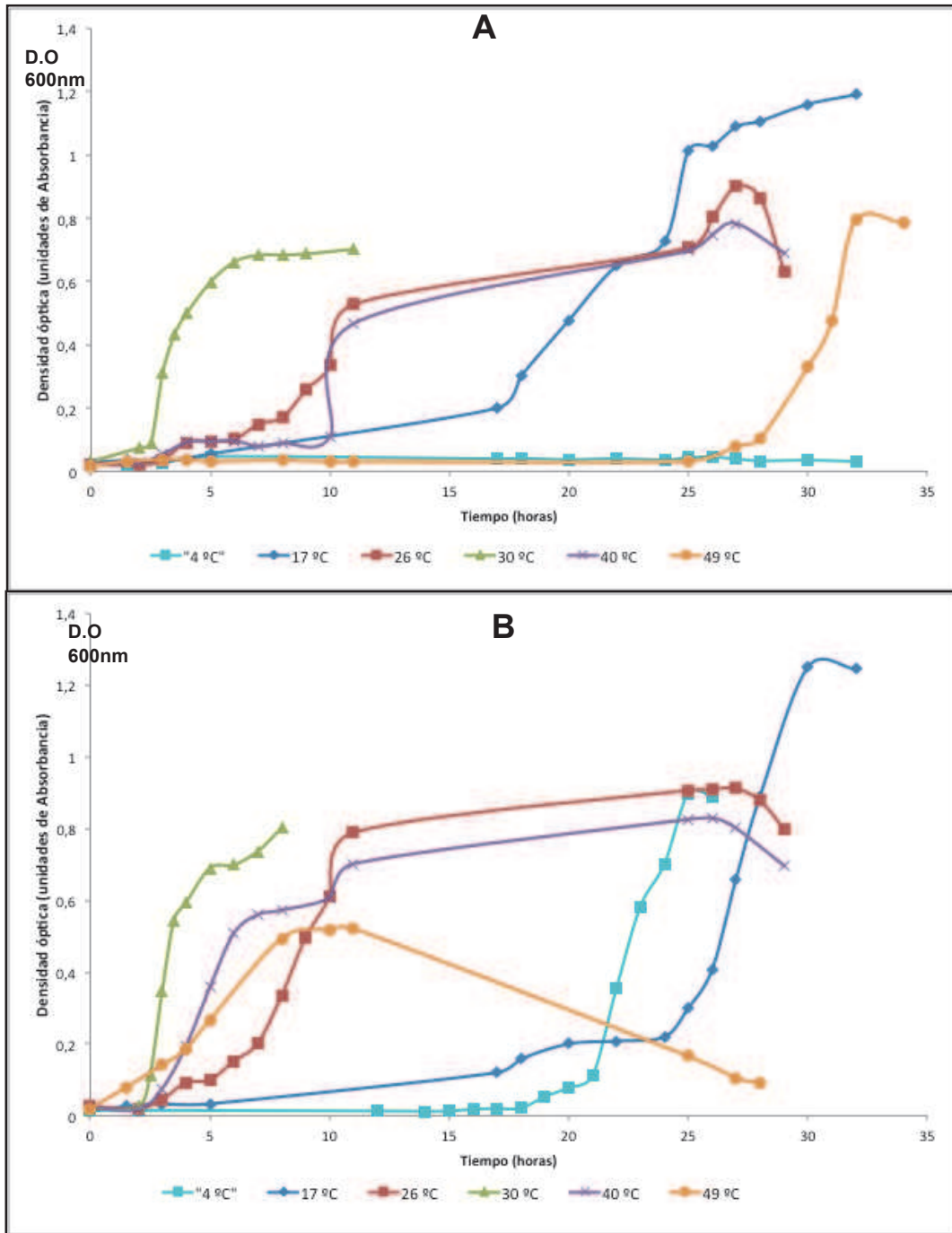


Fig. 3: Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Vibrio* sp. A, gráfica correspondiente a la curva de crecimiento del microorganismo en el medio definido en ausencia de sal (0 g/L de NaCl). B, gráfica correspondiente a la curva de crecimiento del microorganismo *Vibrio* sp. en el medio definido en presencia de sal (25 g/L de NaCl).

En ausencia de sal (0 g/L NaCl) el microorganismo fue capaz de crecer entre 17 y 49 °C pero con distintos períodos de adaptación. Además, no se observó

crecimiento a 4 °C y la temperatura óptima de crecimiento fue de 30 °C (Fig. 3A). En presencia de sal (25 g/L de NaCl) el microorganismo fue capaz de crecer entre 4 y 49 °C (Fig. 3B), por lo tanto el microorganismo *Vibrio sp* se adaptó a menores temperaturas a medida que aumentó la concentración de NaCl en el medio de cultivo.

Es importante destacar que muchos estudios realizados en microorganismos psicrófilos y psicotolerantes, han revelado sus amplios rangos de adaptación a distintas temperaturas, mediante alteraciones en sus proteínas y lípidos de membranas, los sistemas de generación de energía, la síntesis de proteínas y sus enzimas hidrolíticas (Groudieva y col., 2003). Por otro lado, como Morita (1975) define a las bacterias psicrófilas como microorganismos capaces de crecer a temperaturas menores a 20 °C que no pueden sobrevivir en temperaturas mayores a 25 °C, y también define a los psicotolerantes como microorganismos capaces de crecer a temperaturas menores o iguales a 5 °C, sin embargo sus temperaturas óptimas de crecimiento son sobre 20 °C. Tomando en cuenta las definiciones anteriores, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *Vibrio sp.* es un microorganismo psicotolerante capaz de crecer en un amplio rango de temperatura y para ello es necesario que sus lípidos y proteínas se modifiquen.

IX.2.2 Efecto de la sal en el crecimiento del *Vibrio sp.*

Una vez que el microorganismo *Vibrio sp.* se adaptó al medio definido, se determinaron de las concentraciones óptimas de sal para su crecimiento. Para lograr este objetivo se creció el microorganismo a distintas concentraciones de sal: 0 sal (0 g/L NaCl y de KCl), cloruro mínimo (0 g/L NaCl y 0,55 g/L KCl), 10, 25, 50, 100 y 150 g/L de NaCl. Las adaptaciones del microorganismo se realizaron a una temperatura óptima de crecimiento de 30 °C la cual se definió en la sección VIII.2.1.

El microorganismo fue capaz de crecer y adaptarse desde 0 a 100 g/L de NaCl. Estos resultados sugieren que el microorganismo es un halotolerante con la capacidad de adaptarse a un amplio rango de salinidad. Además, interesantemente se observó que la pigmentación roja es proporcional a la concentración de sal en el medio de cultivo (Fig. 4A). Al realizar los aislamientos de estos cultivos en placas con medios sólidos también se observó un cambio en la pigmentación de las colonias dependiendo de la concentración de sal (Fig. 4B).

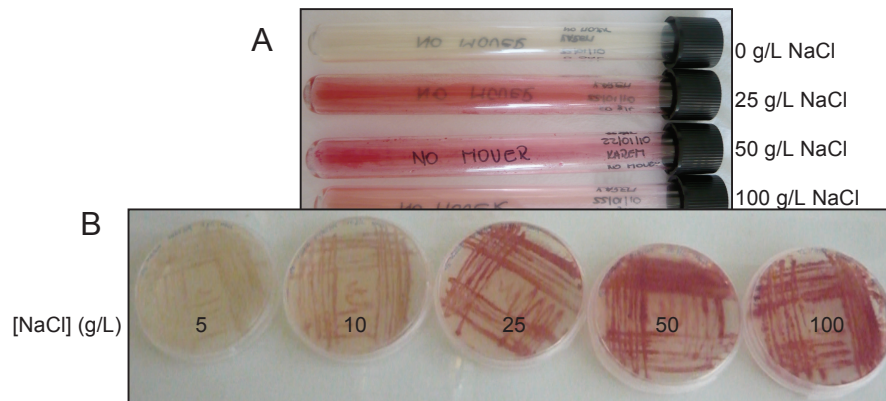


Fig. 4: Adaptación de *Vibrio sp.* a distintas concentraciones de NaCl. A, adaptación del microorganismo *Vibrio sp.* al medio líquido definido en distintas concentraciones de NaCl, mostrando la formación del pigmento rojo. B, crecimiento en placas del microorganismo *Vibrio sp.* en el medio sólido definido a diversas concentraciones de NaCl.

Una vez adaptados los microorganismos a las distintas concentraciones de sal, se realizaron las curvas de crecimiento según lo descrito en la sección VIII.2 para ver el efecto de la sal en los números de células y en la velocidad de crecimiento.

Se observó que el microorganismo fue capaz de crecer hasta los 100 g/L de NaCl. Las fases de adaptación de los cultivos fueron similares en las salinidades 0 a 50 g/L de NaCl, con tiempos de adaptación de aproximadamente 2,5 a 3 horas, mientras que a 100 g/L de NaCl el período de adaptación tardó el doble del tiempo que el resto de los cultivos (Fig. 5). A pesar de la variación en los tiempos de adaptación, los cultivos mostraron números celulares altos (números celulares mayores a 10^9 células/mL). Finalmente, el microorganismo no fue capaz de crecer en concentraciones sobre los 150 g/L de NaCl (Fig. 5).

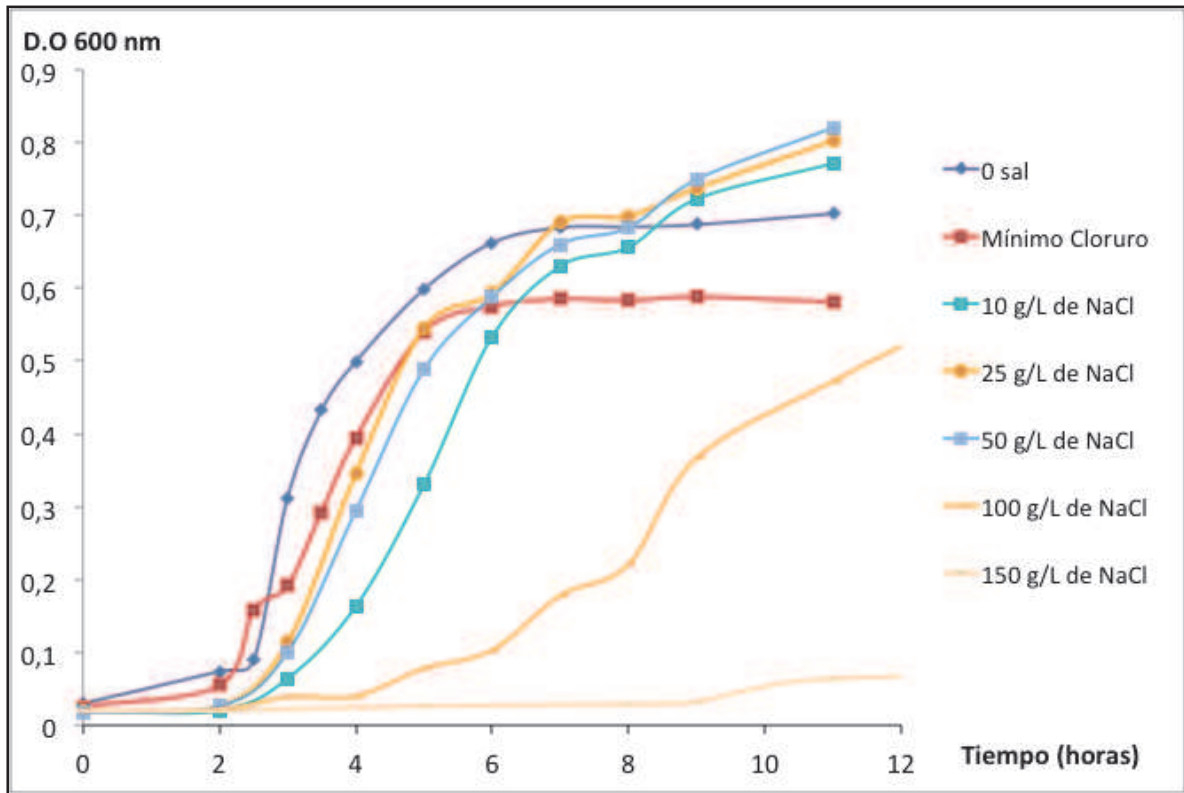


Fig. 5: Curva de crecimiento del microorganismo *Vibrio sp.* crecido en medio líquido definido con distintas concentraciones de NaCl y a 30 °C.

La velocidad de crecimiento de los cultivos disminuyó levemente al aumentar la concentración de sal (Fig. 5). Se determinaron los tiempos generacionales los cuales fueron entre 1,57 y 2,12 h en los rangos de salinidad de 0 a 50 g/L NaCl, y frente a los 100 g/L de NaCl el tiempo generacional prácticamente se duplicó con respecto a los 10, 25 y 50 g/L de NaCl (Tabla 4). Este análisis se realizó obteniendo la ecuación de la recta de las fases exponenciales de todas las curvas de crecimiento (Fig. 5), donde la pendiente corresponde a la constante de crecimiento (K), la cual permitió determinar el tiempo generacional (Tg) de los cultivos por medio de la siguiente ecuación (ecs. IX.1)

$$T_g = \text{LOG}2/K, \quad (\text{ecs IX.1})$$

siendo K la constante de velocidad de crecimiento.

Tabla 5: Constante de crecimiento y tiempo de duplicación de *Vibrio sp.* crecido en distintas concentraciones de sal (datos obtenidos a partir de las fase exponencial de la curva de crecimiento respectivas).

Salinidad	K, constante de crecimiento (1/hr)	Tg, tiempo generacional (hr)
0 sal	0,1915	1,5720
Mínimo cloruro	0,1609	1,8709
10 g/L	0,1502	2,0042
25 g/L	0,1400	2,1502
50 g/L	0,1414	2,1289
100 g/L	0,0574	5,2444

A partir de los datos se determinó que el tiempo generacional en ausencia de NaCl es menor a las 2 horas, el cual se alcanzó con los cultivos crecidos en 10, 25 y 50 g/L. Cuando el microorganismo se creció en 100 g/L de NaCl el tiempo de duplicación aumentó aproximadamente 5 veces con respecto a los cultivos crecidos en ausencia de sal, mostrando que la concentración de NaCl óptima de crecimiento es hasta los 50 g/L (Tabla 4).

IX.3 Adaptación inmediata del microorganismo *Vibrio sp.*

Otro de los análisis realizados fue la capacidad de adaptación inmediata del microorganismo a la sal. Para lograr este objetivo se creció un cultivo en ausencia de sal hasta el comienzo de su fase exponencial (densidad óptica alrededor de 0,3 a 600 nm), y se realizaron trasposos a medios con distintas concentraciones de sal (0, cloruro mínimo, 10, 25, 50 y 100 g/L de NaCl), según lo descrito en la sección VIII.2.

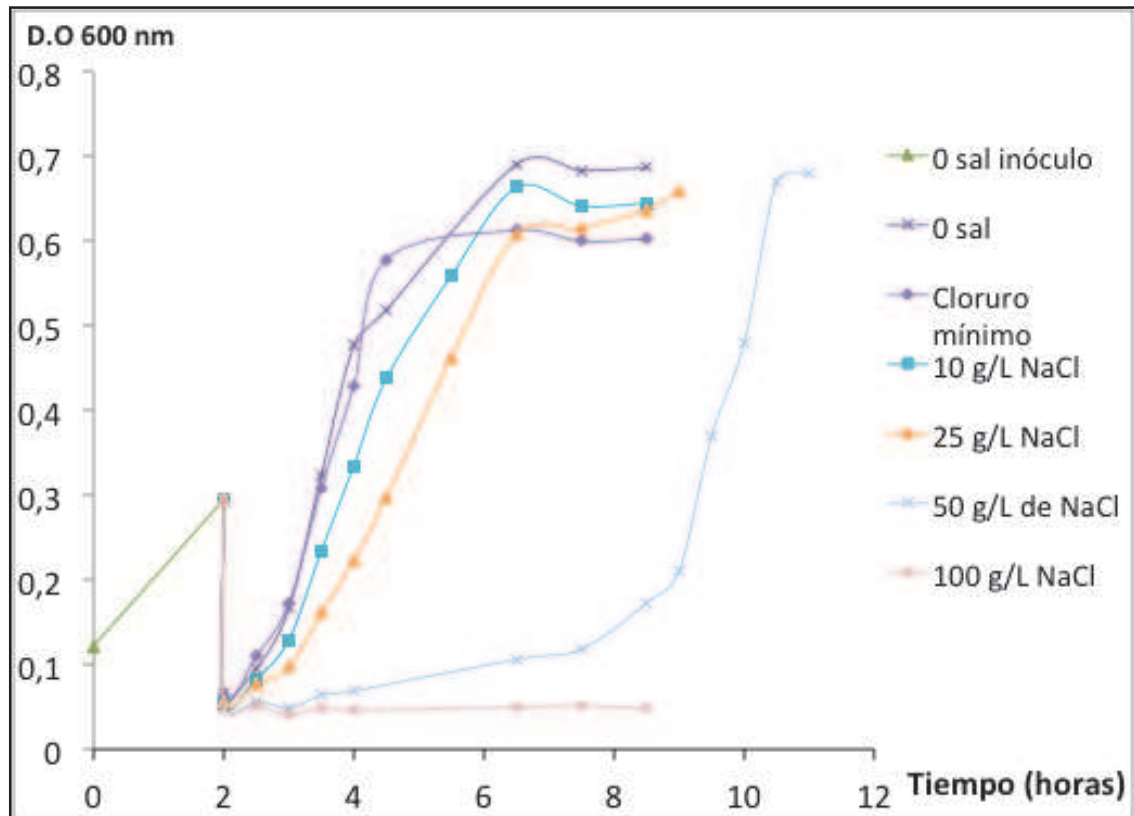


Fig. 6: Curva de crecimiento de *Vibrio sp.* crecido en ausencia de NaCl y traspasado a distintas concentraciones de NaCl y a 30 °C.

Se observó que el microorganismo crecido en ausencia de sal fue capaz de adaptarse rápidamente hasta 25 g/L de NaCl (Fig. 6). El microorganismo también fue capaz de adaptarse a 50 g/L de NaCl, pero en un tiempo mayor que los cultivos traspasados a menores concentraciones de sal. Finalmente, este microorganismo no fue capaz de adaptarse a 100 g/L de NaCl.

IX.4 Efecto de la concentración de NaCl en la movilidad del *Vibrio sp.*

IX.4.1 Efecto de la salinidad en la movilidad del *Vibrio sp.* crecido a 30 °C.

Debido a que los datos de crecimiento se determinaron mediante densidad óptica y conteo celular, se observó de manera preliminar que el microorganismo presentó movilidad en presencia de sal. Este fenómeno de movilidad se observó cuando el microorganismo fue crecido hasta 100 g/L de NaCl, y por otro lado, en concentraciones superiores a 100 g/L de NaCl se observó la formación de estructuras filamentosas sin movilidad (imágenes no mostradas).

Para confirmar estos resultados se realizaron ensayos de movilidad en placas descritos en la sección VIII.4, basados en la investigación realizada por Roeßler y col (2000). Se observó que el microorganismo presentó movilidad tipo “Swarming” sólo en presencia de sal, específicamente con 25 g/L de NaCl. A mayores concentraciones de NaCl (hasta los 100 g/L de NaCl) se observó igualmente movilidad tipo “Swarming” (datos no mostrados). En cambio en ausencia de sal se observó sólo el crecimiento de una colonia sin pigmentación (Fig. 7).

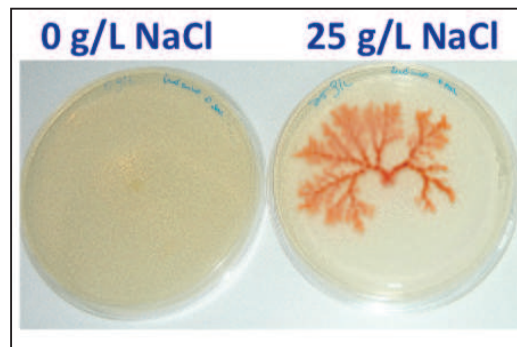


Fig. 7: Movilidad tipo “Swarming” de *Vibrio sp.* a las 72 horas de crecimiento. El microorganismo se creció en medio líquido en ausencia y presencia de sal (25 g/L de NaCl), posteriormente se inoculó en placas con similares concentraciones de sal y se incubaron durante 72 horas a 30 °C.

Para que un microorganismo presente movilidad tipo “swarming” es necesario la presencia de flagelo, y también requiere un aumento en las interacciones célula-célula y la presencia de surfactantes (Kearns, 2010). Estos surfactantes son sintetizados y secretados por las bacterias que realizan este tipo de movilidad, y se definen como moléculas anfipáticas que reducen la tensión entre el sustrato y la bacteria, permitiendo una difusión sobre la superficie. Por ejemplo, se ha descrito que *Bacillus subtilis* y *Serratia liquefaciens* secretan potentes surfactantes tales como lipopéptidos, surfactina y serrawettin. Además, se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* secreta rhamnolípidos como surfactante para la movilidad tipo “swarming” (Kearns 2010).

El microorganismo también presentó movilidad tipo “Swimming”, y se observó un halo pigmentado (anillo quimiotáctico) al inocularse en el centro de la placa en presencia de NaCl (Fig. 8). En cambio, el cultivo crecido en ausencia de NaCl no presentó movilidad, y al igual que en los ensayos “Swarming” se observó una colonia sin pigmentación en el centro de la placa (Fig. 8). Asimismo, se observó la presencia del anillo quimiotáctico en concentraciones mayores de NaCl, hasta 100 g/L de NaCl (datos no mostrados).

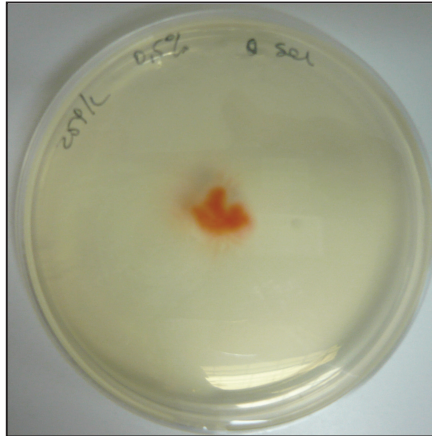


Fig. 9: Ensayos de movilidad tipo “swimming” en *Vibrio* sp. no adaptado a crecer en presencia de sal. El microorganismo se creció en ausencia de sal y se inoculó en el centro de la placa con medio de cultivo con 25 g/L de NaCl.

La movilidad tipo “swimming” tiene relación directa con la presencia de flagelo, ya que es mediado por la rotación de filamentos flagelares. En la mayoría de las bacterias, los sistemas de movilidad son dependientes de una fuerza motora de protones. Existen algunas excepciones tales como la cepa *Bacillus YN-1* y los *Vibrios* marinos, ya que en ambos microorganismos la movilidad es causada flujo de iones sodio. En estos casos el sodio es considerado un análogo de los protones que causan la fuerza motora para la movilidad (Willey y col., 1987).

IX.4.2 Efecto de la salinidad en la movilidad del *Vibrio* sp. a bajas temperaturas.

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de la temperatura en la movilidad del *Vibrio* sp., para ello se utilizaron cultivos adaptados a concentraciones de sal de 0 y 25 g/L de NaCl, y a bajas temperaturas (4 y 17 °C) como inóculos, además se utilizaron placas con medios sólidos con las mismas concentraciones de sal que sus respectivos inóculos. No se observó crecimiento celular cuando el microorganismo se incubó a 4 °C (datos no mostrados). Sin embargo, a 17 °C se observó movilidad tipo “swimming” pero en un tiempo de incubación mayor (96 hrs) con respecto a la temperatura óptima de crecimiento (Fig. 8). Además, se observó a 25 g/L un halo de crecimiento mientras que en ausencia de sal no se observó movilidad ni pigmentación (Fig. 10).

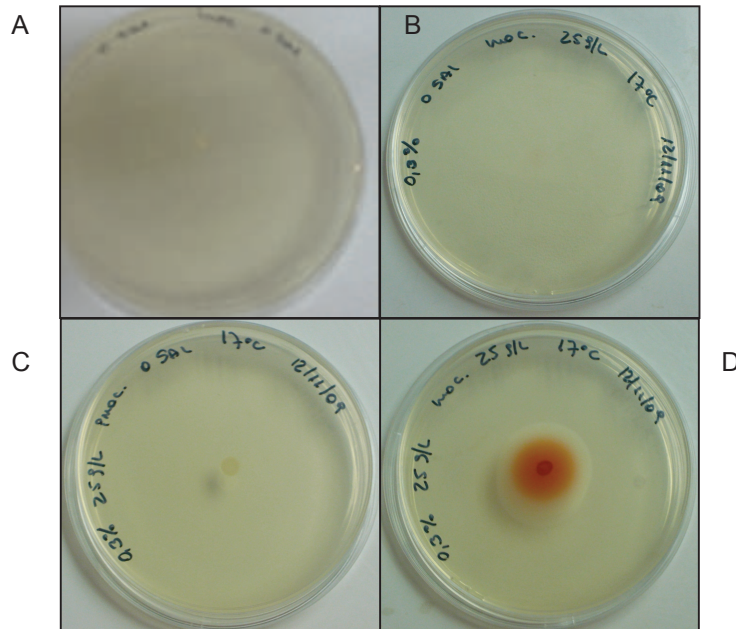


Fig. 10: Movilidad tipo “swimming” en *Vibrio* sp., adaptado a 17 °C. A, cultivo crecido en ausencia de sal e inoculado en placa en ausencia de sal. B, cultivo crecido en ausencia de sal e inoculado en placa con 25 g/L de NaCl. C, cultivo crecido en 25 g/L NaCl e inoculado en placa en ausencia de sal D, cultivo crecido en 25 g/L de NaCl e inoculado en placa con 25 g/L NaCl

Por lo tanto, es posible decir que el microorganismo *Vibrio* sp. presentó movilidad sólo hasta los 17 °C en presencia de sal (25 g/L), a concentraciones mayores de NaCl (50 y 100 g/L) el microorganismo presentó igualmente movilidad pero sólo hasta los 17 °C (datos no mostrados). En ausencia de sal el microorganismo no presentó movilidad a bajas temperaturas analizadas (4 y 17 °C).

Finalmente, una vez realizados todos los ensayos de movilidad descritos en las secciones IX.4.1 y IX.4.2, se realizaron pruebas con sales distintas a NaCl tales como NaBr y Na₂SO₄, y demostramos que este fenómeno es dependiente de los iones cloruro (datos no mostrados). Se observó que al reemplazar el ión cloruro por los iones bromuro y sulfato sólo fue posible apreciar una colonia blanca en el centro de la placa y no se observó un anillo quimiotáctico. Este fenómeno también se ha observado en otro microorganismo halófilo, *Halobacillus Halophilus*, que presentó movilidad y flagelo, con dependencia de los iones cloruro. Además, se explica que esta dependencia tiene relación con señales intracelulares para la transcripción de los genes flagelares (Roeßler y col., 2000).

IX.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Mediante microscopía electrónica de transmisión se observó la forma del microorganismo, agrupaciones, elementos celulares densos al paso de los electrones y la presencia de flagelos.

Los microorganismos crecidos en ausencia de sal presentaron una forma celular alargada, y en algunas ocasiones se observaron células formando filamentos. Las células no presentaron flagelo, pero se observaron gránulos densos al paso de los electrones (Fig. 11).

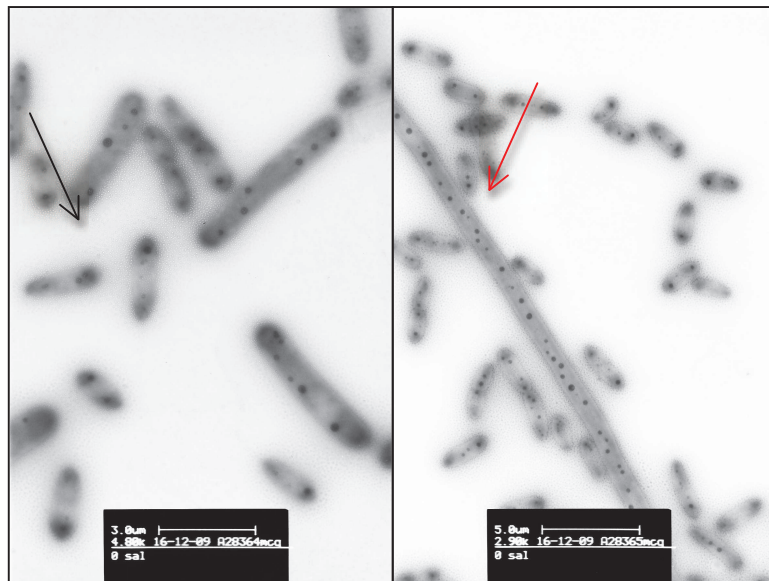


Fig. 11: Imagen obtenida de *Vibrio sp.* crecido en ausencia de NaCl mediante TEM. La flecha negra indica la presencia de gránulos densos al paso de los electrones, y la flecha roja indica las células en forma de filamento.

La composición de los gránulos densos al paso de los electrones no fue identificada, pero es muy probable que sean gránulos de polifosfato (poliP), según lo descrito por algunos autores. Por ejemplo, Remonsellez, 2008 y Kornberg y col., 1999, ambos autores describen a estos gránulos como inclusiones citoplasmáticas que suelen contener material de reserva de carbono, nitrógeno o fósforo en forma polimerizada. Además Kornberg y col., 1999 explicó que los polifosfatos inorgánicos son polímeros lineales formados por decenas o cientos de ortofosfatos (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido. Estas moléculas se han encontrado en todos los seres vivos en los que se los ha estudiado: bacterias, arqueas, hongos, protistas, plantas y animales. De especial interés es el hecho que los poliP podrían ser considerados como componentes prebióticos. En bacterias, los poliP son principalmente

citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o en forma soluble. En eucariontes, los poliP se encuentran en distintos compartimientos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kornberg y col., 2009; Remonsellez y col., 2006).

Por todo lo anterior, es posible decir que estos gránulos (poliP) probablemente en las células del *Vibrio sp.* se están comportando como componentes con función de reserva energética, por ejemplo: la de sustituir ATP en reacciones de fosforilación, reserva de fosfato, quelante de metales y tampón para álcalis. Conjuntamente, los poliP están cumpliendo un rol importante en la respuesta ante ciertos factores de estrés, y en este caso nuestro microorganismo se encuentra sometido a estrés por la ausencia absoluta de NaCl (Kornberg y col., 1999). La enzima responsable de la síntesis de los poliP es la PoliP kinasa (PPK), la cual ha sido encontrada tanto en *Escherichia coli* como en *Vibrio cholerae*, esta enzima sintetiza estos gránulos sólo en ausencia de sal. Estos gránulos de polifosfatos, al igual que los mecanismos de respuesta anteriormente descritos, tienen aplicaciones en la industria, tales como el uso de éstos en la fabricación de leches (“milk shake”), en los alimentos los utilizan como secuestrantes (ligantes) de metales, como estabilizantes y como emulsificantes. También son usados para evitar la pérdida de agua durante el procesamiento y almacenamiento de los productos. Una de las gran ventajas de estos compuestos es que no se conoce ningún riesgo que pueda causar algún problema a las personas.

Los microorganismos crecidos en presencia de 25, 50 y 100 g/L de NaCl presentaron por un lado una forma bacilar sin la formación de agrupaciones y por otro lado flagelos polares (Fig. 12).

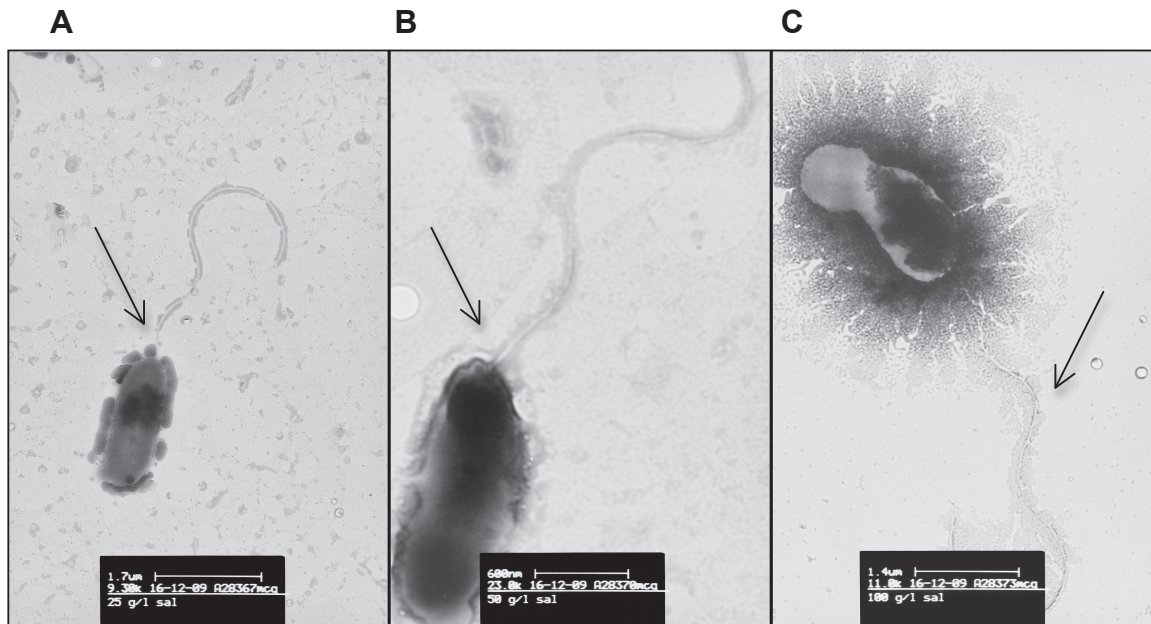


Fig. 12: Imagen obtenida de *Vibrio sp.* crecido en presencia de NaCl mediante TEM. A, B, C, corresponden *Vibrio sp.* crecido en presencia de 25, 50, y 100 g/L de NaCl, respectivamente. Las flechas indican la presencia de flagelo en todas las salinidades analizadas.

Nuestros resultados indican que las movilidades, tipo “swarming” y “swimming”, observadas cuando *Vibrio sp.* se creció en presencia de NaCl (Figs. 7 y 8), podrían tener una relación directa con la presencia de este único flagelo polar en condiciones similares (Fig. 12). El flagelo es la estructura que genera motilidad en muchos procariontes del Dominio *Bacteria* y del Dominio *Archaea*. El flagelo no sólo es una estructura utilizada para la movilización, sino que también tiene un papel importante en la unión a superficies, en la formación de biopelículas y en la patogenicidad (Ottemann y Miller, 1997; Pratt y Kolter, 1998).

Además, la disposición de los flagelos en la célula varía según el tipo de bacteria (Thomas y col., 2001). En nuestro caso la cepa *Vibrio sp.* analizada es monotrica, ya que tienen sólo un flagelo que se sitúa en el polo de la célula (Fig. 12), y por lo tanto, se denomina flagelo polar. A pesar de las distintas ubicaciones que pueda tener en una célula, el flagelo está constituido por tres parte: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. El filamento es una estructura de aproximadamente 20 nm de ancho y hasta 15-20 µm de largo. Este filamento está formado por un cilindro helicoidal hueco constituido por una sola proteína, la flagelina, que varía de 30 a 60 kDa dependiendo del microorganismo (Thomas y col., 2001).

IX.6 Efecto de la concentración de NaCl en la pigmentación del *Vibrio sp.*

IX.6.1 Efecto de la salinidad en la pigmentación del *Vibrio sp.* a 30 °C.

Durante los ensayos realizados anteriormente para estudiar los mecanismos de adaptación y fisiológicos del *Vibrio sp.*, se pudo observar la presencia de un pigmento rojo (Figs. 1, 2, 4, 7, 8, 9 y 10).

Cuando se crecieron los cultivos de *Vibrio sp.* en distintas concentraciones tales como 0, cloruro mínimo, 10, 25, 50 y 100 g/L de NaCl, en condiciones óptimas de temperatura (30 °C), se determinó que la producción de este pigmento tiene relación directa con el aumento de la salinidad en el medio de cultivo, lo que se observó hasta los 50 g/L de NaCl (Fig. 13).

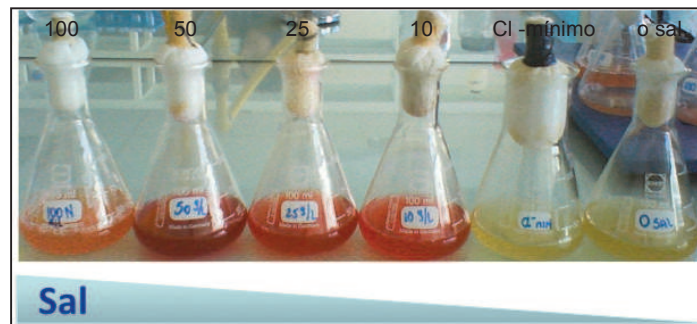


Fig. 13: Efecto de la concentración de NaCl en la pigmentación del *Vibrio sp.* a 30 °C.

La producción de este pigmento y el verdadero rol fisiológico en este microorganismo es desconocido, pero en *Serratia* el rol es ser un arma química para eliminar a los microorganismos competidores o a posibles depredadores.

Las aplicaciones de este pigmento están asociadas a la industria farmacéutica, ya que se ha demostrado que el prodigiosin es un potente antibiótico y que no sólo afecta a las bacterias, sino también a los eucariotas. De hecho se están estudiando sus posibles aplicaciones como medicamento antitumoral ya que induce apoptosis en las células cancerosas, o como fármaco inmunosupresor en los procesos de trasplante de órganos.

Basados en el trabajo publicado por Roeßler y col (2000), se realizó un ensayo utilizando el medio líquido definido en la sección VIII.1, pero en el crecimiento de los cultivos se reemplazó el NaCl por NaBr (25 g/L) y Na₂SO₄ (25 y 50 g/L). Estas experiencias mostraron que a pesar de ver crecimiento

celular en estas sales no se generó pigmento. Por lo tanto, la pigmentación de *Vibrio* sp. es dependiente específicamente de los iones de cloruro (Fig. 14).

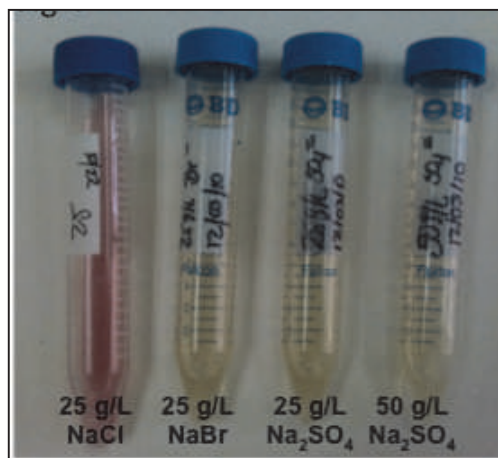


Fig. 14: Efecto de sales sin iones cloruro en la pigmentación del *Vibrio* sp. a 30 °C

En el transcurso de esta tesis se identificó el pigmento rojo de *Vibrio* sp. (Esquivel, 2010). En este estudio se determinó que este pigmento corresponde a compuestos apolares, pertenecientes a la familia de las prodigininas, específicamente dos de ellos corresponden a Cicloprodigiosin y Prodigiosin. La ocurrencia de los pigmentos Prodigioseno, Undecilprodiginina, y Metildodecilprodiginina no se confirmó ni se descartó, ya que para realizar su identificación es necesario realizar otros estudios estructurales, como resonancia magnética nuclear de protones y carbono, espectroscopia infrarroja, entre otros, y confirmar los resultados obtenidos por medio de espectrometría de masas.

IX.6.2 Efecto de la temperatura en la pigmentación del *Vibrio* sp.

Se analizó el efecto de distintas temperaturas de crecimiento (4, 17, 26 y 40 °C) en la generación de pigmento de *Vibrio* sp. los resultados muestran que el microorganismo generó menos pigmentación a bajas temperaturas, en comparación de las experiencias a 26 y 40 °C (Fig. 15). Además, se confirmó que en ausencia de NaCl, *Vibrio* sp., no produce pigmentación sin importar la temperatura de crecimiento (Fig. 15).

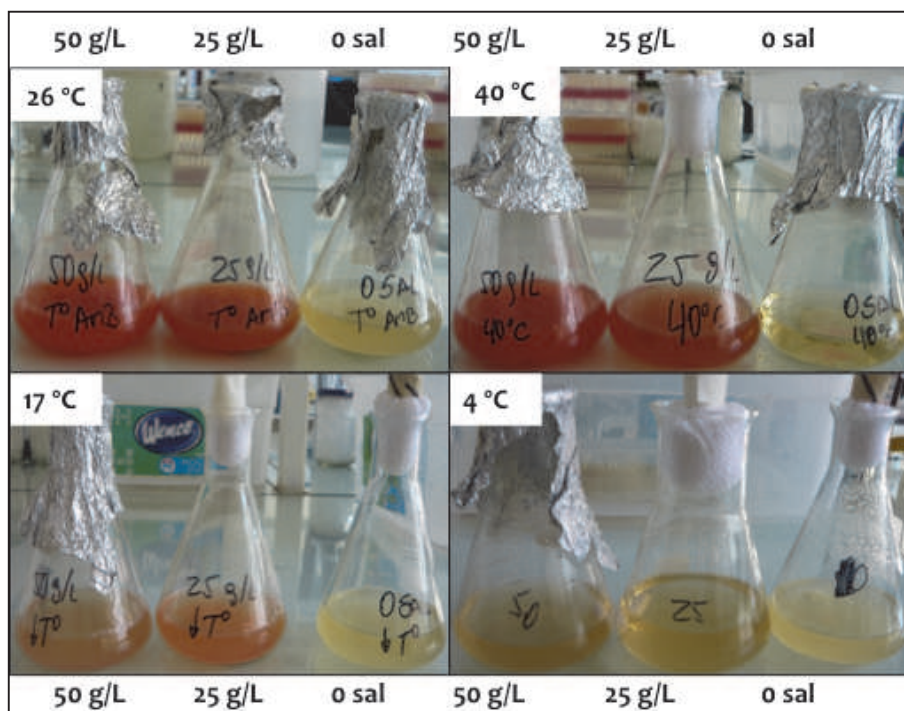



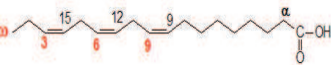
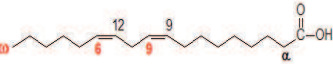



Fig. 15: Efecto de la temperatura en la pigmentación de *Vibrio* sp. El microorganismo se creció en el medio definido (sección VIII.1) a cuatro temperaturas distintas, 4, 17, 26 y 40 °C. Cada temperatura de crecimiento fue ensayada en ausencia y en presencia de 25 y 50 g/L de NaCl.

La función de este pigmento no ha sido descrita en microorganismos del género *Vibrio* aislados desde salares. Sin embargo, algunos estudios previos hechos en el microorganismo *Serratia* spp., han indicado que el prodigiosin es una molécula altamente hidrofóbica y está posiblemente asociada con la envoltura celular (Williamson y col., 2006). Además, el prodigiosin es un metabolito secundario producido por otras bacterias tales como *Serratia Marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrous*, *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra*, *Rugamonas rubra* y algunas bacterias gram positivas (Khanafari y col., 2006).

IX. 7 Determinación de ácidos grasos en *Vibrio* sp.

El microorganismo *Vibrio* sp. presentó los siguientes ácidos grasos (Tabla 5) cuando se creció a altas temperaturas (37 °C) y a bajas temperaturas (10 °C)

Tabla 6: ácidos grasos obtenidos de *Vibrio sp.* crecido en caldo marino a 37 °C y a 10 °C

Temperatura de crecimiento	Ácido Graso poliinsaturado	Nomenclatura	Abundancia (%)	Serie	Estructura Química
10 °C	Ácido Linoléaidico	C18:2n6t	0	ω6	
	Ácido Linolénico	C18:3n6	0	ω3	
	Ácido Linoleico	C18:2n6c	0,71	ω6	
37 °C	Ácido Linoléaidico	C18:2n6t	22,08	ω6	
	Ácido Linolénico	C18:3n6	0,05	ω3	
	Ácido Linoleico	C18:2n6c	0,27	ω6	

La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico en relación con la sumatoria de áreas de todos los ácidos grasos de C9 a C20. La nomenclatura adoptada para los ácidos grasos es: el número anterior a los dos puntos indica el número total de carbonos de la molécula, el número posterior indica el número de dobles ligaduras, el número que sigue a w (en caso de existir) indica el carbono inicial de la doble ligadura seguido de la palabra cis o trans para la correspondiente configuración.

De acuerdo a la Tabla 5 es posible ver un mayor % abundancia del ácido linoléaidico a mayor temperatura, lo cual ayudaría a mantener la permeabilidad de la membrana, este ácido corresponde a la estructura conjugada del ácido linoleico (conformación *trans*). Estos resultados son similares a los obtenidos por diversos autores, tales como Morita y col., (1993) en el que la síntesis de este ácido, cuya conformación es *trans*, es dependiente de la temperatura de crecimiento en un *Vibrio* marino. (Morita y col., 1993), por lo tanto es posible

comparar estos resultados obtenidos por Morita con los nuestros que muestran la presencia del ácido linoleico a mayor temperatura. Asimismo, fue posible observar un aumento del ácido graso $\omega 6$ cuya conformación es cis a menor temperatura, lo que ayudaría al microorganismo a tener mayor fluidez en la bicapa lipídica. Por ejemplo, un trabajo realizado por Miller (1985), correlacionó el efecto de la temperatura y la concentración de NaCl en la composición lipídica de un microorganismo halotolerante, perteneciente a la familia de los *Vibrionaceae*. Además, en este trabajo se estableció que la mayoría de los microorganismos alteran su composición lipídica frente a cambios de temperaturas. Estas alteraciones tienen relación con la mantención de la fluidez de la membrana frente a cambios de temperaturas. Además, en el mismo trabajo se sugiere que las alteraciones en la composición lipídica de la membrana de bacterias halotolerantes tales como *Vibrio costicola* y *Pseudomonas halosaccharolytica*, inducidas por NaCl, presentaron una disminución en el contenido de fosfatidiletanolamina (PE) y un aumento en el contenido de fosfatidilglicerol (PG) (Miller, 1985). Además Okuyama y col., (1990) sugiere que algunas bacterias contienen niveles sustanciales de ácidos grasos monoinsaturados, con dobles enlaces *trans*. Los orígenes de estos ácidos son diversos, por ejemplo *Escherichia coli* incorpora estos tipos de ácidos grasos, en cambio *Vibrio cholerae* es capaz de sintetizar de novo estos ácidos. La mayoría de los microorganismos, al someterlos a cambios de temperaturas presentan un aumento en sus ácidos grasos cis-insaturados cuando las temperaturas disminuyen (Okuyama y col., 1990). Está descrito que estas alteraciones en los ácidos grasos corresponden a una regulación termoadaptativa en la fluidez de la membrana lipídica (Okuyama y col., 1990), lo cual hemos podido comprobar con nuestro microorganismo que fue crecido a bajas temperaturas, favoreciéndose la síntesis de ácidos grasos cis-insaturados.

X.8 Expresión global de proteínas en *Vibrio sp.*

Para investigar el efecto de sal sobre los cambios de expresión global de proteína, se creció el microorganismo en ausencia y en presencia de 25 g/L de NaCl. Los extractos de proteínas fueron cuantificados según lo indicado en la sección VIII.7, y se utilizó la siguiente ecuación de la recta que corresponde a la curva de calibrado (ecs IX.2).

$$y = 0,0239 x + 0,3936 \quad \text{ecs. IX.2}$$

Una vez cuantificadas las proteínas, se realizó primeramente una electroforesis monodimensional de proteínas (SDS-PAGE), para tener una visión general del perfil proteico del microorganismo *Vibrio sp.* en ausencia y en presencia de 25 g/L NaCl (Fig. 16).

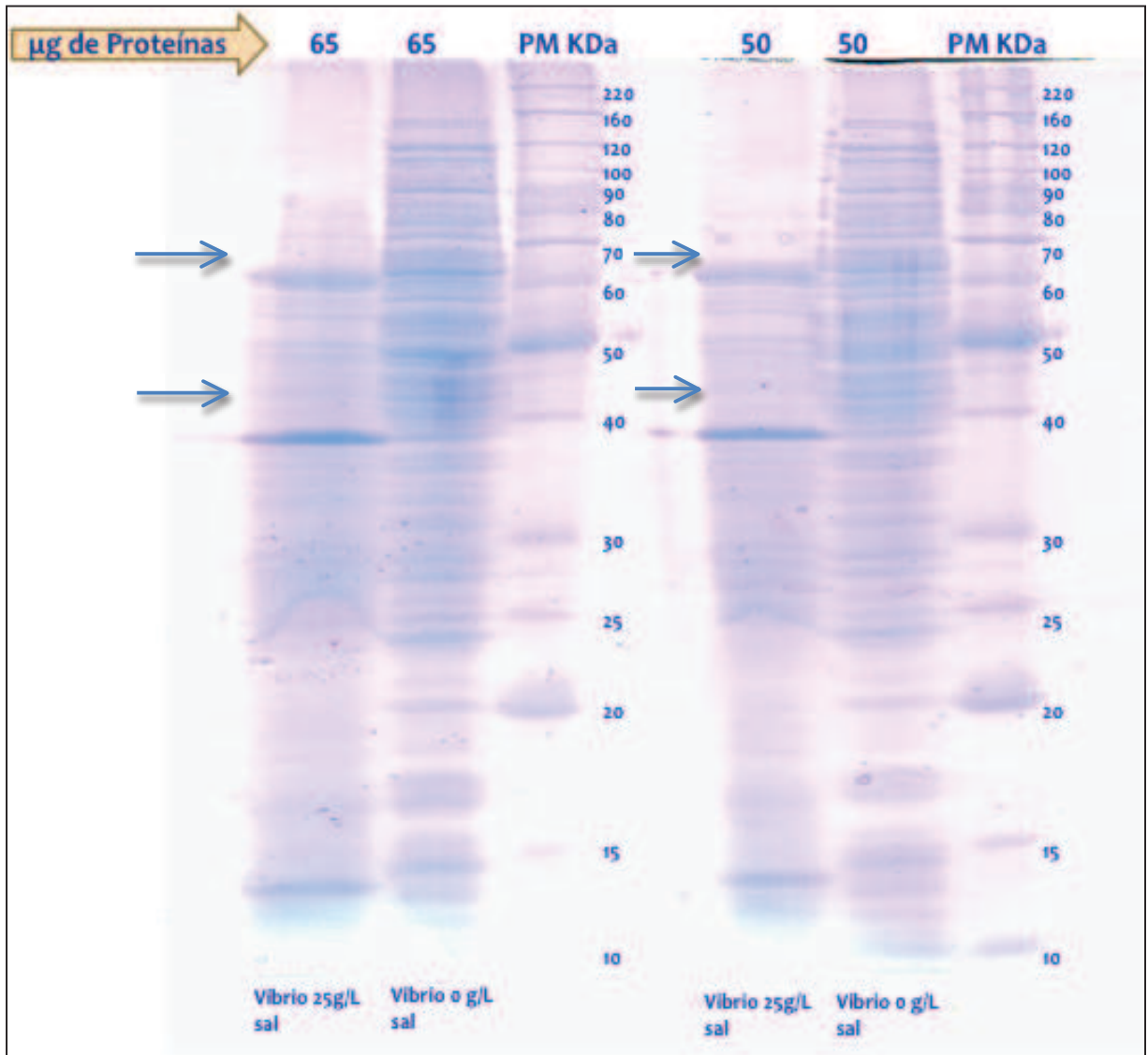


Fig. 16: Perfil de proteínas de *Vibrio sp.* en un gel SDS-PAGE. En los geles se cargaron 65 y 50 µg de proteínas provenientes de cultivos crecidos en medio definido (sección VIII.1) en ausencia y en presencia de 25 g/L de NaCl. Las flechas indican la sobreexpresión de proteínas de alrededor de 60 y 40 KDa en presencia de NaCl.

En el gel SDS-PAGE se observó claramente una diferencia en la expresión global de proteínas al comparar ambos extractos crudos de *Vibrio sp.* (0 y 25 g/L NaCl) (Fig. 16). En presencia de 25 g/L NaCl se detectó una sobreexpresión de un grupo de proteínas entre 60 y 40 KDa de peso molecular. Por otro lado, en el extracto proveniente del cultivo crecido en ausencia de NaCl se observó claramente una mayor cantidad de proteínas de alto peso molecular (Fig. 16).

Estos resultados fueron corroborados realizando una electroforesis bidimensional (2DE) de acuerdo a lo detallado en la sección VIII.7.

Primeramente las proteínas fueron extraídas con el llamado buffer de lisis, cuyos componentes tienen que convertir todas las proteínas en una conformación simple, previniendo oxidaciones y agregación de las proteínas, además obtener proteínas hidrofóbicas en la solución, desactivando proteasas y rompiendo enlaces disulfuros y puentes de hidrógeno. Un buffer de lisis estándar contiene (López, 2007):

- Alta concentración de urea, para convertir a las proteínas en una conformación simple, obtener y mantener proteínas hidrofóbicas en la solución y evitar las interacciones proteína-proteína.
- Tiourea, para una mejor solubilización de proteínas, tales como las proteínas de membrana.
- Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF), inhibidor de proteasas que preserva a las proteínas celulares de su digestión por proteasas.
- CHAPS, detergente no iónico o Zwitteriónico que solubiliza lípidos, previene la agregación a través de las interacciones hidrofóbicas, mejorando por ejemplo la solubilización de las proteínas de membrana.
- Agentes reductores como ditionitrito (DTT), rompe los puentes disulfuros.
- Anfólitos, ayudan en la solubilización, captan los compuestos CN e inhiben las interacciones entre las proteínas de las muestras (López., 2007).

Luego se realizaron 3 tipos de experiencias para encontrar la forma óptima de obtener un extracto de proteínas del microorganismo halotolerante *Vibrio* sp., que generara una buena resolución y separación de las proteínas en los geles 2DE. Estas pruebas se realizaron con el objetivo de eliminar cualquier interferente que pudiera afectar en la focalización de las proteínas, tales como DNA, sales, lípidos, etc. Todos los ensayos se realizaron duplicados y se cargaron 2000 µg de proteínas aproximadamente. Las pruebas realizadas fueron: precipitación de proteínas con fenol ácido, uso de microcolumnas desaladoras y carga directa del extracto de proteínas.

Los resultados obtenidos al realizar la precipitación de proteínas con fenol ácido no fueron del todo positivos, ya que las proteínas no se enfocaron de buena manera, obteniéndose de esta manera una baja resolución y la presencia de “streaks” horizontales (Fig. 17).

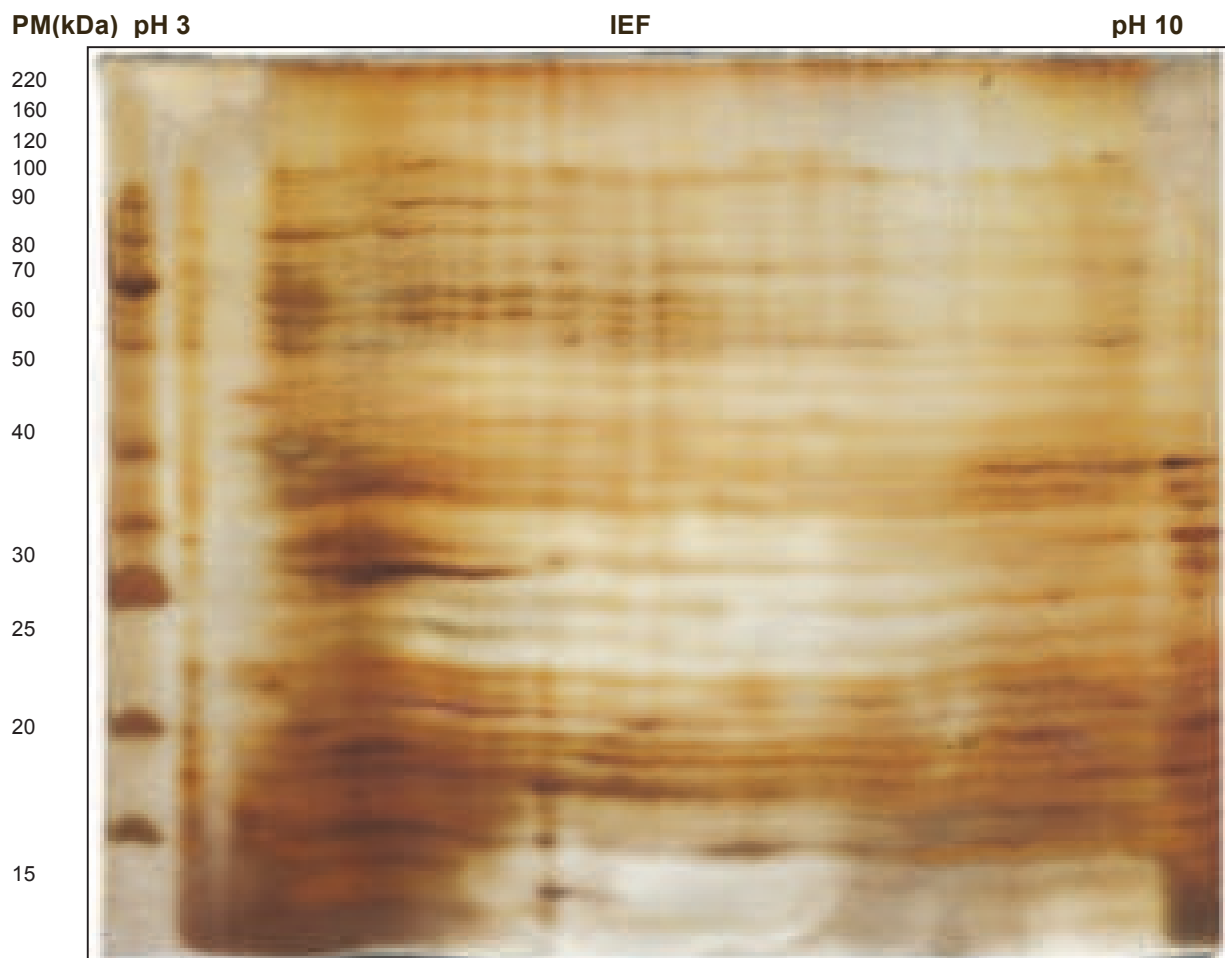


Fig. 17: Gel 2DE teñido con plata de un extracto de proteínas precipitado con fenol ácido desde un cultivo de *Vibrio sp.* crecido en ausencia de sal.

Posteriormente, se prepararon los extractos de proteínas utilizando microcolumnas, en este caso se concentraron los extractos hasta obtener 2000 µg de proteínas. Con este procedimiento se observaron mejores resultados con respecto a la precipitación de las proteínas con fenol (Fig. 18).

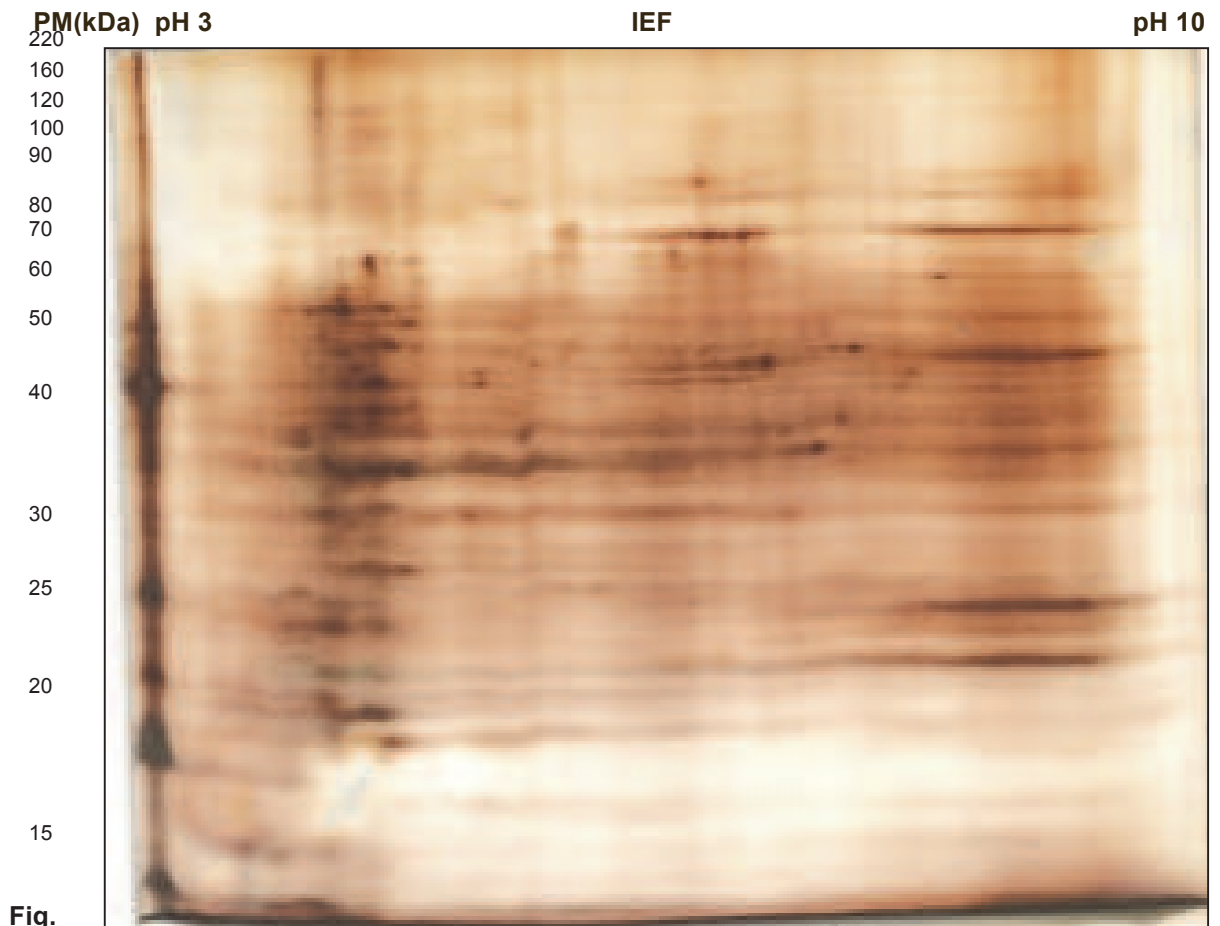


Fig. 18: Gel 2DE teñido con plata de un extracto de proteínas tratado con microcolumnas desaladoras desde un cultivo de *Vibrio sp.* crecido en ausencia de sal.

Finalmente, se utilizó el extracto de proteínas sin tratamiento previo para correr un gel 2DE. Con esta estrategia, se obtuvieron los mejores resultados, ya que fue posible identificar las proteínas enfocadas de buena forma (Fig. 19).

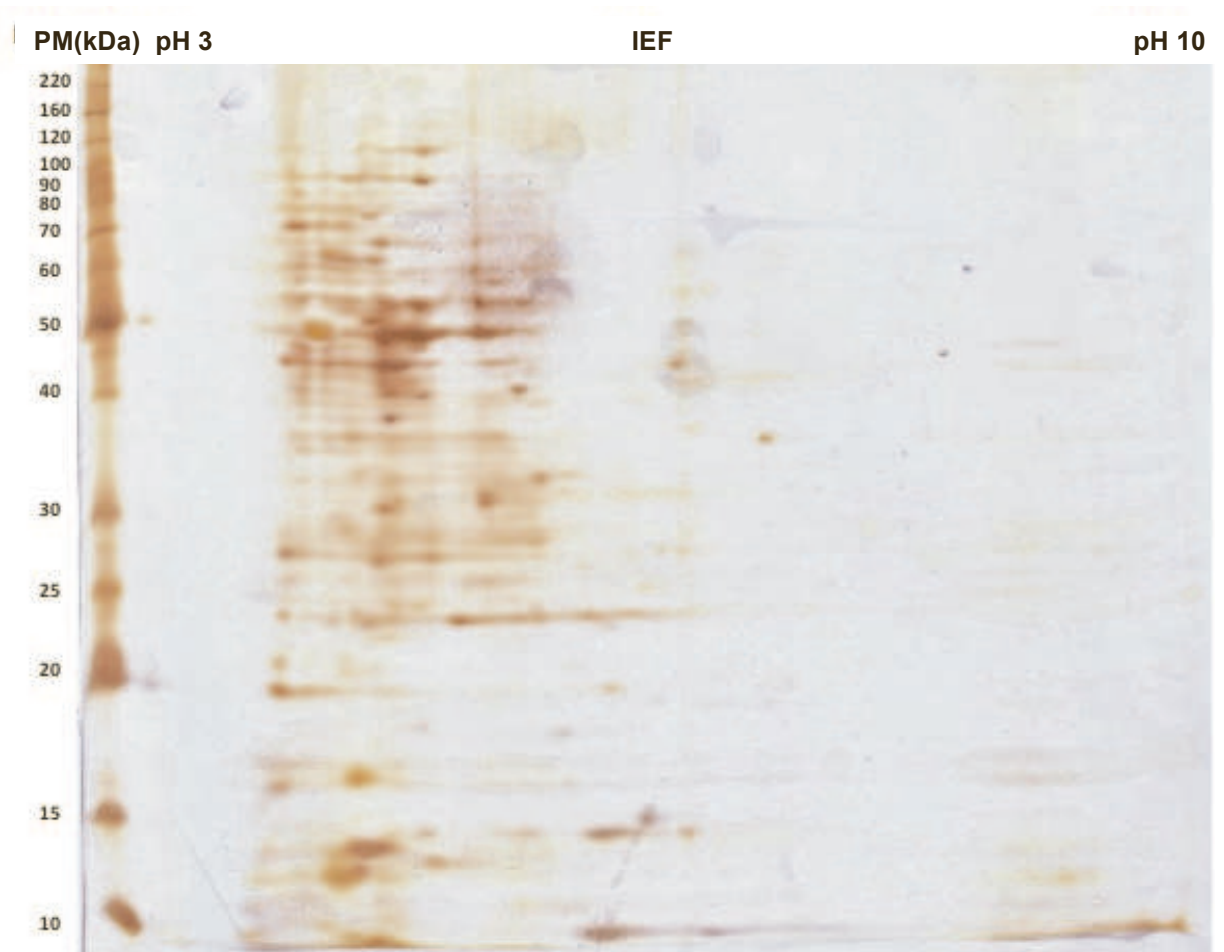


Fig. 19: Gel 2DE de un extracto de proteínas de un *Vibrio sp.* crecido en ausencia de sal cargando la muestra directamente para su focalización, y teñido con plata.

Los posibles problemas encontrados para poder poner a punto 2DE pueden ser la presencia de mucha sal en la muestra, perturbando el isoelectroenfoque IEF, produciendo líneas horizontales o verticales (streaks). La solución para obtener una buena resolución es usar concentradores o columnas para realizar diálisis. Un extracto crudo puede estar contaminado con fosfolípidos y ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos son visualizados como líneas horizontales en la parte ácida del gel. Ellos se pueden precipitar con las proteínas y luego ser removidos tratándolos con DNAsa y RNAsa. La técnica más fácil para obtener proteínas es la sonicación y/o precipitación, esta última también es usada para eliminar los lípidos (López, 2007).

El voltaje final obtenido al correr estos geles durante el IEF está definido en volt-hora, si la cantidad de volt-hora es insuficiente no se observan spots o manchas definidas sólo se observan streaks horizontales, en este caso es necesario una alta cantidad de volt-hora para las muestras con proteínas de alto

peso molecular y más proteínas hidrofóbicas. Por otro lado cuando las proteínas son enfocadas por mucho tiempo las cisteínas se oxidan y el pI de las proteínas cambian, las proteínas modificadas migran nuevamente generando streaks horizontales. Los mejores resultados son obtenidos con un enfoque lo más corto posible y con un alto voltaje (López, 2007).

Una vez que se estandarizó la estrategia para el tratamiento de los extractos de proteína, y se descartó la precipitación y la concentración se prepararon los geles bidimensionales (2DE) para estudiar los cambios de expresión de proteínas globales en ausencia de NaCl (Fig. 20) y en presencia de 25 g/L NaCl (Fig. 21)

Posteriormente, una vez puesta a punto la técnica 2DE la tinción elegida fue Azul de Coomassie Coloidal G-250, ya que el Coomassie Brilliant Blue (CBB) es un pigmento del tipo trifenilmetano aniónico, que se une de forma no covalente a los residuos de lisina de las proteínas. El límite de detección es 1 mg de proteína por "spot". Es compatible con la mayoría de métodos de análisis incluyendo MS y microsecuenciación Edman, en cambio el azul de coomassie coloidal G-250 tiene una sensibilidad similar a la tinción con plata, éste contiene sulfato de amonio el cual aumenta las fuerzas de interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y el colorante (López, 2007). Por otro lado en la tinción con nitrato de plata, el gel se impregna con este reactivo y se revela por reducción con formaldehído a pH básico, permitiendo detectar entre 5-10 ng/"spot" y es compatible con MS siempre que no se utilice glutaraldehído. Las desventajas de la tinción con plata son el rango lineal limitado que poseen (menos de un orden de magnitud) y la dificultad de automatización de los protocolos (López, 2007).

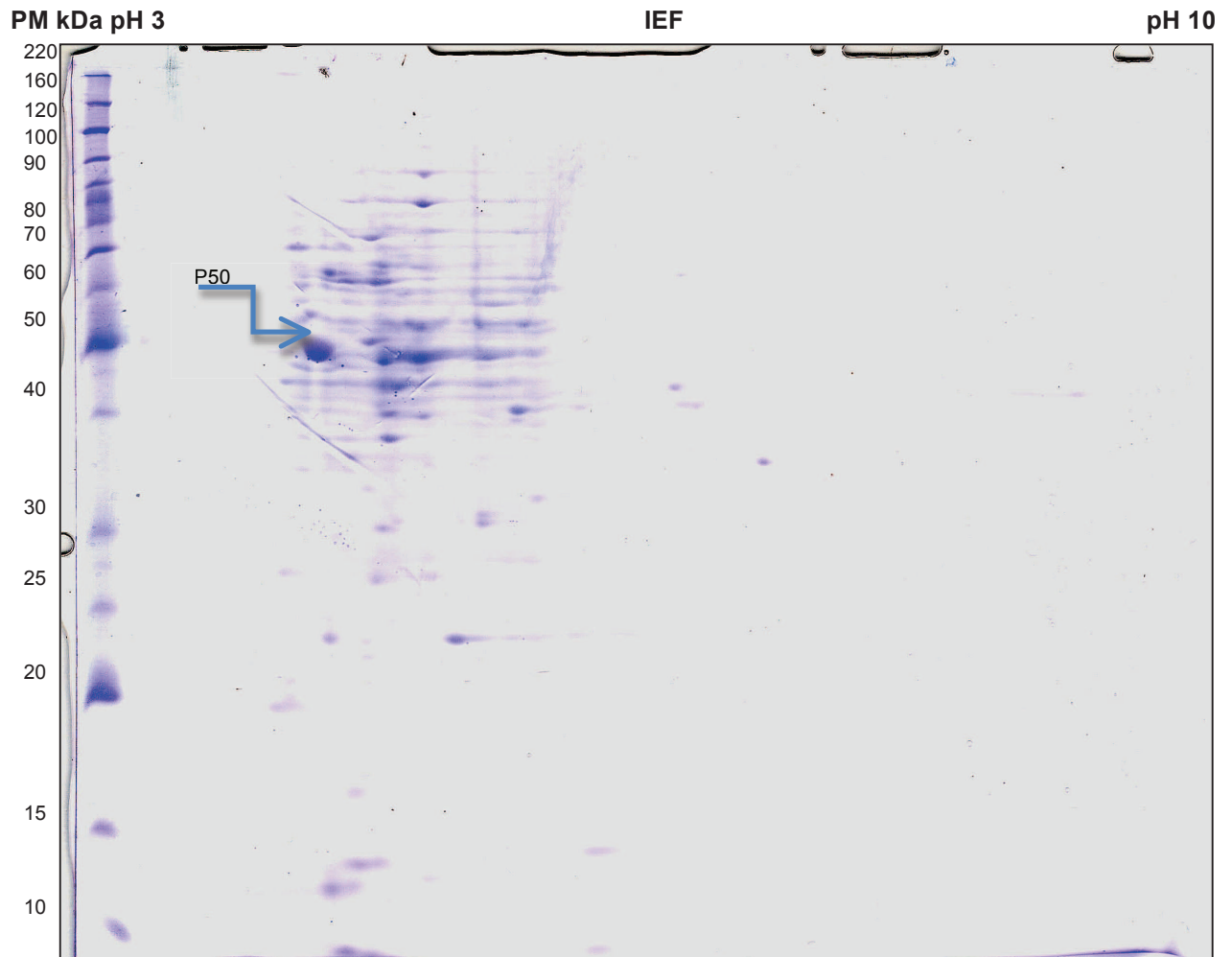


Fig. 20: Gel 2DE teñido con Coomassie G-250 de 2000 μ g un extracto de proteínas sin tratamiento de *Vibrio sp.* crecido en ausencia de NaCl. La flecha indica la sobreexpresión de una proteína de tamaño molecular aproximado de 50 kDa, P50.

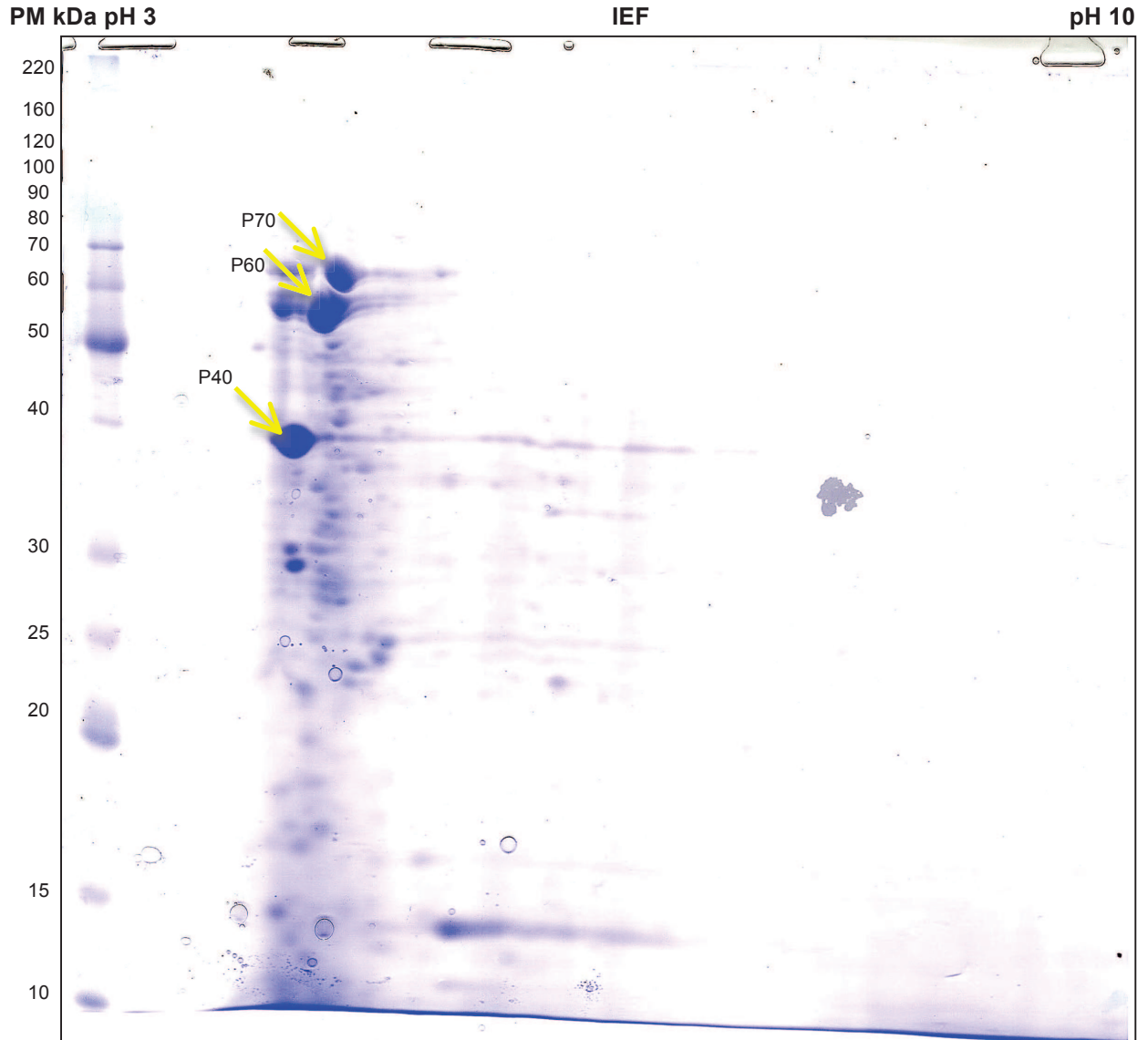


Fig. 21: Gel 2DE teñido con Coomassie G-250 de 2000 μ g de un extracto de proteínas sin tratamiento de *Vibrio sp.* crecido en presencia de 25 g/L NaCl. Las flechas indican la sobreexpresión de tres proteínas, las cuales son llamadas P70, P60 y P40 por sus respectivos tamaños moleculares.

En el extracto de proteínas del cultivo crecido en ausencia de NaCl, se puede observar claramente la sobreexpresión de una proteína de 50 kDa aproximadamente, además fue posible notar que la mayoría de las proteínas expresadas están entre los 40 y 100 kDa, y sus puntos isoeléctricos están en la mayoría en la zona ácida (Fig. 20). Por el contrario, en el extracto de proteínas proveniente del cultivo crecido en presencia de 25 g/L NaCl se puede observar claramente la sobreexpresión de tres proteínas, las cuales tienen alrededor de 40, 60 y 70 kDa de peso molecular (Fig. 21). Estos resultados corroboran la sobreexpresión de proteínas observada en el gel SDS-PAGE (Fig. 16)

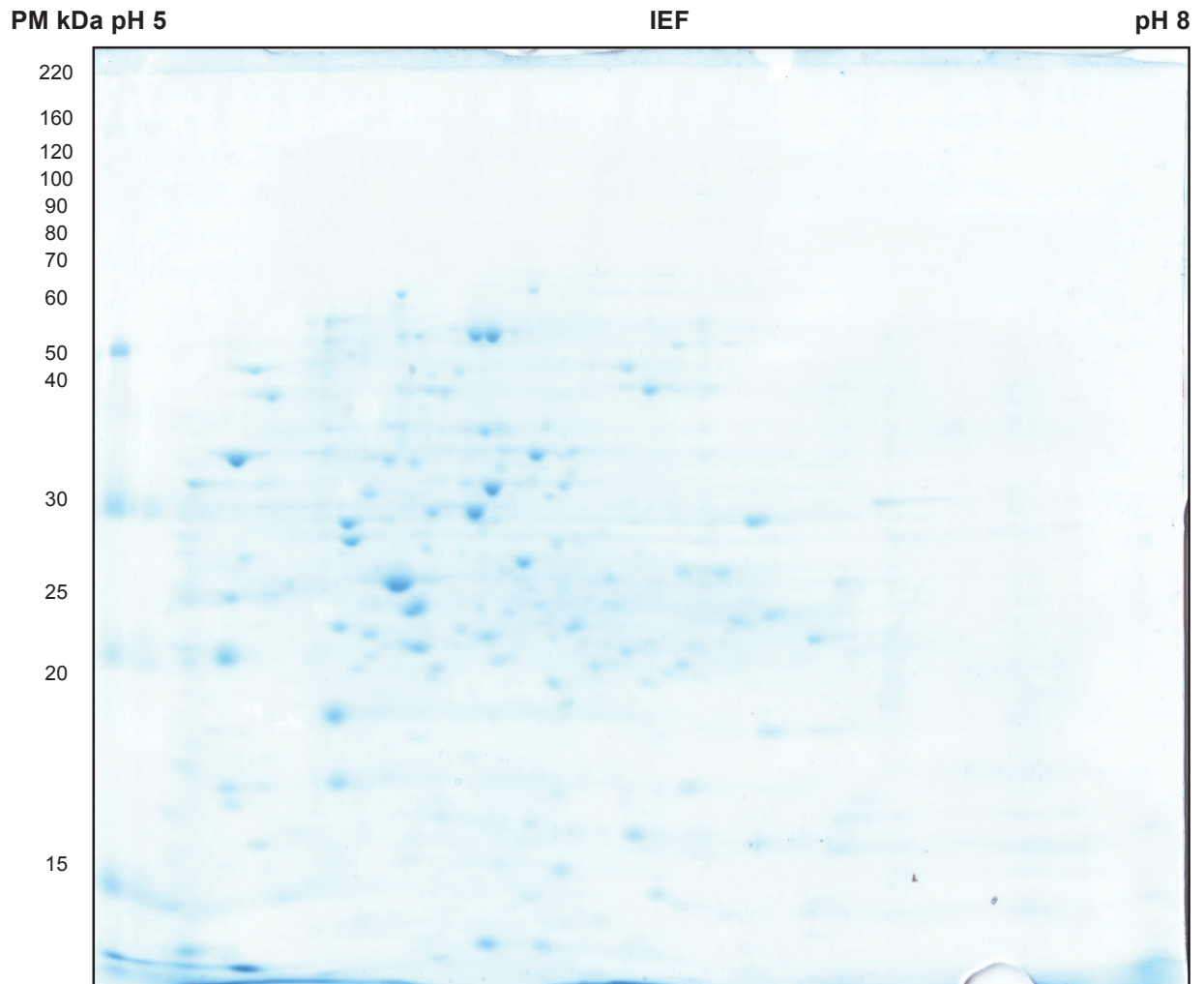


Fig. 22: Gel 2DE teñido con Coomassie G-250 de 2000 μ g de un extracto de proteínas sin tratamiento de *Vibrio sp.* crecido en ausencia de NaCl.

Una vez puesta a punto la técnica 2DE y cuando se realizaron los gels con rango de pH 3-10 (Figs. 20 y 21) se notó claramente como las proteínas se focalizaban en la zona ácida, por lo tanto se corrió una electroforesis 2D pero utilizando un rango de pH 5-8 para visualizar de mejor manera las proteínas. Se observó que la mayoría de las proteínas están ubicadas en un tamaño molecular de 20 a 70 kDa, lo cual comprueba lo observado en gel SDS-PAGE. Estudios sobre *Vibrios* crecido en ausencia de sal no existen, por lo cual por ahora no es posible tener un patrón de referencia para relacionar el comportamiento de estas proteínas con algún mecanismo fisiológico frente a esta condición de crecimiento. Pocos estudios se han realizado en la proteómica de microorganismos halófilos o halotolerantes, y no existen trabajos de un halotolerante perteneciente al género *Vibrio* aislado desde algún salar, pero si es claro que las proteínas estructurales y las enzimas que conforman el

metabolismo celular de estos microorganismos han sufrido una evolución adaptativa que les ha conferido estabilidad y funcionalidad en condiciones hipersalinas. Descrito está que como resultado de este proceso de los 20 aminoácidos que constituyen las proteínas 2 (ácido aspártico y ácido glutámico) aumentan su frecuencia, y otros como lisina y leucina desaparecen casi por completo. Por eso mismo en las paredes celulares de estas bacterias halófilas abundan las cargas negativas, y estas proteínas se encuentran entre las más ácidas del proteoma y parece ser que la composición atípica de aminoácidos les confiere resistencia a la sal. El ácido glutámico y el aspártico tienen un comportamiento químico que favorece la adaptación a los medios hipersalinos. Por un lado sus cadenas laterales presentan tamaños reducidos de forma que requieren menos moléculas de solvente (agua) para hidratarse, al facilitar la hidratación permiten que la célula equilibre su concentración salina con la del exterior y evitan que esta muera por choque osmótico. Por otro lado poseen cargas eléctricas negativas que confieren solubilidad a las proteínas.

Debido a que no fue posible identificar las proteínas de este microorganismo sólo se presume y basándose en lo descrito por Kao y col., (2009) en un *Vibrio anguillarum*, que las posibles proteínas observadas que se sobreexpresaron en presencia de sal podrían ser la flagelina, ya que se observó la presencia de flagelo en medio salino, y una proteína de membrana o porina que actuaría como un osmoregulador respondiendo frente al estrés salino (Kao y col., 2009). Además es probable la presencia de proteínas que regularían la síntesis de polifosfatos en el *Vibrio sp.* crecido en ausencia de sal.

X. CONCLUSIONES

El microorganismo *Vibrio sp.* es un psicro- y halotolerante capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas y de concentración de NaCl. Su temperatura y concentración de NaCl son de 26 a 40 °C y 0 a 50 g/L, respectivamente. Además el microorganismo *Vibrio sp.* presenta mecanismos de respuestas frente a condiciones de estrés, tales como la síntesis de ácidos grasos insaturados a bajas temperaturas, lo que corresponde a una regulación termoadaptativa en la fluidez de su membrana lipídica. Además estos ácidos grasos serían de utilidad en la industria alimenticia por ser ácidos grasos esenciales.

El microorganismo *Vibrio sp.* presentó también otro mecanismo de respuesta el cual fue la generación de un pigmento rojo identificado como prodigiosin, la síntesis de este pigmento es dependiente de la concentración de NaCl, y específicamente de los iones cloruro.

La sal produce un efecto en la movilidad del microorganismo *Vibrio sp.*, ya que mostró una alta movilidad en presencia de sal en el medio definido sólido, específicamente mostró movilidad tipo “swimming” y “swarming”, ambas dependientes de NaCl. Además de la sal producir un efecto en la movilidad, también produce un efecto en la fisiología del microorganismo. En ausencia de sal el microorganismo forma agrupaciones y una morfología celular alargada filamentosa, además de presentar elementos densos al paso de los electrones, presumiblemente gránulos de polifosfatos. En presencia de sal el *Vibrio sp.* presentó un único flagelo polar, sus células no forman agrupaciones y no presentan elementos densos al paso de los electrones.

Finalmente se implementó la técnica de electroforesis bidimensional de proteínas para cultivos crecidos en medios salinos, y el microorganismo mostró principalmente la sobreexpresión de 3 proteínas frente a la presencia de NaCl. Por lo tanto, se concluye que nuestros resultados respaldan la hipótesis que el microorganismo psicro- halotolerante *Vibrio sp.* presenta una amplia gama de respuestas fisiológicas frente al estrés osmótico.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adams M., Perler F., Kelly R. 1995. Extremoenzymes: Expanding the limits of biocatalysis, *Bio/technology*, 13: 662-668.
- Allaby, M. 2005. *Oxford Dictionary of Ecology*. Oxford University Press. Oxford, New York.
- Allen GR, Reichelt JL, Gray PP. 1983. Influence of Environmental Factors and Medium Composition on *Vibrio gazogenes* Growth and Prodigiosin Production. *Appl Environ Microbiol*. 45:1727-32.
- Bartlett, D.H. 2006. Extremophilic vibronaceae. In: F.L. Thompson, B. Austin and J. Swings (eds). *The Biology of the Vibrios*. ASM Press. Washington, D.C: 156-171.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.
- Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*. 40:803-846.
- Cavicchioli, R. Siddiqui, K. Andrews, S. and Sowers, K. R. 2002. Low temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 3: 253-261.
- Da Costa, M.S. Santos, H. Galinski, E.A. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. In: Antranikian G (ed) *Biotechnology of extremophiles. Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 61: 117–153.
- Danevčič, T. Rilfors, L. Štrancar, J. Lindblom, G. and Stopar, D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio sp.* DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1712: 1 – 8.
- Das Sarma, S. Arora, P. 2001. A general review on Halophiles. In *Encyclopedia of life sciences*. Nature publishing group/ www.els.net.
- Deming, J.W. 2002. Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 301- 309.

- Dennis, P.P. and Shimmin, L.C. 1997. Evolutionary divergent and salinity mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**: 90-104.
- Dunlap, P.V. Ast, J.C. Kimura, S. Fukui, A. Yoshino, T. and Endo, H. 2007. Phylogenetic analysis of host-symbiont specificity and codivergence in bioluminescent symbioses. *Cladistics* **23**: 507-532.
- Ermolenko, D.N. and Makhatadze, G.I. 2002. Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 1902-1913.
- Esquivel J. 2010. Extracción y purificación de productos bioactivos desde bacterias extremófilas. Tesis presentada para optar al título de Químico Farmacéutico.
- Farmer, J.J. and Janda, J.M. 2005. Vibrionaceae. In: D.J. Brenner; N.R. Krieg and J.R. Staley (eds). *Bergey's Manual Systematic Bacteriology: The Proteobacteria*. 2nd Ed Springer-Verlag. New York. **2**: 491-494.
- Feller G and Gerday C. 2003. Psychophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nature reviews microbiology*, **1**:200-208.
- Galinski, E.A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. **37**: 273–328.
- Galinski, E.A. Tindall, B.J. 1992. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant micro-organisms. In: Herbert RH, Sharp RJ (eds) *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. Blackie, Glasgow: 76–114.
- Galinski, E.A. and Louis, P. 1998. Compatible solutes: ectoine production and gene expression. In A. Oren (ed.). *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla: 187–202.
- García M. Quintero R., López-Munguía A. 2000. *Biología Alimentaria*. Ed. Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores.
- Giavalisco P, Nordhoff E, Kreitler T, Klöppel KD, Lehrach H, Klose J, Gobom J. 2005. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **5**: 1902–1913
- Gómez, J. & Steiner, W. 2004. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*. **42**: 223-235.

- Gonzalez, H. and Jensen, T.E. 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. **93**:179-185.
- González-Hernández, J.C. Cardenas-Monroy, C.A. Pena, A. 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. **21**: 403-412.
- Grant, W.D. 1991. General view of halophiles. In *Superbugs Microorganisms in extreme environments*. Horikoshi K & Grant WD (eds). Tokyo, Japan: SpringerVerlag: 15-37.
- Groß, M. 1997. *Exzentriker des Lebens*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Groudieva, T., Grote, R. & Antranikian, G. 2003. *Psychromonas arctica* sp. nov., a novel psychrotolerant, biofilm-forming bacterium isolated from Spitzbergen. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. **53**: 539–545.
- Joshua D. Shrout, David L. Chopp, Collin L. Just, Morten Hentzer, Michael Givskov and Matthew R. Parsek. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* is a common environmental. *Molecular Microbiology*. **62**: 1264–1277.
- Kamekura M. 1986. Production and function of enzymes from eubacterial halophiles. *FEMS Microbiol Rev* 39: 145- 150.
- Kao, D.Y. Cheng, Y.C. Kuo, T.Y. Lin, S.B. Lin, C.C. Chow, L.P. and Chen, W.J. 2009. Salt responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis. *Journal of applied microbiology* ISSN: 1364-5072.
- Kearns, D. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*. **8**: 634-644.
- Khanafari, A., M.M. Assadi and F.A. Fakhr, 2006. Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. *OnLine J. Biol. Sci.*, 6: 1-13
- Kikura, M. Seno, Y. Tomioka, H. 1998. Bacterial type rhodopsin, bacterial type rhodopsin gene, recombinant DNA and production of bacterial type rhodopsin. Patent JP10150987.
- Kohshima, S. 2000. Psychrophilic organisms in snow and ice. *Biological Sciences in Space*. **4**: 353-362.

- Kornberg, A., Rao, N. N. and Ault-Riché, D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 89–125.
- Kristjansson, J.K. & Hreggvidsson, G.O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* **11**: 17-25.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 411- 456.
- Lambert, M.A. Hickman-Benner, F.W. Farmer, J.J. and Moss, C.W. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **33**:, 777–792.
- Lanyi, J.K. 2004. Bacteriorhodopsin. *Annual Review of Physiology.* **66**: 665-668.
- Lincoln, R. Boxshall, G. and Clark, P. 1998. *A Dictionary of Ecology, Evolution, and Systematics.* 2nd Ed. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Lonhienne, T. Zoidakis, J. Vorgias, C.E. Feller, G. Gerday, C. and Bouriotis, V. 2001. Modular structure, local flexibility and cold activity of a novel chitinase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *Journal of Molecular Biology.* **310**: 291–297.
- López, J.L. 2007. Applications of proteomics in marine ecology. *Marine Ecology-Progress Series.* **332**: 275-279.
- Madigan, M. T. & Mairs, B. L. 1997. Extremophiles. *Scientific American: Scientific American Magazine.* **276**: 82–87.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M. 2006. Prokaryotic diversity: the Bacteria. *Brock Biology of Microorganisms.* 11th Ed. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ: 355-357.
- Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles: life under extreme conditions.* **5**:73-83.
- McCarter L. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **65**: 445-462.
- Miller KJ. 1985. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the phospholipid and fatty acid compositions of a halotolerant *Planococcus* sp. *Journal of bacteriology.* 263-270

- Morita, N., Shibahara, A., Yamamoto, K., Shinkai, K., Kajimoto, G. And Okuyama, H. 1993. Evidence for cis-trans isomerization of a double bond in the fatty acids of the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Bacteriol.*, 175, 916-918.
- Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bact. Rev.* **39**: 144-167
- Müller, V. and Oren, A. (2003) Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles*, 7: 261-266
- Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. 1999. Extremophiles as a novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 711- 729.
- Nishiguchi, M.K. and Jones, B.W. 2004. Microbial biodiversity of within the Vibrionaceae. In: *Origins, evolution, and biodiversity of microbial life*. J. Seckback (ed). Cole-Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands: 531-548.
- Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S. and Murata, N. 1990. A trans-unsaturated fatty acid in a Psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Bacteriol.*, 172, 3515-3518.
- Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **63**: 334–348.
- Oren, A. 2000. Life at High Salt Concentrations, *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Scheifer, K.-H., and Stackebrandt, E., (Eds). New York: Springer, 3rd ed. (electronic publication).
- Oren, A. Heldal, M. Norland, S. 1997. X-ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. *Canadian Journal of Microbiology.* **43**: 588–592.
- Otterman, K. M., and J. F. Miller. 1997. Roles of motility in bacterial-host interactions. *Molecular Microbiology.* **24**:1109-1117.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C., Nigam P., Krieger N., Soccol V. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29, 119- 131.

- Pandey A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Sigh D., Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31, 135-152.
- Poulos L. 2003. New understanding of thermostable and piezostable enzymes, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 360- 365.
- Povolo, F. Élida B. Hermida y Andrea Saada. 2001. Determinación de los módulos tensil y de almacenamiento de compuestos de PHB. *Jornadas SAM – CONAMET – AAS 2001*: 967-976.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* **30**, 285–293
- Prescott, L.M. Parley, J.P. & Klein, D.A. 1999. In *Microbiology*. Prescott LM, Parley JP & Klein DA (eds). Boston, Ma, USA: WCB McGraw-Hill.
- Pritam S. Sukhija and D. L. Palmquist. 1988. Rapid Method for Determination of Total Fatty Acid Content and Composition of Feedstuffs and Feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 1202-1206.
- Ramirez, M. L. Chulze, S. N. and Magan, N. 2004. Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia*. **96**: 470-478.
- Rao M., Tanksale A., Gathe M., Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 597- 635.
- Remonsellez, F., Orell, A. and Jerez, C. A. 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* 152: 59-66.
- Remonsellez F. 2008. Efecto de cobre y cadmio en el metabolismo de los polifosfatos y en la expresión global de proteínas en el arqueon *Sulfolobus metallicus*. Tesis para optar al grado de Doctor en ciencias con mención en microbiología.
- Roeßler, M., Wanner, G., Müller, V. .2000. Motility and flagellum synthesis in *Halobacillus halophilus* are chloride dependent. *Journal Bacteriology*. **182**: 532 - 535.

- Russell, NJ. 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds). *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press: 163-210.
- Russell, J. and Hamamoto, T. 1998. Psychrophiles: Microbial life in extreme environments : 25-45.
- Sanchez- Porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 295- 300.
- Sauer T and Galinski EA. 1998. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng.*, 59:128.
- Shevchenko, A. Wilm, M. Vorm, O. And Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. **68**: 850-858.
- Shieh, W.Y. Chen, Y.W. Chaw, S.M. and Chiu, H.H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. **53**: 479 - 484.
- Soria, I. 2004. Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Miguel Hernández de Elche: 13-17.
- Starič N, Danevčič T, Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production--a competitive advantage in the environment?. *Microb Ecol.*, 60:592-8.
- Thomas NA, Bardy SL, and Jarrell KF. 2001. Archaeal flagella: A different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**: 147-174.
- Thompson, F.L. Iida, T. & Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 403–431.
- Thompson, F. L. & Swings, J. 2006. Taxonomy of the vibrios. In *The Biology of Vibrios*. Edited by F. L. Thompson, B. Austin & J. Swings. Washington, DC: American Society for Microbiology: 29–43.
- Urakawa, H. and Rivera, I. N. 2006. The biology of Vibrios. Aquatic environment,. In F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (ed.). ASM Press, Washington, DC: 175-189.

- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*. **6**: 213-218.
- Ventosa, A. Nieto, J.J. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62**: 504–544.
- Willey JM, Waterbury JB, Greenberg EP. Sodium-coupled motility in a swimming cyanobacterium. 1987. *Journal Bacteriology*. **169**: 3429–3434
- Williamson, N.R. Peter, C. Fineran, Finian, J. Leeper and George, P.C. Salmond. 2006. The Regulation and Biosynthesis of Bacterial Prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*. **4**: 887-899.

XII. ANEXO: ABREVIATURAS

(NH₄)₂SO₄, sulfato de amonio
2D-PAGE o 2DE- PAGE, Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida
A₆₀₀, absorbancia a 600 nm de longitud de onda
ADP, adenosin difosfato
AgNO₃, nitrato de plata
ATP, adenosin trifosfato
BR, bacteriorrodopsina
CHAPS, 3 - [(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Cl⁻, iones cloruro
col., colaboradores
CSPs, Cold shock proteins
D.O, densidad óptica
DNA, ácido desoxiribonucleico
DPG, di- fosfatidiglicerol
Dr., Dra., doctor, doctora
ecs., ecuación
Fig., figura
g, gravedad
H⁺, protones
H₃PO₄, ácido fosfórico
hr, hora
IPG, gel de gradiente inmovilizado de pH
K, constante de crecimiento
K⁺, iones potasio
KCl, cloruro de potasio
kDa, Kilo Dalton
Log, logaritmo en base 10
Mr, Masa molecular
MS, espectrometría de masa
Na⁺, iones sodio
Na₂CO₃, carbonato de sodio
Na₂S₂O₃, tiosulfato de sodio
Na₂SO₄, sulfato de sodio
NaBr, bromuro de sodio
NaCl, Cloruro de Sodio
NL, no lineal
nov., nueva
PCR, reacción en cadena de la polimerasa
PE, fosfatidiletanolamina
PG, fosfatidiglicerol
pH, -Log de la concentración de protones

PHB, polihidroxitirato
Pi, ortofosfato
pI, punto isoeléctrico
PM, peso molecular
PMSF, fluoruro fenilmetilsulfonilo
poliP, polifosfato
PSA, persulfato de amonio
rpm, revoluciones por minuto
SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SDS, dodecilsulfato sódico
sp. o spp., especie
TEM, microscopía electrónica de transmisión
Tg, tiempo generacional