



**UNIVERSIDAD NACIONAL
“PEDRO RUÍZ GALLO”**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

**“EFECTO DE LA SALINIDAD Y PH EN LA ACTIVIDAD
HIDROLÍTICA DE LOS SUSTRATOS ALMIDÓN Y CASEÍNA POR
LAS BACTERIAS HALÓFILAS AISLADAS DE LOS ESTANQUES
SALINOS DE LA CALETA SANTA ROSA”**

TESIS

Para optar por el título profesional de:

**LICENCIADO EN
BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.**

Presentado por:

**BR. DEL MAESTRO MORALES, MAGALI CECILIA
BR. GUZMÁN CAMPOS, JUANA MARITZA**

LAMBAYEQUE – PERU

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUÍZ GALLO"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS

"Efecto de la salinidad y pH en la actividad hidrolítica de los sustratos almidón y caseína por las bacterias halófilas aisladas de los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa"

PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS PARA OPTAR
POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN
BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.**

PRESENTADO POR:

Br. Del Maestro Morales, Magali Cecilia
Br. Guzmán Campos, Juana Maritza

APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO:

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo

Presidente

M.Sc. José Teodoro Reupo Periche

Secretario

M.Sc. Jorge Chanamé Céspedes

Vocal

Dra. Olga Francia Arana

Patrocinadora

DEDICATORIA

A Dios y la santísima Virgen María, por ser los que guían cada paso que doy en la vida y por siempre estar presente en toda mi carrera profesional.

*A mis amados padres, **Lidia y José**, y a mis queridos hermanos por ser quienes con su apoyo, comprensión, ejemplo y empuje han llevado mi camino hacia adelante y gracias a su esfuerzo y sacrificio han hecho realidad la culminación de mi carrera profesional.*

Magali Cecilia Del Maestro Morales

DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres y hermanos, porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, y me hizo ir hasta la culminación de la tesis.

Juana Maritza Guzmán Campos

AGRADECIMIENTO

Nuestro sincero agradecimiento a la Dra. Olga Francia Arana, por su asesoría y sus importantes sugerencias y aportes durante el desarrollo de la presente tesis desde el inicio hasta su culminación.

A los M.Sc. José Reupo Periche y M.Sc. Jorge Chanamé Céspedes, docentes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo - Lambayeque, por el apoyo desinteresado mostrado a lo largo del desarrollo de nuestra investigación.

A nuestros amigos y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron con la realización de nuestra tesis

Magali Cecilia Del Maestro Morales y Juana Maritza Guzmán Campos

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE TABLAS | 01 |
| INDICE DE FIGURA | 03 |
| RESUMEN | 04 |
| ABSTRACT | 05 |
| I. INTRODUCCIÓN | 06 |
| II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS | 08 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 3.1 MATERIAL | 15 |
| 3.1.1 Material biológico | 15 |
| 3.1.2 Población y muestra de estudio | 15 |
| 3.1.3 Medios de cultivo | 15 |
| 3.2 METODOLOGÍA | 17 |
| 3.2.1 Lugar de muestreo | 17 |
| 3.2.2 Obtención de la muestra | 17 |
| 3.2.6 Enriquecimiento de las bacterias halófilas | 18 |
| 3.2.4. Aislamiento de bacterias halófilas | 19 |
| 3.2.5 Prueba de tolerancia salina a diferentes concentraciones de NaCl de cepas seleccionadas | 20 |
| 3.2.6 Determinación de la actividad hidrolítica de los metabolitos de bacterias halófilas | 20 |
| 3.2.7 Determinación del efecto de la salinidad y pH en la actividad hidrolítica de los metabolitos de bacterias halófilas seleccionadas | 21 |
| 3.2.8 Identificación de las cepas con actividad hidrolítica | 21 |
| 3.2.9 Análisis estadístico de los datos | 22 |

| | |
|--|----|
| IV. RESULTADOS | 23 |
| 1. Descripción de los Estanques Salinos de la Caleta santa Rosa | 23 |
| 2. Caracterización morfológica de las cepas seleccionadas de bacterias halófilas. | 25 |
| 3. Tolerancia a NaCl de las cepas aisladas de las salinas de la Caleta Santa Rosa. | 27 |
| 4. Actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente a los sustratos almidón y caseína. | 28 |
| 5. Promedios de la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente al sustrato caseína. | 29 |
| 6. Efecto de la salinidad y pH en la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente a caseína. | 31 |
| 7. Influencia del pH y salinidad en la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente al almidón. | 36 |
| 8. Identificación de cepas seleccionadas con mayor actividad hidrolítica | 42 |
| V. DISCUSIÓN | 45 |
| VI. CONCLUSIONES | 49 |
| VII. RECOMENDACIONES | 50 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| IX. ANEXOS | 56 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°

| | |
|---|----|
| 1. Características físico químicas de los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa. Noviembre 2013 – Enero 2014. | 24 |
| 2. Porcentaje de cepas aisladas de los Estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa, según sus características morfológicas. | 26 |
| 3. Promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a Caseína a diferentes niveles de pH (7 y 8) y salinidad (6 y 10%) de las cepas de bacterias halófilas seleccionadas aisladas de las Salinas de la Caleta Santa Rosa. | 30 |
| 4. Análisis de varianza de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las 39 cepas halófilas frente a caseína con influencia de dos niveles de pH y dos niveles de salinidad. | 32 |
| 5. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa*pH. | 33 |
| 6. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa* Salinidad. .. | 34 |
| 7. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, con relación a pH y salinidad. .. | 34 |
| 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa*pH*Salinidad. | 35 |
| 9. Promedio de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a almidón a dos niveles de pH (7 y 8) y salinidad (6 y 10%) de las cepas seleccionadas. | 36 |
| 10. Análisis de varianza de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de 15 cepas halófilas frente al almidón con influencia de dos niveles de pH y dos niveles de salinidad. | 38 |
| 11. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente almidón, en la interacción cepa*pH. | 39 |
| 12. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa* Salinidad. | 40 |

| | |
|---|----|
| 13. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, con relación a pH y salinidad. | 40 |
| 14. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halo (mm) de actividad hidrolítica frente a almidón, en la interacción cepa*pH*Salinidad. | 41 |
| 15. Identificación de la cepa MJ-86 aislado de las salinas de Santa Rosa y su comparación con el género <i>Salinivibrio</i> | 43 |
| 16. Identificación de la cepa MJ-1 aislado de las salinas de Santa Rosa y su comparación con el género <i>Halomonas</i> | 43 |
| 17. Identificación de la cepa MJ-67 aislado de las salinas de Santa Rosa y su comparación con el género <i>Pseudoalteromonas</i> | 44 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. N°

| | |
|---|----|
| 1. Estanques salinos de la Caleta Santa Rosa | 18 |
| 2. Toma de muestra en estanque salino de la caleta Santa Rosa, medida de temperatura y pH del estanque salino | 18 |
| 3. Enriquecimiento de Bacterias Halófilas de los estanques Salinos A, B, C, D | 19 |
| 4. Ancho de halo de hidrolisis expresados en mm | 21 |
| 5. Estanques Salinos calificadas con las letras K, G y D en de la Caleta Santa Rosa, Lambayeque – Perú | 23 |
| 6. Colonias de cepas seleccionadas de bacterias halófilas: MJ-1, MJ-67, MJ-80, MJ-84 y MJ-86 observadas con microscopio a 4X | 25 |
| 7. Morfología celular de las cepas MJ-40, MJ-67 y MJ-86 observadas al microscopio 100X | 26 |
| 8. Porcentaje de cepas según su crecimiento en ausencia de NaCl y a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20%) | 27 |
| 9. Halos de actividad de las cepas MJ-1, MJ-2, MJ-3, MJ-40, MJ-41, MJ-55 y MJ-86 de bacterias halófilas aisladas de las Salinas de la Caleta Santa Rosa, frente al sustrato Caseína | 28 |
| 10. Promedio de los halos de actividad hidrolítica de las cepas de bacterias halófilas frente a caseína con dos niveles de pH y salinidad. | 31 |
| 11. Promedio de los halos de actividad hidrolítica de las cepas de bacterias halófilas frente a almidón con dos niveles de pH y salinidad | 37 |

RESUMEN

Las bacterias halófilas habitan ambientes salinos porque requieren sal para su desarrollo y crecimiento, en la actualidad estas bacterias tienen interés biotecnológico por los productos metabólicos que sintetizan.

De los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa se aislaron bacterias halófilas con el objetivo de evaluar el efecto del pH y la salinidad en la actividad hidrolítica. Para ello se tomaron dos muestras de agua de cada estanque haciendo un total de 24 muestras, cada muestra fue sometida a enriquecimiento en caldo marino con 4.5% de sal doble concentrado suplementados con extracto de levadura al 0.3%, luego de 48 horas de incubación las bacterias halófilas fueron aisladas en agar marino al 10% de sal, las mismas que fueron subcultivadas en agar marino pero con los sustratos almidón y caseína al 2% y a pH 7, con la finalidad de determinar la actividad hidrolítica. Las cepas con mayor actividad hidrolítica fueron seleccionadas para aplicar dos niveles de pH y dos niveles de salinidad.

Concluyendo que la cepa MJ-67 alcanzo la mayor actividad hidrolítica frente a caseína a una salinidad de 6% y a pH 7 y la cepa MJ-80 frente al sustrato almidón a la misma salinidad y pH. Las cepas MJ-1, MJ-67 y MJ-86 fueron identificadas como de los géneros *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Salinivibrio*.

ABSTRACT

Halophilic bacteria inhabit saline environments because they require salt for development and growth; currently these bacteria have biotechnological interest for metabolic products that synthesize.

Of saline ponds Caleta Santa Rosa halophilic bacteria isolated in order to evaluate the effect of pH and salinity in the hydrolytic activity. Therefore, two water samples from each pond for a total of 24 samples, each sample was subjected to enrichment in marine broth with 4.5% of double salt concentrate supplemented with yeast extract 0.3%, were taken after 48 hours of incubation halophilic bacteria were isolated from agar marine salt 10%, the same as were subcultured in dark but with starch agar and 2% casein substrate at pH 7 in order to determine the hydrolytic activity. Strains with increased hydrolytic activity were selected to apply two levels of pH and salinity levels.

Concluding that MJ-67 strain reached greater hydrolytic activity towards casein at a salinity of 6% and pH 7 and MJ-80 strain versus starch substrate at the same salinity and pH. MJ-1 strains, MJ-67 and MJ-86 were identified as gender *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* and *Salinivibrio*.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias halófilas habitan ambientes salinos con elevadas concentraciones de sales y se encuentran distribuidas por diferentes lugares del planeta en salinas solares resistiendo la naturaleza por la presencia de solutos compatibles en su protoplasma.

En los últimos años las bacterias halófilas han despertado un gran interés de investigadores a nivel mundial, por su resistencia a ambientes extremos pero fundamentalmente por sus aplicaciones y potencialidades biotecnológicas.

Las enzimas sintetizadas por estos microorganismos halófilos han desarrollado características particulares, estabilidad y solubilidad a las diferentes concentraciones de sal. Sin embargo, a pesar de un creciente interés en el uso de sus enzimas para aplicaciones biotecnológicas, hay relativamente pocos informes en la literatura sobre su producción y caracterización (Bhatnagar, *et al.*, 2005).

Investigadores han demostrado que estas bacterias tienen importancia industrial por su capacidad de sintetizar solutos compatibles, como polioles (glicerol y arabitol), azúcares y derivados (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol), aminoácidos (prolina y glutamina) y derivados de aminoácidos (N-acetilisina, N-acetilornitina). Además, tienen un papel importante en los procesos de biodegradación de residuos orgánicos por la síntesis de numerosas enzimas extracelulares.

En Perú, Sánchez, *et al.*, (2004), aislaron e identificaron cinco cepas de bacterias halófilas productoras de proteasas provenientes de efluentes pesqueros de una zona costera de Perú, estas cepas fueron

evaluadas por su actividad proteolítica específica sobre la caseína, siendo las cepas del género *Pseudomonas* las que mayor actividad proteolítica presentaron, seguidas del género *Aeromonas*. En Lambayeque, Francia, (2011), de 2368 colonias aisló 85 cepas (colonias) morfológicamente diferentes, de ellas solo 15 cepas resultaron con actividad amilolítica, seleccionando dos cepas con mayor actividad de los estanques salinos de la Caleta de Santa Rosa, concluyendo que las cepas SR35 Y SR55 alcanzaron el mayor crecimiento y producción de la enzima amilasa en agua de salina siendo identificadas como los géneros *Pseudoalteromonas* (SR-55) y *Halomonas* (SR-35).

Por el potencial enzimático ya conocido por otros investigadores, el presente trabajo se orienta a la investigación de las bacterias halófilas que habitan los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa - Lambayeque, con la finalidad de estudiar su capacidad hidrolítica frente a dos sustratos, almidón y caseína con la influencia de los factores salinidad y pH, seleccionar las cepas con mayor actividad e identificarlos bioquímicamente, cepas que podrán ser mejoradas en el futuro y ser utilizadas en los procesos industriales, contribuyendo así con el desarrollo económico de la región.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Ayala (2010), aisló de la laguna Chairkota, Potosí – Bolivia, 71 cepas capaces de crecer en diferentes concentraciones de NaCl (0, 5, 10,15 y 20%), algunas de las mismas fueron capaces de crecer en diferentes niveles de pH (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) y de temperaturas (0, 7, 15, 24, 30, 37, 45° C).todas las cepas fueron caracterizadas morfológicamente, tomando en cuenta parámetros de color, forma, borde, brillo, consistencia, densidad y elevación de las colonias; así mismo se hizo la caracterización microscópica mediante la tinción de Gram al mismo tiempo realizo el perfil enzimático. Como resultado se obtuvo 21 cepas halófilas y 50 halotolerantes, 5 cepas alcalófilas, 4 cepas neutrófilas y 62 cepas alcalotolerantes, por último encontró 10 cepas psicrotolerantes y 61 cepas mesófilas. Así mismo de las 71 cepas aisladas, determinó 6 cepas productoras de amilasas, 19 cepas productoras de celulasas, 7 cepas productoras de lipasas, 14 cepas productoras de proteasas, 7 cepas productoras de proteinasas y 6 cepas de bacteriocinas.

Amjres, et al., (2010), seleccionaron 120 cepas al azar en función de su diferente morfología colonial, procedentes de los diferentes ambientes hipersalinos de Marruecos. De estas cepas eligieron 26 para la identificación taxonómica; la mayoría de bacterias fueron GRAM negativas pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pantoea* y *Enterobacter*, mientras que solo 1 cepas fue GRAM positiva perteneciente al género *Bacillus*. De las 26 cepas identificadas seleccionaron a la especie *Halomonas nitroreducens*, por ser la mejor productora de exopolisacaridos, el cual por sus altos valores de viscosidad y una actividad emulgente fue superior en algunos casos a la de los surfactantes comerciales, propiedades que le permitieron ser un

excelente candidato para la industria farmacéutica como viscosizante y estabilizador de emulsiones.

Castro y Flores (2011), estudiaron 8 muestras de suelo del Valle de Cuatro Ciénegas - Coahuila, México, caracterizadas por su contenido de cloruro de sodio, humedad, materia orgánica y características texturales, de estas muestras aislaron bacterias halófilas utilizando para ello medios de cultivo con concentraciones altas de sales, además se determinaron las características bioquímicas, morfológicas y potencial biotecnológico de las cepas que aislaron. Los medios de cultivo caldo nutritivo modificado, agar nutritivo modificado y HALO permitieron el aislamiento de bacterias halófilas, de las 12 cepas aisladas, todos los microorganismos aislados fueron Gram positivos y la mayoría presentó morfología de coco, encontrando que muchas cepas aisladas presentaron características metabólicas similares al género *Halomonas* que por su versatilidad para crecer en distintos rangos de temperatura y pH, fue empleado en la degradación de materiales derivados de almidón, teniendo aplicación en biorremediación.

Félix, et al. (2006), aislaron bacterias halófilas de la anchoíta (*Engraulis anchoíta*) salada, este producto posee una actividad de agua (aw) de 0,75 a 0,80 lo que permite una actividad microbiana reducida a grupos de bacterias halófilas. De 100 muestras de anchoíta salada, el 71 % de las colonias halladas fueron halófilas extremas y el 29 % halófilas estrictas, identificando el género de *Halococcus* sp. que represento el 31%; *Haloferax* spp., el 15%, *Halobacterium* spp., el 5% y *Haloarcula* spp., el 7%. De estas bacterias el 30% tuvo actividad proteolítica, el 30% lipolítica y el 15% proteolítica y lipolítica.

Flores y Zavaleta (2010), realizaron estudios sobre bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico, para ello utilizaron 32 cepas del cepario de bacterias halófilas del

Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima - Perú), los cuales provienen de diferentes ambientes salinos de Pilluana, Huacho, Maras, Chilca, Paracas y Ventanilla. Para todos los microorganismos se determinaron: características morfológicas, fisiológicas y capacidad hidrolítica a diversos sustratos. Mediante tinción Gram y microscopía óptica se determinó que el 87,5 y 12,5% de los aislados fueron bacilos y cocos respectivamente, los microorganismos presentaron actividad hidrolítica sobre tween 80, aceite de oliva, almidón, caseína, lactosa y ADN, el 72, 75 y 59% de las bacterias estudiadas degradaron el tween 80, el almidón y la caseína respectivamente; el aceite de oliva y la lactosa fueron utilizados por dos microorganismos.

Gutiérrez y Gonzales en 1972, utilizaron un método para la detección simultánea de proteinasa y esterasa mediante la combinación de Tween 80 y gelatina en una sola placa. Los organismos ensayados fueron: *Halobacterium halobium* 396, con una fuerte actividad proteolítica pero sin actividad de esterasa; 20 cepas de *Halobacterium sp.* con características similares a *Halobacterium halobium* 396, 12 cepas de *Halobacterium* con actividad esterasa pero sin actividad proteolítica, y 23 cepas de *Halobacterium* con actividades tanto proteolítica y de esterases. Las placas fueron observadas diariamente después de 3 días de incubación; la presencia de esterasa se demostró por la formación de halos visibles, debido a la formación de precipitados de laurato de calcio, palmitato, estearato, oleato al alrededor de las zonas de crecimiento bacteriano; las bacterias con fuerte actividad esterasa dio un resultado positivo después de 3 a 6 días de incubación, las bacterias con baja actividad esterasa mostró resultados positivos después de 15 días de incubación, la actividad de proteinasa fue observado después de 5 a 6 días de incubación. El halo transparente alrededor de las bacterias se diferenció del halo opaco producido por las bacterias lipolíticas.

Kushner y Kamekura (1988), mencionados por Narváez (2007), propusieron categorías de microorganismos dependiendo de la concentración de sal que requieren para su crecimiento óptimo, determinado como microorganismos no halófilos a aquellos que crecen óptimamente a una concentración de NaCl inferior a 0,2M (aprox. 1% p/v) Halófilos débiles (bacterias marinas) a los microorganismos que tienen su crecimiento óptimo en medios que contienen una concentración de NaCl de 0,2 a 0,5M (aprox. 1-3% p/v), como el agua de mar contiene una concentración de NaCl cerca del 3% p/v; halófilos moderados a los microorganismos que tienen crecimiento óptimo en medios con concentraciones de NaCl de 0,5-2,5 M (aprox. 3-15% p/v) y halófilos extremos, aquellos microorganismos que presentan un crecimiento óptimo en medios que contienen de 2,5-5,2 M (saturación) de NaCl, generalmente su crecimiento óptimo es a 25% p/v de NaCl (Margesin *et al.*, 2001).

Lizano O. (2012), caracterizó bioquímicamente la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2, aislada de la Bahía de Paracas (Ica), cultivó la bacteria en medio LB (Luria-Bertani) a temperatura ambiente durante 24 horas. Para determinar la actividad lipolítica de la *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2, utilizó agar SW 5 % con tributirina 1 % a temperatura ambiente por 48 horas; la hidrólisis del sustrato se evidenció por la formación de un halo transparente. También, cuantificó la actividad lipolítica utilizando como sustratos tween 80 y aceite de oliva al 1 %; los cuales no fueron degradados; esta respuesta evidenció que *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2 produce una lipasa del grupo VI o esterasa la cual además presenta actividad óptima a 20 °C, pH 7 y concentración salina 5 %.

Luque y Quesada (2010), estudiaron la biodiversidad de microorganismos halófilos en Rambla Salada (Murcia - España) con el fin de aislar nuevas especies de Halomonas productoras de compuestos de

aplicación industrial y/o biotecnológica, realizaron cuatro muestreos que fueron procesados mediante las técnicas de microbiología clásicas y las bacterias aisladas fueron caracterizadas fenotípica y filogenéticamente, de los cuales se seleccionaron al azar un total de 365 cepas en función de su morfología colonial. Tras el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal ARN 16S se identificaron 164 de estas cepas como pertenecientes al género *Halomonas*, de estas cepas 24 (15%) mostraron actividad de amilasa, 101 (62%) tenían actividad de DNAsa, 68 (41%) pusieron de manifiesto actividad de proteasa y 116 (71%) revelaron actividad de lipasa. Los resultados indicaron que la actividad lipasa, concretamente sobre Tween 20 es la más predominante dentro del género *Halomonas*.

Molina, (2008), aisló cinco cepas bacterianas halófilas y halotolerantes productoras de amilasas que fueron aisladas de la región Andina de Bolivia. Determinó el sustrato óptimo para la producción de amilasas a partir de tres diferente fuentes de almidón (papa, yuca y maíz) y caracterizó los rangos físico químicos óptimos de crecimiento, morfología, análisis bioquímicos de las cepas. Obtuvo una mayor actividad enzimática de las cepas Lv14 (0.788 mmol/min.) y Lc6 (0.603 mmol/min.) siendo las que tienen mayor actividad enzimática frente al sustrato almidón de yuca a las 48 de incubación. Además, determinó que las cepas Lc6 y Lv14 fueron halotolerantes, las cepas LB7, LB14 y V26 fueron halófilas y todas las cepas fueron neutrófilos y mesófilas.

Narváez (2007), investigó bacterias halófilas con actividad proteolítica en la costa ecuatoriana, que contribuyó en el conocimiento de la microbiota en ecosistemas marinos de Ecuador y permitió identificar aislados bacterianos con gran potencial biotecnológico, ya que no sólo producen compuestos de gran interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. Utilizó 48

muestras pero obtuvo crecimiento bacteriano en 29 muestras en caldo nutritivo; el 55,17% (16 aislados) de las bacterias que presentaron crecimiento bacteriano mostraron actividad proteolítica evidenciando la formación de halos de degradación alrededor de los aislados bacterianos. De 2 aislados bacterianos observo bacilos Gram positivos que manifestaron actividad proteolítica formando halos con diámetros aproximados a los 10 mm, 3 aislados presentaron halos aproximados a 15 mm, 2 aislados bacterianos con halos aproximados a los 20 mm, 3 aislados con halos superiores a los 25 mm. El 50% (8 aislados) del total de bacterias con actividad proteolítica presentaron halos superiores a los 15 mm.

Ramírez, et al., en un estudio en el año 2004 presentaron una extensa revisión sobre las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas basados en aspectos relacionados con su ecología en los ambientes hipersalinos, sus características como microorganismos extremófilos y sus diversas e importantes aplicaciones en la industria y en la biotecnología por su alta estabilidad en condiciones extremas, y producción de enzimas, polímeros, solutos compatibles así como, en la biodegradación de residuos, en la producción de alimentos fermentados siendo aprovechados como fabricantes alternativos de *Escherichia coli*, para la producción de proteínas recombinantes.

Sánchez-Porro, et al., (2003), realizaron estudios de bacterias halófilas productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares, de un total de 9848 colonias aisladas, 269 fueron productoras de amilasas, 201 productoras de proteasa, 207 productoras de lipasa, 118 productoras de DNasa y 97 productoras de pululanasa. 122 bacterias halófilas fueron seleccionadas al azar para su caracterización, estas bacterias son capaces de crecer de manera óptima en los medios con 5-15% de sales y en mayoría de los casos de hasta 20-25% de sales, las cepas fueron identificadas como miembros de los géneros: *Salinivibrio* (55 cepas),

Halomonas (25 cepas), *Chromohalobacter* (02 cepas), *Bacillus* - *Salibacillus* (29 cepas), *Salinicoccus* (02 cepas) y *Marinococcus* (01 cepa).

Sánchez, et al., (2004), aislaron un total de 26 cepas de bacterias marinas con actividad proteolítica que fueron aisladas de agua de mar contaminadas con efluentes pesqueros; las mismas se evaluaron en base al crecimiento y formación de halos de actividad en Agar Marino suplementado con caseína al 1%, pH 8,0, incubados a 25 °C por 72 h. Cinco cepas fueron seleccionadas por presentar los mejores halos de actividad fueron evaluadas a su vez por su crecimiento y producción de proteasas a diferentes concentraciones de NaCl, rangos de temperatura y pH, siendo consideradas como bacterias halotolerantes, psicrotíficas y alcalófilas moderadas; siendo las cepas del género *Pseudomonas* las que mayor actividad proteolítica presentaron, seguidas del género *Aeromonas*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por las bacterias halófilas de los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa

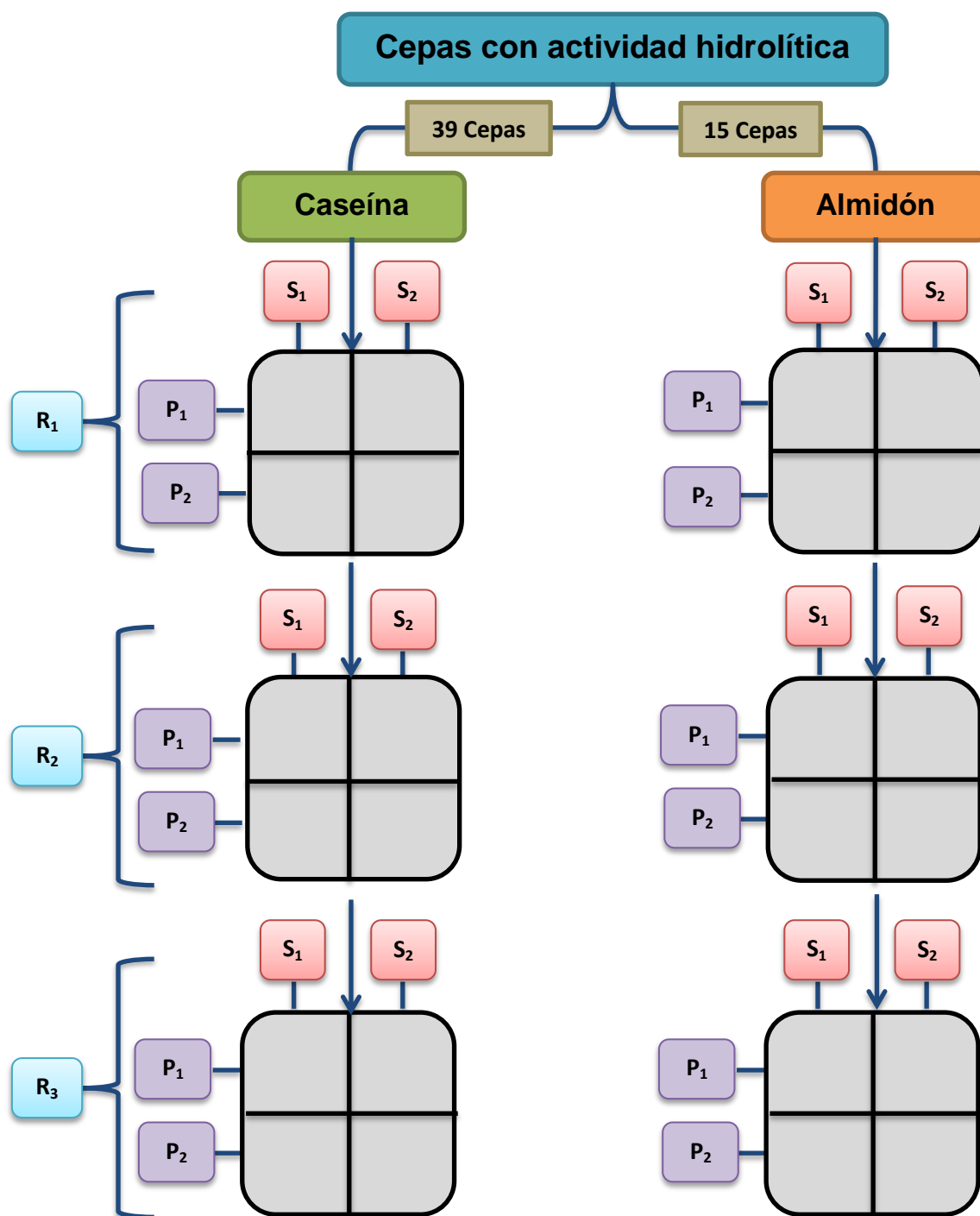
3.1.2 Población y muestra de estudio

La población estuvo constituida por bacterias halófilas presentes en 12 estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa - Lambayeque y la muestra por cincuenta y cuatro cepas de bacterias halófilas con actividad hidrolítica frente a los sustratos almidón y caseína influenciada por dos niveles de pH (7 y 8) y dos niveles de salinidad (6 y 10%) con tres repeticiones experimentales.

3.1.3 Medios de cultivo

Se emplearon: Caldo Marino con 4.5 % de sales suplementado con Extracto de levadura al 0.3%, para el enriquecimiento de bacterias halófilas; Agar Marino al 10 % de sales, para el aislamiento de bacterias halófilas; caldo Peptonado con diferentes concentraciones de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20%) así como caldo Peptonado sin sal, para determinar la tolerancia a la sal de las cepas seleccionadas y Agar Marino al 10% de sales con los sustratos caseína y almidón al 2%, para determinar la actividad hidrolítica. (Anexo 1)

Diseño factorial con 3 factores, pH (7 y 8), salinidad (6 y 10) y cepas de bacterias halófilas seleccionadas con actividad hidrolítica frente a los sustratos almidón y caseína con 3 repeticiones experimentales.



S_1 , S_2 : Salinidad 6% y salinidad 10%.

P_1 , P_2 : pH 7 y pH 8.

R_1 , R_2 , R_3 : Repeticiones

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Lugar de muestreo

El muestreo de las bacterias halófilas se realizó en doce estanques salinos ubicados en la Caleta Santa Rosa (provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque) aproximadamente a unos 150 m. de la playa. Estas salinas están ubicadas a 6° 53' 34.87" latitud Sur y 79° 54' 33.08" longitud oeste en Lambayeque (Guzmán y Hurtado, 2011) (Anexo 2). Estos estanques tenían una dimensión de 3m por 4m aproximadamente, poco profundos, forma irregular en donde se almacena el agua de mar y en el tiempo por evaporación solar se produce la cristalización del cloruro de sodio. (Fig. 1)

3.2.2 Obtención de la muestra

Las muestras de agua fueron recolectadas de los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa en forma manual en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, con tapa rosca, debidamente identificados, los mismos que fueron transportados al laboratorio de Bacteriología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo donde fueron conservados en refrigeración para su estudio posterior.

Los muestreos se realizaron en los meses de Noviembre y Diciembre del 2013 así como en el mes de Enero del 2014. En cada muestreo se tomaron de cada estanque salino dos muestras, una de superficie y otra a 20 cm de profundidad de cada estanque salino, haciendo un total de ocho muestras; de estas se hicieron mediciones de pH y Temperatura. El mismo procedimiento se realizó para los meses de Diciembre y Enero respectivamente. (Fig. 2)



Fig. 1. Estanques salinos de la Caleta Santa Rosa.

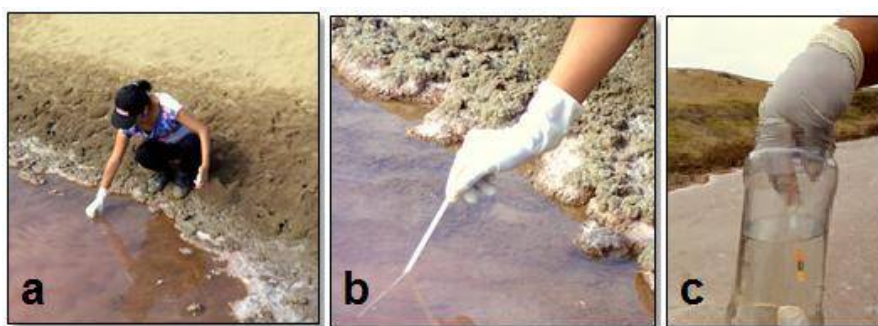


Fig. 2. Toma de muestra en estanque salino de la caleta Santa Rosa (a), medida de temperatura y pH del estanque salino (b y c).

3.2.3 Enriquecimiento de las bacterias halófilas

Para el enriquecimiento de las bacterias halófilas se utilizó frascos con Caldo Marino con 4.5 % de sales doble concentrado suplementado con Extracto de levadura al 0.3%. En cada frasco se colocó 10 ml de medio y 10 ml de la muestra de agua superficial y profunda de cada estanque salino de la Caleta Santa Rosa. Se incubaron a 35°C por un periodo de 48 horas, evaluando los cultivos cada día anotando las características de crecimiento (turbidez y sedimento). Se analizaron los cultivos mediante tinción de Gram para observar y confirmar la presencia de las bacterias halófilas. (Fig. 3)



Fig. 3. Enriquecimiento de Bacterias Halófilas de los estanques Salinos A, B, C, D

3.2.4 Aislamiento de bacterias halófilas

Para el aislamiento se utilizó placas con Agar Marino al 10 % y la siembra se realizó empleando el método de siembra en superficie. Las placas se incubaron a una temperatura de 35°C por un tiempo máximo de 24 horas; transcurrido el tiempo se procedió a evaluar los cultivos analizando las colonias macroscópicamente y microscópicamente con el estereoscopio marca Nikon SMZ-1B y el Microscopio eléctrico binocular, modelo L200, CARL ZEISS respectivamente, utilizando el objetivo de menor aumento haciendo un estudio detallado de las colonias diferentes.

Para la descripción de las colonias, se tomaron en cuenta parámetros de color, forma, borde, brillo, elevación y consistencia; la caracterización morfológica celular se llevó a cabo realizando una tinción de GRAM a cada colonia diferente, describiendo su forma, disposición y reacción al GRAM. También se realizó el método de gota pendiente para observar la movilidad de las bacterias. (Francia 2011)

Las colonias seleccionadas fueron codificadas y conservadas en Medio Marino al 10% de sal a pH 7.

3.2.5 Prueba de tolerancia salina a diferentes concentraciones de NaCl de cepas seleccionadas

Se utilizó caldo Peptonado con diferentes concentraciones de NaCl, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20%, así como en caldo Peptonado sin sal. (Modificado de Sánchez *et al.*, 2004). Se sembraron las cepas y se incubaron a 35°C por 24 horas, al término de este tiempo se observó el crecimiento bacteriano y se anotó el rango de crecimiento así como el óptimo al mismo. Se utilizó el esquema de crecimiento de bacterias halófilas de Sánchez – Porro 2005 para confirmar si las bacterias fueron halófilas o halotolerante seleccionando solo las bacterias halófilas para el experimento.

3.2.6 Determinación de la actividad hidrolítica de los metabolitos de bacterias halófilas

Para determinar la actividad hidrolítica, se siguió una adaptación de Sánchez *et al.*, 2004 con relación a la aplicación de placas con Agar Marino al 10% de sal utilizando como sustratos caseína y almidón al 2% a pH 7. Las mismas que fueron sembradas con cada una de las cepas seleccionadas e incubadas a 35°C de temperatura, después de un periodo de incubación de hasta por 7 días en un ambiente aeróbico, se procedió a la medición de los halos de hidrolisis en mm.

Las cepas con actividad hidrolítica mayores de 5 mm fueron seleccionadas para aplicar el diseño factorial.

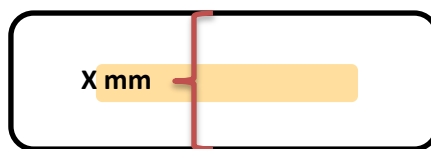


Fig. 4. halo de hidrólisis expresados en mm.

3.2.7 Determinación del efecto de la salinidad y pH en la actividad hidrolítica de los metabolitos de bacterias halófilas seleccionadas

Para determinar el efecto de la salinidad y pH se utilizó el diseño factorial con 3 factores, pH (7 y 8), salinidad (6 y 10) y cepas de bacterias halófilas seleccionadas con actividad hidrolítica. Para ello se utilizaron cuatro placas con agar caseína al 2% y cuatro placas con agar almidón a la misma concentración, las mismas que fueron incubadas a 35°C hasta por un tiempo máximo de 7 días. (Modificado de Sánchez *et al.*, 2004)

Este tratamiento se realizó por triplicado para cada cepa seleccionada. Después del tiempo de incubación se realizó la evaluación de la actividad hidrolítica de la cepa frente a los sustratos utilizados anotando la medición del halo de actividad hidrolítica. Las cepas con mayor actividad hidrolítica fueron seleccionadas para su identificación posterior.

3.2.8 Identificación de las cepas con actividad hidrolítica

Se realizó un estudio de las características morfológicas de las bacterias teñidas por el método de Gram utilizando los criterios de forma, disposición y reacción al Gram, también la movilidad por el método de gota pendiente; y un estudio del

crecimiento a diferentes concentraciones de sal. Finalmente se realizaron pruebas bioquímicas de Mellado, *et al.* (1996), Arahal *et al.* (2001), Llamas, *et al.* (2011), para el reconocimiento de *Salinivibrio* y *Halomonas* y para el género *Pseudoalteromonas*, se comparó con la tabla de identificación publicada por Sánchez-Porro (2005), recomendadas por Francia, (2011) con la finalidad de identificar las cepas seleccionadas.

3.2.9 Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados y presentados en tablas y gráficos para observar el efecto de la salinidad y pH sobre la actividad hidrolítica de los metabolitos de bacterias halófilas, además se realizó un análisis de varianza (ANAVA) con arreglos factorial para la interpretación de la hipótesis planteada y así mismo fueron utilizadas las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey, para determinar la influencia de los factores. Para estos análisis estadísticos se utilizó el software estadística versión 5,0.

Se utilizó el programa Microsoft Excel 2010 para el ordenamiento de los datos.

IV. RESULTADOS

1. Descripción de los Estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa

Los doce estanques salinos de la Caleta Santa Rosa durante los meses de Noviembre 2013 a Enero 2014, se caracterizaron por la forma y tamaño irregular, poco profundas con una dimensión aproximada de 3 m a 4 m y la mayoría con sal en formación. El pH del agua estuvo en un rango de alcalinidad de 7 a 8 y la temperatura osciló durante el tiempo de muestreo entre 26°C y 34°C, siendo mayor en el mes de Enero. (Fig. 5) (Tabla 1)

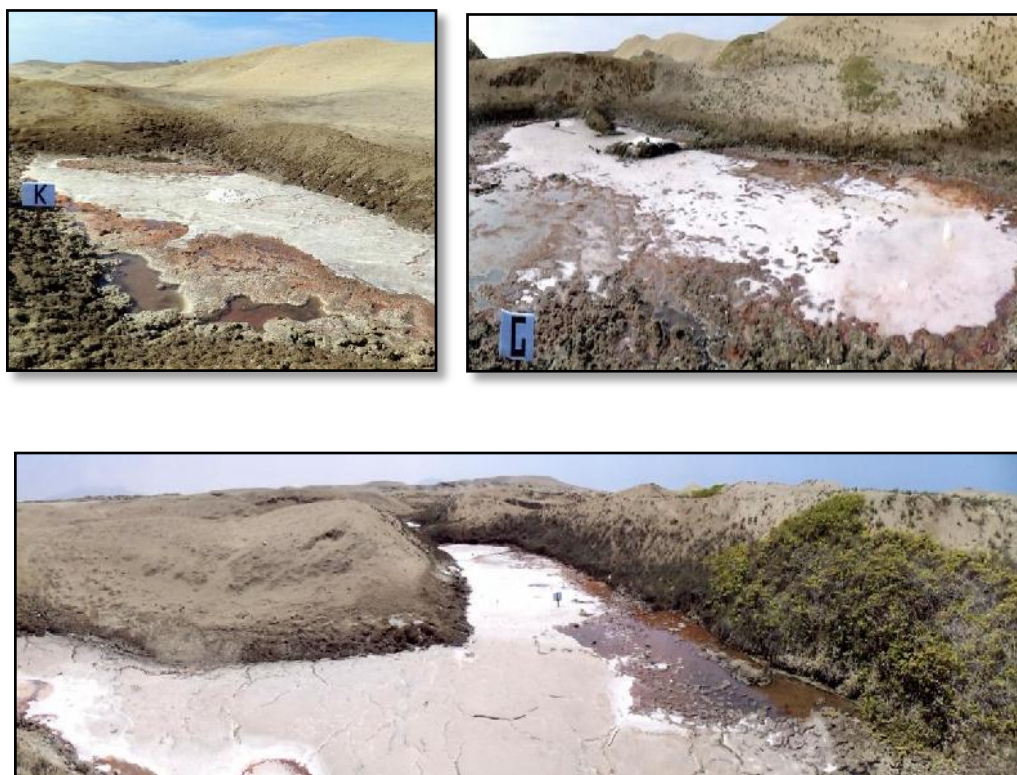


Fig. 5. Estanques Salinos calificadas con las letras K, G y D en de la Caleta Santa Rosa, Lambayeque – Perú.

Tabla 1. Características físico químicas de los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa. Noviembre 2013 – Enero 2014

| Estanque salino | Fecha | Hora | T° (°C) | pH | Características |
|------------------------|--------------|-------------|----------------|-----------|--|
| A | 25-11-13 | 9:40 | 26 | 7 | Forma irregular, borde rojizo, superficie cubierta de sal. |
| B | 25-11-13 | 9:55 | 27 | 7 | Forma irregular, borde rojizo, agua sin sal en la superficie. |
| C | 25-11-13 | 10:30 | 31 | 8 | Forma ovalada, superficie con sal, sin pigmentos. |
| D | 25-11-13 | 10:50 | 29 | 7 | Forma en L, borde irregular, agua con sal en la superficie, pigmentación rojiza. |
| E | 28-12-13 | 8:20 | 27 | 7 | Forma y borde irregular, agua con sal en la superficie, pigmentación rojiza. |
| F | 28-12-13 | 8:35 | 26 | 8 | Forma irregular, agua con sal, pigmentación rojiza. |
| G | 28-12-13 | 8:50 | 32 | 8 | Forma y borde irregular, agua con sal, borde con pigmentación rojiza y barro. |
| H | 28-12-13 | 9:10 | 29 | 8 | Forma ovalada, agua con pigmentación rojiza, sedimento de sal, escasa sal en el borde. |
| I | 20-01-14 | 9:10 | 32 | 8 | Forma rectangular, borde irregular, agua con sal, pigmentación rojiza. |
| J | 20-01-14 | 9:28 | 33 | 8 | Forma y borde irregular, borde rojizo con mínima cantidad de sal, sal en el fondo. |
| K | 20-01-14 | 9:35 | 34 | 8 | Forma irregular, agua con sal con pigmentación anaranjado, con sal en la superficie. |
| L | 20-01-14 | 9:50 | 29 | 8 | Forma ovalada, borde irregular, agua con sal en el fondo. |

2. Caracterización morfológica de las cepas seleccionadas de bacterias halófilas.

Se caracterizaron 121 cepas de bacterias halófilas aisladas de agar marino en donde el 100 % desarrollaron colonias circulares, el 80.9% (98 cepas) desarrollaron colonias de borde entero y el 19.1% (23 cepas) borde hialino. Con relación al color el 22.3% (27 cepas) fueron blancas y el 77.7% (94 cepas) fueron cremas; todas las colonias fueron brillantes y de consistencia lisa. (Fig. 6).

Microscópicamente, el 83.5% del total de las cepas presentaron forma bacilar, rectos y algunos curvados, de los cuales el 79.3% (96 cepas) fueron Gram negativas y el 4.1% (5 cepas) Gram positivas dispuestas en agrupaciones irregulares, pares y aislados, algunos con gránulos metacromáticos. El 16.5% fueron cocos Gram positivos, aislados y agrupados, y el 84.3% fueron móviles, como se observa en la Fig. 7, Tabla 2, Anexo 3.

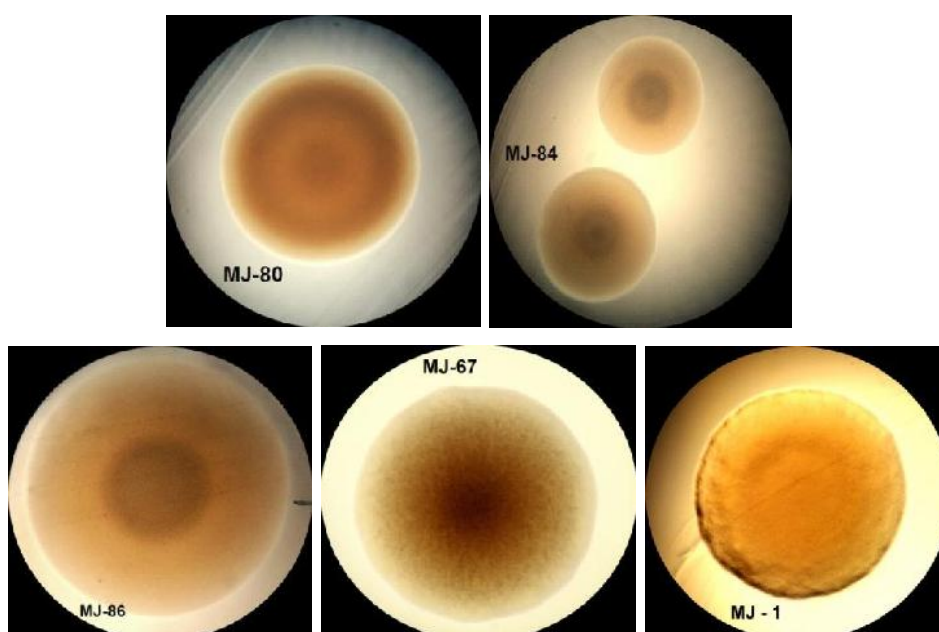


Fig. 6. Colonias de cepas seleccionadas de bacterias halófilas: MJ-1, MJ-67, MJ-80, MJ-84 y MJ-86 observadas con microscopio a 4X, después de un periodo de incubación de 35°C durante 24 horas.

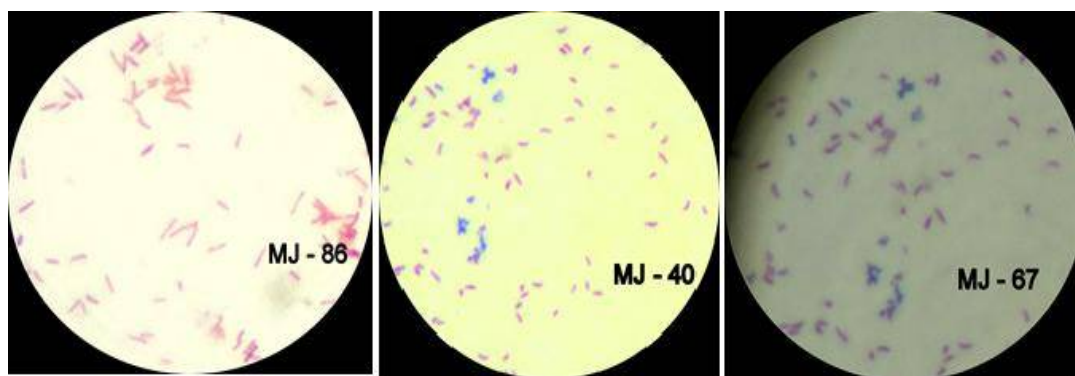


Fig.7. Morfología celular de las cepas MJ-40, MJ-67 y MJ-86 observadas al microscopio 100X

Tabla 2: Porcentaje de cepas aisladas de los Estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa, según sus características morfológicas.

| Características | Número de cepas | % cepas |
|--------------------------|-----------------|---------|
| COLONIA | | |
| Forma: | | |
| • Circular | 121 | 100 |
| Color: | | |
| • Blanco | 27 | 22.3 |
| • Cremas | 94 | 77.7 |
| Borde: | | |
| • Entero | 98 | 80.9 |
| • Hialino | 23 | 19.1 |
| Elevación: | | |
| • Convexa | 76 | 62.8 |
| • Semielevada | 41 | 33.9 |
| • Plana | 04 | 3.3 |
| Brillo: | | |
| • Brillantes | 121 | 100 |
| Consistencia: | | |
| • Lisa | 121 | 100 |
| CELULA BACTERIANA | | |
| Reacción de GRAM: | | |
| • Positivo | 25 | 20.7 |
| • Negativo | 96 | 79.3 |
| Forma Celular: | | |
| • Bacilo | 101 | 83.5 |
| • Coco | 20 | 16.5 |
| Movilidad: | | |
| • Positiva | 102 | 84.3 |
| • Negativa | 19 | 15.7 |

3.Tolerancia a NaCl de las cepas aisladas de las salinas de la Caleta Santa Rosa.

De las 121 cepas seleccionadas, el 74.4% (90 cepas) crecieron en presencia de NaCl a partir de 2%, siendo su rango optimo entre 6 % a 10%. El 6.6% (8 cepas) crecieron entre 2% a 10% de NaCl; 16.5% (20 cepas) entre 2 a 12% de NaCl; 3.3% (4 cepas) entre 2 a 14% de NaCl; 12,4% (15 cepas) entre 2 a 16% de NaCl; 3.3% (4 cepas) entre 2 a 18% de NaCl; 4.1% (5 cepas) entre 2 a 20% de NaCl. A partir de la concentración de 4% de NaCl, el 10.7% (13 cepas) creció entre 4 a 12%, 4.1% (5 cepas) entre 4 a 14% , 1.7% (2 cepas) entre 4 a 16%, 5% (6 cepas) entre 4 a 18% y 6.6% (8 cepas) entre 4 a 20%, representando a este grupo a las bacterias halófilas, a diferencia del 25.6% (31 cepas) de las bacterias que crecieron en ausencia de NaCl y se distribuyeron de la siguiente manera, entre 0 y 10% creció el 6.6% (8 cepas), entre 0 y 12% creció el 1.7% (2 cepas), entre 0 y 14% creció el 10.7%(13 cepas), entre 0 y 16% creció el 4.1%(5 cepas), entre 0 y 18% creció el 0.8%(1 cepas), y entre el 0 y 20% creció el 1.7%(2 cepas) (Fig. 8, ANEXO 4)

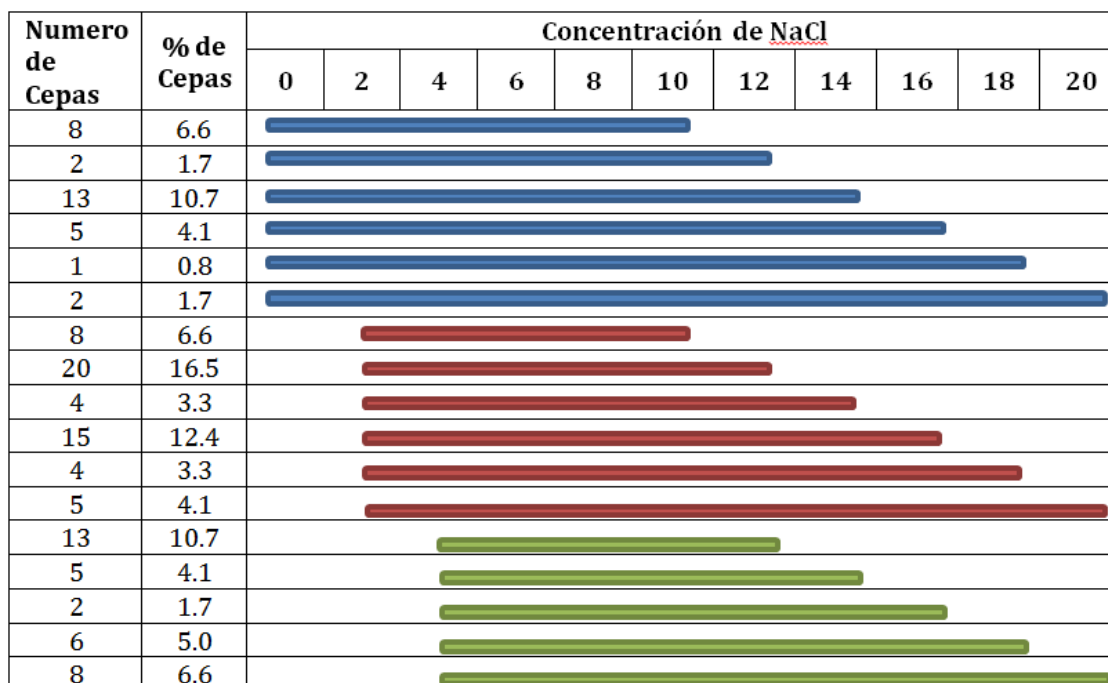


Fig. 8. Porcentaje de cepas según su crecimiento en ausencia de NaCl y a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20%)

4. Actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente a los sustratos almidón y caseína.

Del total de cepas aisladas el 32.2% (39 cepas) presentaron actividad hidrolítica frente al sustrato caseína con un promedio de 31.2 mm de halo (Fig. 9), mientras que con el sustrato almidón la actividad hidrolítica fue muy baja alcanzando un promedio de 7mm de halo en 15 cepas que representan el 12.4%. Así mismo 8 Cepas (MJ-24, MJ-40, MJ-43, MJ-64, MJ-67, MJ-70, MJ-80, MJ-84) presentaron actividad hidrolítica tanto con la caseína como con el almidón. Anexo 5

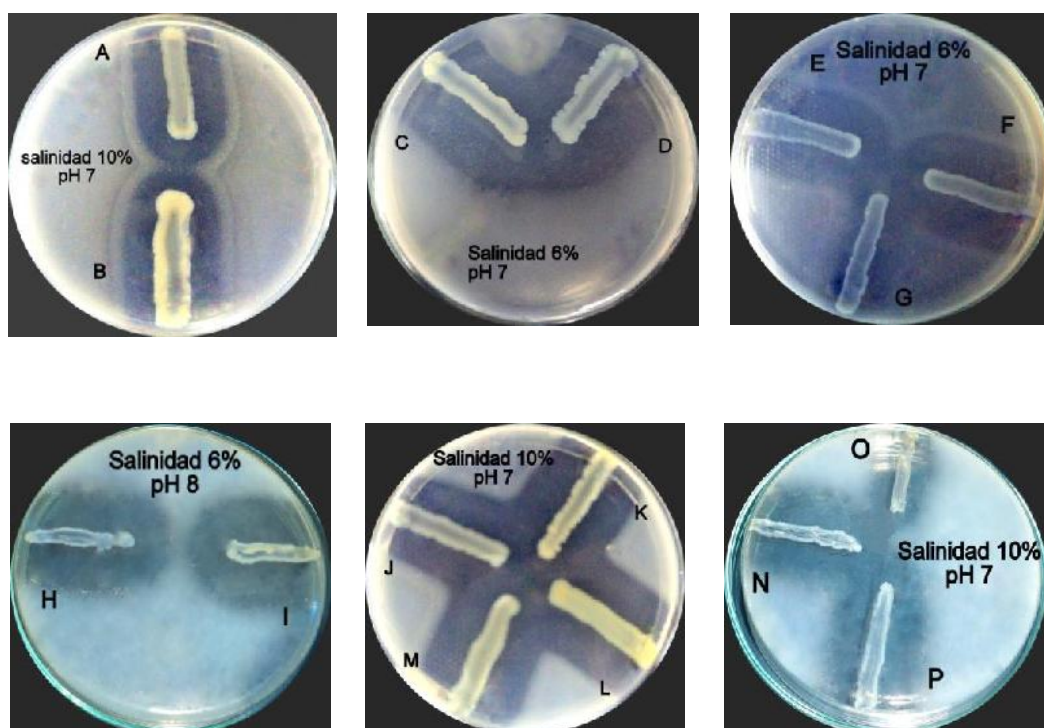


Fig. 9. Halos de actividad de las cepas MJ-24(A), MJ-43(B), MJ-40(C), MJ-67(D), MJ-80(E), MJ-70(F), MJ-72(G), MJ-86(H), MJ-84(I), MJ-64(J), MJ-66(K), MJ-73(L), MJ-99(M), MJ-1(N), MJ-29(O), MJ-2(P), de bacterias halófilas aisladas de las Salinas de la Caleta Santa Rosa, frente al sustrato Caseína en 72 horas.

5.Promedios de la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente al sustrato caseína

De las 39 cepas seleccionadas con actividad hidrolítica frente a la caseína, la cepa MJ-67 alcanzo el promedio más alto con 38.67 mm a una salinidad de 6% a pH 7 y a salinidad 10% y pH7 con un halo promedio de 38.33 mm, seguido por las cepas MJ-86 con un halo promedio de actividad de 37 mm a una salinidad de 6% y pH 7. Las cepas MJ-55 y MJ-112 alcanzaron el mismo promedio (36.67 mm) a la misma salinidad y al mismo pH. Los promedios más bajos de actividad hidrolítica (6 y 5 mm de halo) se obtuvieron con las cepas MJ-109 y MJ-110 a una salinidad de 6% y pH 8, como se observa en la Tabla 3 y Fig.10.

Tabla 3.- Promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a Caseína a diferentes niveles de pH (7 y 8) y salinidad (6 y 10%) de las cepas de bacterias halófilas seleccionadas aisladas de las Salinas de la Caleta Santa Rosa.

| CEPA | salinidad 6% | | salinidad 10% | |
|--------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| | pH 7 | pH 8 | pH 7 | pH 8 |
| MJ-1 | 36 | 32 | 31.33 | 30.33 |
| MJ-2 | 31.67 | 30 | 31.33 | 32 |
| MJ-3 | 32.33 | 28 | 27.33 | 28 |
| MJ-11 | 29.33 | 29 | 30.67 | 26.33 |
| MJ-21 | 26.33 | 22 | 27 | 22 |
| MJ-24 | 30.67 | 29.67 | 30 | 27 |
| MJ-29 | 12 | 14 | 10 | 0 |
| MJ-40 | 36 | 34.33 | 32.33 | 33.67 |
| MJ-41 | 22.33 | 20.67 | 21.67 | 21 |
| MJ-43 | 34.33 | 32 | 31.67 | 32.67 |
| MJ-44 | 12 | 10 | 12 | 10.33 |
| MJ-45 | 0 | 11 | 14 | 10.33 |
| MJ-46 | 10.33 | 12.67 | 10.67 | 13 |
| MJ-47 | 33 | 26.67 | 31 | 27 |
| MJ-55 | 36.67 | 18.67 | 29.33 | 28 |
| MJ-64 | 19 | 20.33 | 21.67 | 24.33 |
| MJ-65 | 30.33 | 33.67 | 32 | 33 |
| MJ-66 | 18.67 | 21.33 | 21.33 | 20.33 |
| MJ-67 | 38.67 | 32.33 | 38.33 | 32.33 |
| MJ-68 | 10 | 12 | 12.67 | 10 |
| MJ-70 | 19.33 | 10.33 | 15 | 15 |
| MJ-72 | 24 | 12.67 | 14 | 21.33 |
| MJ-73 | 31.33 | 24.67 | 20.33 | 20.67 |
| MJ-79 | 12 | 0 | 11 | 0 |
| MJ-80 | 35 | 30.33 | 35 | 33 |
| MJ-82 | 30.67 | 29.33 | 30.67 | 32.33 |
| MJ-84 | 36 | 32 | 34.67 | 32 |
| MJ-85 | 10 | 12 | 10 | 10.67 |
| MJ-86 | 37 | 32 | 30 | 27 |
| MJ-87 | 32.67 | 30 | 32 | 30 |
| MJ-98 | 33.33 | 30.33 | 31 | 28.33 |
| MJ-99 | 20 | 18.33 | 21 | 18.67 |
| MJ-100 | 33 | 28 | 29 | 28 |
| MJ-106 | 20.33 | 17.67 | 10.33 | 0 |
| MJ-107 | 30 | 33 | 28.33 | 30 |
| MJ-108 | 19.67 | 21 | 19 | 22.33 |
| MJ-109 | 12.67 | 6 | 12 | 10 |
| MJ-110 | 9 | 5 | 10.33 | 10 |
| MJ-112 | 36.67 | 18.67 | 29.67 | 26 |

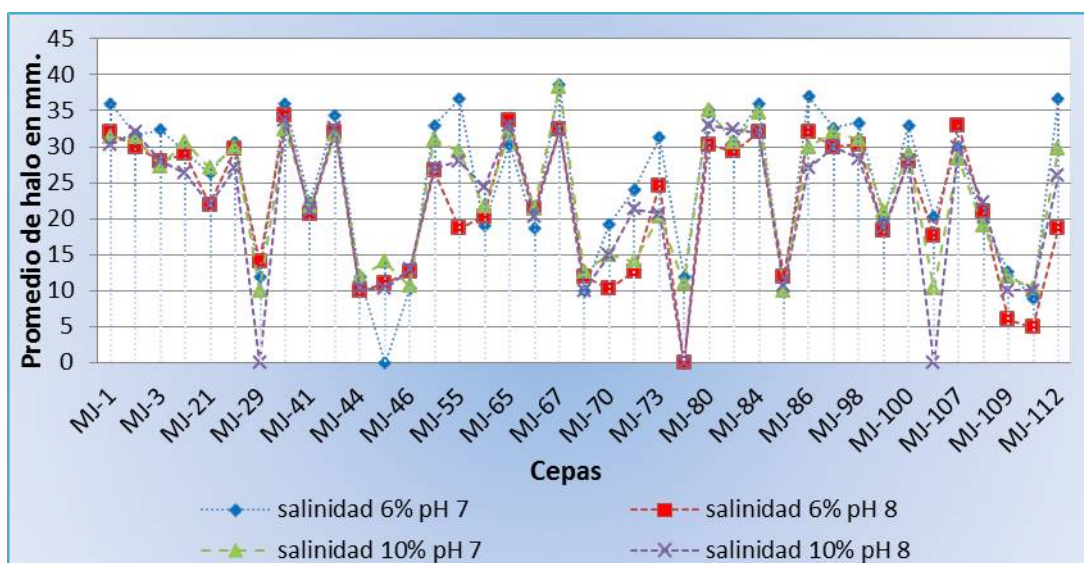


Fig. 10. Promedio de los halos de actividad hidrolítica de las cepas de bacterias halófilas frente a caseína con dos niveles de pH y salinidad.

6. Efecto de la salinidad y pH en la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente a caseína.

El análisis de varianza de los promedios de los halos de actividad hidrolítica por influencia de las variables simples cepa, pH, salinidad y sus interacciones dobles y triples, demuestra que existe diferencia significativa en los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas frente al sustrato caseína, como lo demuestra en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis de varianza de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las 39 cepas halófilas frente a caseína con influencia de dos niveles de pH y dos niveles de salinidad.

- H₀₁:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas frente a la caseína.
- H₀₂:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas por efecto del pH frente a la caseína.
- H₀₃:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas por efecto de la salinidad frente a la caseína.
- H₀₄:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción cepa*pH frente a la caseína.
- H₀₅:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción cepa*salinidad frente a la caseína.
- H₀₆:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción pH*salinidad frente a la caseína.
- H₀₇:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción cepa*pH*salinidad frente a la caseína.

| FV | F _c | F _t (0.05) | Significancia | Decisión |
|---------------|----------------|-----------------------|---------------|-------------------------|
| CEPA | 2415.7 | 1.444 | **** | Rechazar H ₀ |
| pH | 1458 | 3.871 | **** | Rechazar H ₀ |
| S | 184.32 | 3.871 | **** | Rechazar H ₀ |
| CEPA * pH | 85.867 | 1.444 | **** | Rechazar H ₀ |
| CEPA * S | 80.098 | 1.444 | **** | Rechazar H ₀ |
| pH * S | 169.28 | 3.871 | **** | Rechazar H ₀ |
| CEPA * pH * S | 71.092 | 1.444 | **** | Rechazar H ₀ |

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las cepas de bacterias halófilas frente a caseína con influencia de pH (Tabla 5), confirma que la cepa MJ-67 a pH 7 alcanzó un halo promedio de 38.5 mm, seguido por la cepa MJ-84 a pH 7 cuyo halo promedio fue de 35.33 mm, demostrando que existe diferencia significativa en los promedios de los halos de actividad hidrolítica de ambas cepas; mientras que con las cepas MJ-45 a pH 7 y MJ-29 a pH 8, los promedios fueron los más bajos, 7 mm de halo. Esto confirma la influencia del factor pH en la actividad hidrolítica de las cepas.

Tabla 5. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa*pH.

| CEPA | pH | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia |
|--------|----|-----------------------|------------------------|
| MJ-45 | 7 | 7 | **** |
| MJ-29 | 8 | 7 | **** |
| MJ-70 | 8 | 12.67 | **** |
| MJ-106 | 7 | 15.33 | **** |
| MJ-72 | 8 | 17 | **** |
| MJ-73 | 7 | 25.83 | **** |
| MJ-11 | 8 | 27.67 | **** |
| MJ-80 | 7 | 35 | **** |
| MJ-84 | 7 | 35.33 | **** |
| MJ-67 | 7 | 38.5 | **** |

En la tabla 6, de la prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedio de los halos de actividad hidrolítica frente a la caseína con relación a la salinidad se observa que las cepas MJ-67 con salinidad 6 y 10% y la cepa MJ-40 con salinidad 6% alcanzaron los promedios más altos de actividad, 35.5, 35.33 y 35.17 mm respectivamente; mientras que con las cepas MJ-29 y la cepa MJ-106 con salinidad de 10%, alcanzaron los promedios más bajos, 5 y 5.17mm respectivamente.

Tabla 6. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa*salinidad.

| CEPA | Salinidad % | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia |
|--------|-------------|-----------------------|------------------------|
| MJ-29 | 10 | 5 | **** |
| MJ-106 | 10 | 5.17 | **** |
| MJ-109 | 6 | 9.33 | **** |
| MJ-29 | 6 | 13 | **** |
| MJ-72 | 10 | 17.667 | **** |
| MJ-64 | 10 | 23 | **** |
| MJ-55 | 6 | 27.67 | **** |
| MJ-87 | 10 | 31 | **** |
| MJ-43 | 6 | 33.17 | **** |
| MJ-40 | 6 | 35.17 | **** |
| MJ-67 | 10 | 35.3 | **** |
| MJ-67 | 6 | 35.5 | **** |

En la tabla 7, de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de actividad hidrolítica frente a la caseína con relación a las interacciones dobles, pH y salinidad, confirma que las bacterias halófilas en medio con 6% de salinidad y pH 7 alcanzó el promedio más alto de actividad hidrolítica, mientras que a una salinidad 10% y pH 8 el promedio fue más bajo, confirmando la influencia de los factores pH y salinidad en la actividad hidrolítica.

Tabla 7. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, con relación a pH y salinidad.

| pH | Salinidad % | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia |
|----|-------------|-----------------------|------------------------|
| 8 | 10 | 22.059 | **** |
| 8 | 6 | 22.09 | **** |
| 7 | 10 | 23.58 | **** |
| 7 | 6 | 25.18 | **** |

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las 39 cepas de bacterias halófilas frente a caseína por influencia de los factores pH y salinidad, se observó que la cepa MJ-67 a una salinidad de 6% y pH 7 alcanzó un halo promedio de 38.67 mm, mientras que las cepas MJ-110 y MJ-109 a la misma salinidad y pH, 6% y 8 respectivamente, alcanzaron los promedio más bajos, demostrando estadísticamente que no existe diferencia significativa entre estas dos últimas cepas, como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a caseína, en la interacción cepa, pH y salinidad.

| CEPA | pH | Salinidad % | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia | |
|--------|----|----------------|-----------------------------|------------------------|------|
| MJ-110 | 8 | 6 | 5 | **** | |
| MJ-109 | 8 | 6 | 6 | **** | |
| MJ-44 | 8 | 10 | 10.33 | **** | |
| MJ-55 | 8 | 6 | 18.67 | **** | |
| MJ-72 | 7 | 6 | 24 | **** | |
| MJ-1 | 7 | 10 | 31.33 | **** | |
| MJ-112 | 7 | 6 | 36.67 | **** | **** |
| MJ-86 | 7 | 6 | 37 | **** | **** |
| MJ-67 | 7 | 10 | 38.33 | **** | **** |
| MJ-67 | 7 | 6 | 38.67 | | **** |

7. Influencia del pH y salinidad en la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente al almidón.

De las 15 cepas seleccionadas con actividad hidrolítica frente al almidón, la cepa MJ-80 a una salinidad de 6% y a pH 7 alcanzo un halo de 12 mm de actividad siendo este el mayor promedio, seguido por la cepa MJ-67 con un halo promedio de actividad de 10 mm con una salinidad de 10% y a pH7. Las cepas MJ-63 con una salinidad de 10% y a pH7, la cepa MJ-59 con una salinidad de 6% y a pH 8 y la cepa MJ-43 con una salinidad de 6% y a pH 7 alcanzaron los promedios más bajos con halos de actividad de 6.33 mm, demostrando que los factores pH y salinidad influyen en la actividad hidrolítica. (Tabla 9, Fig. 11).

Tabla 9.- Promedio de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a almidón a dos niveles de pH (7 y 8) y salinidad (6 y 10%) de las cepas seleccionadas.

| CEPA | salinidad 6% | | salinidad 10% | |
|----------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| | pH 7 | pH 8 | pH 7 | pH 8 |
| M J - 13 | 7 | 8.67 | 7.33 | 9 |
| M J - 24 | 7 | 8.67 | 7.33 | 8.33 |
| M J - 39 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| M J - 40 | 8.67 | 7 | 7.33 | 0 |
| M J - 43 | 6.33 | 0 | 7 | 0 |
| M J - 51 | 7.33 | 7 | 7 | 7.33 |
| M J - 59 | 7 | 6.33 | 6.67 | 7 |
| M J - 60 | 7.33 | 7 | 7.33 | 6.67 |
| M J - 63 | 7.33 | 6.67 | 6.33 | 7 |
| M J - 64 | 7 | 8.33 | 8 | 7.33 |
| M J - 67 | 8.67 | 7 | 10 | 7 |
| M J - 70 | 8.33 | 7 | 8.33 | 9 |
| M J - 75 | 7 | 7.67 | 9 | 7.67 |
| M J - 80 | 12 | 9.33 | 7 | 7 |
| M J - 84 | 8 | 0 | 7 | 7 |

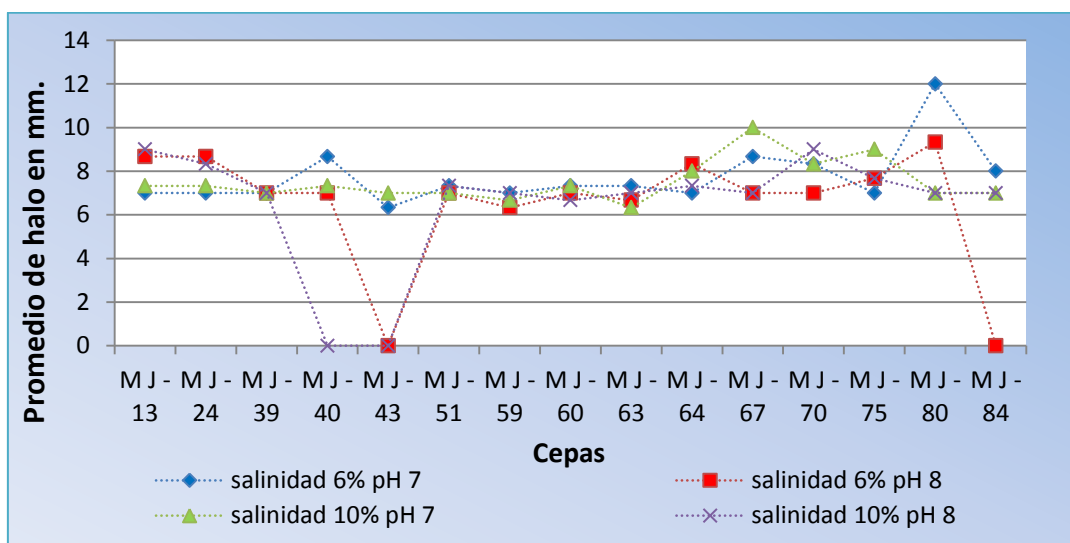


Fig. 11. Promedio de los halos de actividad hidrolítica de las cepas de bacterias halófilas frente a almidón con dos niveles de pH y salinidad

El análisis de varianza de los promedios de los halos de actividad hidrolítica por influencia de las variables simples cepa, pH y sus interacciones dobles cepas * pH, cepas * salinidad y triple cepas * pH * salinidad, demuestra que existe diferencia significativa en los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas frente al sustrato almidón, mientras que con la variable salinidad y la interacción pH * salinidad se acepta la H_0 , que no existe diferencia significativa, como se observa en la tabla 10.

Tabla 10. Análisis de varianza de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de 15 cepas halófilas frente al almidón con influencia de dos niveles de pH y dos niveles de salinidad.

- H₀₁:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas frente al almidón.
- H₀₂:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas por efecto del pH frente al almidón.
- H₀₃:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas por efecto de la salinidad frente al almidón.
- H₀₄:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción cepa*pH frente al almidón.
- H₀₅:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción cepa*salinidad frente al almidón.
- H₀₆:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción pH*salinidad frente al almidón.
- H₀₇:** No existe diferencia significativa en la actividad hidrolítica de las 15 cepas de bacterias halófilas por efecto de la interacción cepa*pH*salinidad frente al almidón.

| FV | F _c | F _t (0.05) | Significancia | Decisión |
|----------------------|----------------|-----------------------|---------------|-------------------------------|
| CEPAS | 141.112245 | 1.775 | **** | Rechazar H₀ |
| pH | 336.035714 | 3.920 | **** | Rechazar H₀ |
| S | 1.75 | 3.920 | Ns | Acepta H₀ |
| CEPAS * pH | 104.22449 | 1.775 | **** | Rechazar H₀ |
| CEPAS * S | 61.0612245 | 1.775 | **** | Rechazar H₀ |
| pH * S | 0.89285714 | 3.920 | Ns | Acepta H₀ |
| CEPA * pH * S | 40.46 | 1.775 | **** | Rechazar H₀ |

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las cepas de bacterias halófilas frente almidón con influencia de pH, confirma que el promedio más alto de actividad hidrolítica lo alcanzó la cepa MJ-80 a pH 7 con un halo promedio de 9.5 mm, mientras que con las cepas MJ-40 y MJ-84 a pH 8, alcanzaron los promedios fueron los más bajos con 3.5 mm de halo, como se observa en la tabla 11.

Tabla 11. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente almidón, en la interacción cepa*pH.

| CEPA | pH | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia | |
|---------|----|-----------------------|------------------------|------|
| M J- 40 | 8 | 3.5 | **** | |
| M J-84 | 8 | 3.5 | **** | |
| M J-60 | 8 | 6.83 | **** | |
| M J-67 | 8 | 7 | **** | |
| M J-64 | 8 | 7.83 | **** | |
| M J-40 | 7 | 8 | **** | |
| M J-80 | 8 | 8.17 | **** | |
| M J-13 | 8 | 8.83 | **** | **** |
| M J-67 | 7 | 9.33 | **** | **** |
| M J-80 | 7 | 9.5 | | **** |

En la tabla 12, de la prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedio de los halos de actividad hidrolítica frente almidón con relación a la salinidad se observa que la cepa MJ-80 con salinidad 6% alcanzó un halo promedio de actividad hidrolítica de 10.67 mm, siendo este el promedio más alto; mientras las cepas MJ-43 a una salinidad de 6%, MJ-43 y MJ-40 a salinidad 10% y MJ-84 a salinidad 6% alcanzaron los promedio más bajos y similares estadísticamente siendo estos 3.17, 3.5, 3.67 y 4 mm respectivamente.

Tabla 12. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a almidón, en la interacción cepa*salinidad.

| CEPA | Salinidad % | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia |
|--------|-------------|-----------------------|------------------------|
| M J-43 | 6 | 3.17 | **** |
| M J-43 | 10 | 3.5 | **** |
| M J-40 | 10 | 3.67 | **** |
| M J-84 | 6 | 4 | **** |
| M J-63 | 10 | 6.67 | **** |
| M J-64 | 10 | 7.67 | **** |
| M J-75 | 10 | 8.33 | **** |
| M J-67 | 10 | 8.5 | **** |
| M J-70 | 10 | 8.67 | **** |
| M J-80 | 6 | 10.67 | **** |

Las comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de actividad hidrolítica frente almidón con relación a las interacciones dobles, pH y salinidad (Tabla 13), confirma que los promedios de los halos de actividad hidrolítica son similares estadísticamente, siendo los promedios más altos a una salinidad 6% y a pH 7 y con salinidad 10% y pH 7, mientras que los promedios más bajos fueron obtenidos por las interacciones salinidad 10% y pH 8 y salinidad 6% y a pH 8.

Tabla 13. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos (mm) de actividad hidrolítica frente a almidón, con relación a pH y salinidad.

| pH | Salinidad % | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia |
|----|-------------|-----------------------|------------------------|
| 8 | 10 | 6.49 | **** |
| 8 | 6 | 6.51 | **** |
| 7 | 10 | 7.51 | **** |
| 7 | 6 | 7.64 | **** |

Asimismo, frente al sustrato almidón, las comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halos de actividad hidrolítica de las 15 cepas influenciados por los factores pH y salinidad, confirma que con la cepa MJ-80 la actividad hidrolítica fue mayor alcanzando un halo promedio de 12 mm con una salinidad 6% y pH 7, mientras que con las cepas MJ-63 con una salinidad de 10 y a pH 7, MJ-59 con una salinidad de 6 y a pH 8 y MJ-43 con una salinidad de 6% y a pH 7, se confirma que los promedios de actividad fueron los más bajos, 6.33 mm, como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparaciones múltiples de Tukey de los promedios de los halo (mm) de actividad hidrolítica frente a almidón, en la interacción cepa*pH*salinidad.

| CEPAS | pH | Salinidad % | Promedio de halo (mm) | Nivel de Significancia | | |
|-------|----|-------------|-----------------------|------------------------|------|------|
| MJ-63 | 7 | 10 | 6.33 | **** | | |
| MJ-59 | 8 | 6 | 6.33 | **** | | |
| MJ-43 | 7 | 6 | 6.33 | **** | | |
| MJ-70 | 8 | 6 | 7 | **** | **** | |
| MJ-51 | 8 | 10 | 7.33 | **** | **** | **** |
| MJ-84 | 7 | 6 | 8 | | **** | **** |
| MJ-67 | 7 | 6 | 8.67 | | **** | **** |
| MJ-80 | 8 | 6 | 9.33 | | | **** |
| MJ-67 | 7 | 10 | 10 | | | **** |
| MJ-80 | 7 | 6 | 12 | | | **** |

8. Identificación de cepas seleccionadas con mayor actividad hidrolítica

Las tres cepas seleccionadas de bacterias halófilas, fueron identificadas por pruebas bioquímicas y de crecimiento utilizadas por Francia (2011), cuyos resultados se muestran en las tablas 15, 16 y 17.

Según las pruebas bioquímicas, la cepa MJ – 1 produjo acidez de glucosa, maltosa, lactosa, xilosa, manitol pero no de sacarosa, no produjo indol ni redujo los nitratos a nitritos, la hidrólisis de la urea, almidón y gelatina fue negativa, en cambio la caseína fue positiva. No produjo gas ni hidrogeno sulfurado y la síntesis de la lisina descarboxilasa también fue negativa. La cepa MJ – 67, produjo acidez de glucosa, maltosa y xilosa pero no de manitol, lactosa ni sacarosa; al igual que la cepa anterior no redujo los nitratos a nitritos. No produjo hidrólisis de la urea ni de la arginina, pero si del almidón, caseína y gelatina. La cepa MJ – 86, produjo acidez de glucosa, maltosa y lactosa, pero no de manitol, xilosa y sacarosa; ni redujo nitratos a nitritos, la hidrólisis de la urea y almidón fue negativa, en cambio la caseína, gelatina y arginina fue positiva. No produjo gas ni hidrogeno sulfurado y la síntesis de la lisina descarboxilasa también fue negativa (tabla 15, 16 y 17). La cepa MJ-80 presento hidrólisis del almidón, pero no pudo ser identificada bioquímicamente.

Según los resultados de identificación de las cepas halófilas aisladas de los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa, reportados por Francia (2011), las cepas MJ-1, MJ-67 y MJ-86, por sus características de crecimiento y comportamiento bioquímico, fueron identificadas como de los géneros *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Salinivibrio*.

Tabla 15. Identificación de la cepa MJ-86 aislado de las salinas de Santa Rosa y su comparación con el género *Salinivibrio*.

| Características | MJ -86 | <i>Salinivibrio</i> * |
|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Morfología | Bacilos curvados | Bacilos curvados |
| Pigmentación | - | - |
| Flagelo polar | + | + |
| Flagelo peritricos | - | - |
| Crecimiento sin NaCl | - | - |
| Crecimiento en 20 % NaCl | + | + |
| Crec. opt. en 5 a 10 % NaCl | + | + |
| Producción de ácido de glucosa | + | + |
| Hidrolisis de Gelatina | + | + |
| Hidrolisis de Almidón | - | - |
| VP | + | + |
| Indol | - | - |
| Arginina descarboxilasa | + | + |
| Lisina descarboxilasa | - | - |
| Utilización del citrato | - | - |

* Francia (2011).

Tabla 16. Identificación de la cepa MJ-1 aislado de las salinas de Santa Rosa y su comparación con el género *Halomonas*.

| Características | MJ - 1 | <i>Halomonas</i> * |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Morfología | Bacilos curvados | Bacilos curvados |
| Pigmentación | - | - |
| Flagelo polar | - | - |
| Flagelo peritricos | + | (+) |
| Crecimiento sin NaCl | - | - |
| Crecimiento en 20 % NaCl | - | (-) |
| Crec. opt. en 5 a 10 % NaCl | + | + |
| Glucosa | + | + |
| Hidrolisis de Gelatina | - | - |
| Hidrolisis de Almidón | - | ND |
| VP | + | ND |
| Indol | - | (-) |
| Arginina descarboxilasa | - | ND |
| Lisina descarboxilasa | - | ND |
| Utilización del citrato | - | - |

(+) Mas especies son positivas (-) Mas especies son negativas
(ND) No determinado.*Francia (2011).

Tabla 17. Identificación de la cepa MJ-67 aislado de las salinas de Santa Rosa y su comparación con el género *Pseudoalteromonas*.

| Características | MJ - 67 | <i>Pseudoalteromonas</i> * |
|-----------------------|---------------------|----------------------------|
| Crecimiento con NaCl | 2-18 % (opt 6-10 %) | 1-17.5 % (opt 7.5-10) |
| Temperatura | 35° C | 10-35°C (opt 30-37) |
| Catalasa | + | + |
| Hidrolisis de: | | |
| - Almidón | + | + |
| - Caseína | + | + |
| - Gelatina | + | + |
| Indol | - | - |
| Reducción de Nitratos | | |
| RM | + | + |
| VP | - | - |
| Citrato | - | - |
| Ureasa | - | - |
| H ₂ S | - | - |
| LIA | - | - |
| Glucosa | + | + |
| Lactosa | - | - |
| Maltosa | + | + |

*Francia (2011).

V. DISCUSIÓN

Los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa se encuentran ubicados al sur de la caleta, aproximadamente a 150 m de la playa. Durante los meses de Noviembre y Diciembre del 2013 y Enero del 2014, meses de muestreo, se encontró 12 estanques caracterizados por tener forma y tamaño irregular, de poca profundidad, en su mayoría con pigmentación rojiza en el borde y con sal en formación siendo estas características muy similares a algunos estanques salinos de Huacho – Perú descrita por **Montoya et al., (1984)**. Dichos estanques presentaron un pH promedio de 7.5 y una temperatura entre 26°C – 34°C, características reportadas por **Fuentes et al.**, en los estanques salinos de la misma caleta durante el año 2013. Con relación al pH y temperatura, pero con diferencias en este último por sus valores bajos, 27.5 °C y 28.3 °C, probablemente estas diferencias se deben a los meses de realizadas las mediciones

Por sus características físico- químicas, los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa, sirve de hábitat para bacterias halófilas y halotolerantes, en su mayoría bacilos cortos Gram negativos con una fuerte tendencia al polimorfismo, observaciones similares a las reportadas por **Ventosa et al., (1982)** en las Salinas de España. Asimismo las características morfológicas de las colonias aisladas en el presente trabajo fueron de forma circular de borde entero, la mayoría de color crema, brillantes y de consistencia lisa, coincidentes estas observaciones con **Francia (2011)**.

Las bacterias aisladas de los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa tuvieron un crecimiento óptimo entre 6 y 10% de NaCl, 90 cepas presentaron crecimiento a partir de 2 y 4% de sal, mientras que 31 cepas presentaron crecimiento en ausencia de sal, resultados similares fueron obtenidos por **Sánchez et al., (2004)** quienes encuentran que la mayoría de sus cepas crecieron en un amplio rango de NaCl incluyendo la ausencia de esta en su

medio. A diferencia de **Francia (2011)** que infiere que sus cepas crecieron solo en presencia de sal con un rango óptimo de 8 a 16% NaCl para la cepa SR-55 y de 6 a 12% NaCl para la cepa SR-35.

De las 121 cepas seleccionadas en la investigación el 32.2% (39 cepas) presentaron actividad hidrolítica frente al sustrato caseína y el 12.4% (15 cepas) frente a almidón, estos resultados difieren con los encontrados por los investigadores, **Ayala et al., (2010)**, quienes aislaron de la laguna de Chairkota – Bolivia, 19.7% de cepas halófilas que sintetizaron proteasas y 8.4% amilasas de un total de 71 cepas, esta diferencia se debe probablemente a la composición de sales de los estanques salinos, al origen y a la cantidad de materia orgánica presente; además, difiere también de los resultados de **Cojoc et al., (2009)**, quienes que aislaron de la mina salina en Slanic Prahova-Rumania, el 46% de cepas con actividad de caseinasa y el 32% de cepas con actividad amilolítica, esto probablemente se deba a las condiciones ambientales y composición química existente en la mina. Por otro lado también existe diferencia con los resultados de las investigaciones de **Flores et al., (2010)** que aislaron bacterias halófilas de ambientes salinos de Pilluana, Huacho, Maras, Chilca, Paracas y Ventanilla (Perú) con capacidad degradadora de los sustratos, caseína (59%) y almidón (75%) respectivamente, diferencia que puede deberse a la capacidad enzimática de las cepas y a la naturaleza de los sustratos empleados.

En la presente investigación solo el 6.6% (8 cepas) presentó actividad hidrolítica frente a los dos sustratos, diferente a lo encontrado por Francia 2011, quien reporta que de 30 cepas pre seleccionadas en su investigación, 5 cepas presentaron actividad hidrolítica frente a los sustratos, almidón y caseína esta diferencia se debe probablemente al tiempo y lugar de muestreo. Además, también difiere de los resultados de **Sánchez-Porro et al., (2003)** que aislaron de ambientes hipersalinos de España, 4 cepas con actividad hidrolítica no solo frente a almidón y caseína sino frente a otros sustratos como lipasa, DNasa y pululasa, demostrando los investigadores que estas bacterias producen enzimas extracelulares con gran potencial industrial como amilasas, proteasa, lipasa, DNasa, pululasa y xilanasas; muchas de estas enzimas pueden ser

estables y activas en más de una condición extrema, como elevadas salinidad y temperatura y/o amplio rango de pH.

Con relación a la influencia de pH en la actividad hidrolítica de las 39 cepas seleccionadas frente a caseína, 30 cepas a pH 7 alcanzaron la mayor actividad hidrolítica y 9 cepas a pH 8, probablemente se deba a que la mayoría de proteasas de origen bacteriano tiene a pH neutro mejor actividad enzimática como lo señala **Zaragoza (2011)**.

La salinidad, por otro lado, no influyó significativamente en la actividad hidrolítica de las bacterias seleccionadas, pero cuando interactuó con el factor pH las diferencias fueron notorias, las cepas a un pH 7 y una salinidad de 6% tuvieron mayor actividad hidrolítica sobre el sustrato caseína, este resultado se vio demostrado con la cepa MJ-67 que alcanzó el promedio más alto a una salinidad de 6% y a pH 7 con 38.67 mm de halo, a diferencia de los resultados reportados por **Sánchez et al., en el 2004**, quienes registraron halos de 25 mm a pH 8 a 25°C de temperatura con la cepa CM-48, esta diferencia probablemente se debe a la influencia del pH que fue mayor en comparación con la presente investigación demostrando que el pH neutro es el adecuado para mayor actividad enzimática, como lo señaló **Zaragoza (2011)**, quien logró aislar 17 cepas, de las cuales 12 mostraron actividad proteolítica a pH 7.

La actividad hidrolítica frente a almidón de las 15 cepas seleccionadas, fue mayor a pH 7 en este caso la salinidad no influyó independientemente pero si cuando interactuó con el pH, coincidiendo con el estudio realizado por **Demissie (2014)**, quien observó la actividad de la enzima amilasa a intervalos de pH 5,0 a 9,0, con un óptimo a pH 7 y a una temperatura de 35°C y que al aumentar este factor la actividad de amilasa disminuyó o pudo ser inactivado alterando el pH por debajo o encima del óptimo, probablemente se deba a que la amilasa es dependiente de la salinidad pero aún más de la relación pH-temperatura.

Por otro lado, las cepas MJ-80 y MJ-67, demostraron tener actividad frente al sustrato caseína y almidón, siendo estas las que alcanzaron mayor

halo de actividad hidrolítica frente al sustrato almidón. La cepa MJ-80 alcanzó un halo de actividad de 12 mm a pH 7 y a una salinidad de 6%, resultados que no coinciden con los descritos por **Francia (2011)**, quien obtuvo el mayor nivel de producción enzimática con su cepa SR-35 a pH 8 y a una salinidad de 10%, probablemente estas diferencias se deban a la temperatura utilizada en las investigaciones y al tiempo de recolección de muestras, por otro lado, la cepa MJ-67 alcanzó su mayor nivel de actividad hidrolítica a pH 7 y a salinidad 10%, coincidiendo estos resultados con las investigaciones de **Coronado et al., (2000)** quienes estudiaron la alfa amilasa de *Halomonas meridiana*, observando que la actividad hidrolítica frente al sustrato almidón se produjo hasta con 30% de salinidad pero que el óptimo fue con salinidad de 10% a pH 7, además, sostiene que para la actividad optima de amilasa de bacterias halófilas deben cultivarse hasta el final de la fase exponencial(al menos 20 horas), y en medios con 5 % de sal, en presencia de almidón y en ausencia de glucosa.

Finalmente, por sus características de crecimiento y comportamiento bioquímico, las cepas MJ-1, MJ-67 y MJ-86 con mayor actividad hidrolítica fueron caracterizadas utilizando la pruebas bioquímicas señaladas en las tablas de Mellado, et al. (1996), Ventosa, et al. (2006), Arahai, et al. (2001, 2002), Quillaguamàn, et al. (1996), Peconek, et al. (2006) Prado, et al. (2006) y Sanchez Porro (2005) en Francia 2011, correspondiente a los géneros *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Salinivibrio*, coincidiendo con los resultados **Francia (2011)**, quien encontró a los géneros *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Salinivibrio*, tres géneros del grupo de las bacterias halófilas moderadas que habitan los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa y Salinas de Mórrope.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente investigación se concluye lo siguiente:

1. De las 121 cepas de bacterias halófilas aisladas de los estanques salinos de la Caleta Santa Rosa, 39 cepas presentaron actividad hidrolítica frente a caseína, 15 cepas con actividad hidrolítica frente a almidón y 8 cepas con ambos sustratos.
2. La mayor actividad hidrolítica de las bacterias halófilas fue frente al sustrato caseína y la actividad más baja frente al sustrato almidón.
3. La actividad hidrolítica de bacterias halófilas frente a caseína y almidón fue mayor con una salinidad de 6% y pH 7, siendo la cepa MJ-67 quien mostro mejor comportamiento frente a caseína y la cepa MJ-80 frente a almidón.
4. Las cepas seleccionadas MJ-1, MJ-67 Y MJ-86 fueron identificadas como de los géneros *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* y *Salinivibrio* respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

De la investigación realizada se recomienda lo siguiente:

1. Investigar la actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente a otros sustratos.
2. Estudiar las bacterias halófilas con actividad hidrolítica de otros ambientes salinos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYALA V. 2010. Aislamiento, caracterización parcial y perfil de producción enzimática de Bacterias Halófilas y Halotolerantes de la Laguna Chairkota, Potosí – Bolivia. Centro de Biotecnología – Universidad Mayor de San Simón de Bolivia. Disponible en:
http://feriatecnologia.fcyt.umss.edu.bo/ganadores/area_ciencias_vida/1_lugar_produccion%20enzimatica.pdf
- BHATNAGAR T, BOUTAIBA S, HACENE H, CAYOL J, FARDEAU M, OLLIVIER B. 2005. Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. FEMS Microbiology Letters 248 (2005) 133–140. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.femsle.2005.05.044/pdf>
- CASTRO L, FLORES A, RODRÍGUEZ A, AGUILAR M, AGUILAR C, RODRIGUEZ R. 2011. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de Cuatro Ciénegas Coahuila - México. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 3(5). Disponible en:
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM5/aislamiento.pdf>
- COJOC R, MERCIU S, POPESCU G, DUMITRU L, KAMEKURA M. Y ENACHE M. 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. Romanian Biotechnological Letters. 14(5): 4658-4664.
- Demissie A. 2014. Isolation, characterization and cultivation of novel bacteria from Lake Chamo for production of amylase. Academia Journal of Microbiology Research 2(2): 054-060. Disponible en:

<https://www.academiapublishing.org/journals/ajmr/abstract/2014/Dec/Demissie.htm>

FÉLIX M., RAMIREZ E, YEANNES M. 2006. Bacterias halófilas extremas deteriorantes en anchoita salada. Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos. 24. Disponible en:
http://www.uca.edu.ar/uca/common/grupo5/files/bacterias_halofilas_deteriorantes-vida_util-_UCA2.pdf

FLORES M, ZAVALA A, ZAMBRANO A, CERVANTES L, IZAGUIRRE V. 2010. Bacterias Halófilas Moderadas Productoras de Hidrolasas de Interés Biotecnológico. Ciencia e Investigación Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 13(1). Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v13_n1/pdf/a08v13n1.pdf

FRANCIA O, ALVITRES V. 2011. Efecto de la salinidad en la capacidad amilolítica de dos cepas halófilas moderadas SR-35 y SR-55 aisladas de los estanques salinos de la caleta Santa Rosa – Lambayeque. Ciencia, Tecnología y humanidades, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 2(2):11-20.

FUENTES A, CARREÑO C, LLANOS C. 2013. Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”. Revista Scientia Agropecuaria, ISSN-e 2077-9917, Vol. 4, Nº. 2, págs.111-120.
Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4405542>

GUZMÁN, C.; HURTADO, A. 2011. Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de *Solanum tuberosum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

HOLT J, BERGY D. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. 1994. Disponible en:

http://books.google.es/books?id=jtMLzaa5ONcC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

LUQUE R, QUESADA E, BÉJAR V, LLAMAS I. 2010. Aislamiento de cepas del género *Halomonas* con interés biotecnológico en *Rambla Salada* (Murcia). *Ars Pharmaceutica*. 51(3). Disponible en:

http://farmacia.ugr.es/ars/ars_web/ProjectARS/pdf/688.pdf

LIZANO O. 2012. Caracterización Bioquímica de la actividad Lipolítica de *Pseudoalteromonas Atlantica* Aislada de la Bahía de Paracas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

MARGESIN, R., AND SCHINNER, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5, 73-83.

NARVÁEZ T. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias aerobias halófilas con actividad proteolítica procedentes de piscinas de la industria de sal ECUASAL localizada en Santa Elena – Ecuador. Ecuador: Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Sede Sangolqui. Disponible en:

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/580/1/T-ESPE-025287.pdf>

NINFA RAMÍREZ D., JOSÉ ANTONIO SERRANO R., HORACIO SANDOVAL T.(2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 37, núm. 3, julio-septiembre, 2006, pp. 56-71, Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México

PÉREZ-FERNÁNDEZ M.E., QUESADA E, GÁLVEZ J, RUIZ C. Effect of exopolysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas euriatina*, on the proliferation in vitro of human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000; 22: 131-41.

- RAMÍREZ N., SANDOVAL H., MARQUEZ M.C., ARAHAL D. Y RAMÍREZ H. (2004). Isolation and characterization of halophile actinomycetes from Mexico. International Symposium on Microbial Ecology, ISME-10. Cancun México. Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562004.
- RAMÍREZ N., SERRANO J., SANDOVAL H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 37, núm. 3, julio-septiembre, 2006, pp. 56-71, Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México
- RAMÍREZ N, SANDOVAL AH, SERRANO JA. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 24(1-2): 12-23. Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562004.
- SAHAGUN N. 1999. Mecanismo cinético de la L- Alanina Deshidrogenasa de *Halobacterium salinarum*. Universidad de Alicante. España. Disponible en:
<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3968/1/Sahag%C3%BAn%20Casa%20nova%2c%20Nuria.pdf>
- SÁNCHEZ-PORRO C, MARTÍN S, MELLADO E, VENTOSA A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. Journal of Applied Microbiology. 94(2) Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x/full>
- SÁNCHEZ T, LEON J, WOOLCOTT J, ARAUCO K. 2004. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. Rev Perú biol. 11(2). Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172799332004

- VENTOSA A, QUESADA E, RODRIGUEZ F, RUIZ F. Y RAMOS A. 1982. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Journal of General Microbiology*. 128: 1959-1968.
- VENTOSA, A. Y NIETO, J.J. (1995). Biotechnological applications and potentialities o halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:85-94.
- VENTOSA, A. Y J. NIETO AND OREN. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(2): 504-544.
- ZARAGOZA CARMONA J. 2011. Aislamiento de cepas de *Bacillus* productoras de proteasas con potencial uso industrial. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas.
Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2955>.

IX. ANEXOS

ANEXO 01

Medios de cultivo para el aislamiento de bacterias halófilas

Tabla Nº 01. Caldo de enriquecimiento doble concentrado

| COMPUESTO | CANTIDAD |
|----------------------|----------|
| NaCl | 9 g |
| Agua destilada | 100 ml |
| Extracto de Levadura | 0.6 g |
| Peptona | 0.6 g |

Tabla Nº 02. Solución de Sales

| Compuesto | Cantidad al 6 % | Cantidad al 10% |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| NaCl | 46.8 g | 78 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 8.296 g | 13.827 g |
| SO ₄ Mg.7H ₂ O | 11.878 g | 19.797 g |
| KCl | 1.2 g | 2.0 g |
| NaBr | 0.156 g | 0.26 g |
| NaHCO ₃ | 0.0402 g | 0.067 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.173 g | 0.289 g |
| Agua Destilada | 1000 ml | 1000 ml |
| pH final | 7 | 7 |

*Rodríguez – Valera, 1985

Tabla Nº 03. Agar Marino

| Compuesto | Cantidad |
|----------------------|----------|
| Solución de sales | 100 ml |
| Extracto de levadura | 0.3 g |
| Agar | 1.5 g |
| Peptona | 0.3 g |

Medios de Cultivo para Determinar la Actividad Enzimática

Tabla N° 04. Agar caseína

| Compuesto | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Solución de sales | 100 ml |
| caseína | 2 g |
| Agar | 1.5 g |

Tabla N° 05. Agar Almidón

| Compuesto | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Solución de sales | 100 ml |
| Almidón | 2 g |
| Agar | 1.5 g |

ANEXO 02

Mapa de ubicación de los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa



ANEXO 03

Codificación y caracterización morfológica de las cepas aisladas de los estanques Salinos de la Caleta Santa Rosa.

| CARACTERIZACION DE LA COLONIA | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------|------|--------|----------|--------|-------------|--------------|--------|--------------|----------|-----------|
| CEPA | Forma Celular | Gram | Color | Forma | Borde | Elevación | Densidad | Brillo | Consistencia | Catalasa | Motilidad |
| MJ - 1 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 2 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | no | cremosa | - | + |
| MJ - 3 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | no | cremosa | - | + |
| MJ - 4 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 5 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 6 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 7 | coco | + | blanca | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 8 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 9 | coco | + | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | - |
| MJ - 10 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 11 | bacilo | - | crema | Ovalada | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 12 | bacilo | - | crema | Ovalada | entero | convexa | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 13 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 14 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 15 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 16 | bacilo | - | crema | Ovalada | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 17 | coco | + | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | - |
| MJ - 18 | bacilo | - | crema | Ovalada | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 19 | coco | + | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | - |
| MJ - 20 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | + |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|---------|---|--------|----------|---------|-------------|--------------|----|---------|---|---|
| MJ - 21 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 22 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 23 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 24 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 25 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 26 | bacilo | + | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 27 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 28 | bacilo | + | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 29 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 30 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | Oscura | Si | cremosa | - | + |
| MJ - 31 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 32 | Bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | Oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 33 | Bacilo | + | crema | Circular | entero | convexa | Oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 34 | coco | + | crema | Circular | entero | convexa | Transparente | si | cremosa | - | - |
| MJ - 35 | Bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | Oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 36 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 37 | coco | + | crema | Circular | hialino | Convexa | Oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 38 | Bacilo | - | crema | Circular | hialino | semielevada | oscura | No | cremosa | + | + |
| MJ - 39 | coco | + | crema | Circular | hialino | Convexa | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 40 | bacilos | - | crema | Circular | hialino | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 41 | cocos | + | crema | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 42 | cocos | + | blanco | Circular | entero | semielevada | transparente | si | cremosa | + | - |
| MJ - 43 | bacilo | - | blanca | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 44 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | Elevada | Oscura | si | Cremosa | + | + |
| MJ - 45 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | Si | cremosa | + | + |
| MJ - 46 | bacilo | - | crema | Circular | entero | elevada | oscura | no | cremosa | + | + |
| MJ - 47 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 48 | bacilo | - | crema | Circular | Entero | Convexa | Transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 49 | bacilo | - | crema | Ovalada | Entero | Convexa | Transparente | si | cremosa | + | + |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|---|--------|----------|-----------|-------------|--------------|----|---------|---|---|
| MJ - 50 | bacilo | - | crema | Ovalada | Entero | Convexa | Oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 51 | bacilo | - | crema | Circular | Entero | Convexa | Oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 52 | bacilo | - | blanca | Circular | irregular | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 53 | bacilo | - | crema | Circular | Entero | Convexa | Transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 54 | coco | + | crema | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 55 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 56 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 57 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 58 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 59 | coco | + | Blanca | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 60 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | Transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 61 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Plana | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 62 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | Transparente | si | cremosa | + | + |
| MJ - 63 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | Transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 64 | bacilo | - | blanca | Circular | hialino | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 65 | bacilo | - | crema | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 66 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 67 | bacilo | - | crema | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 68 | bacilo | - | blanca | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 69 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | Semiplano | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 70 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 71 | coco | + | Blanca | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 72 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 73 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Plana | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 74 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 75 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 76 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 77 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Plana | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 78 | bacilo | - | crema | Circular | entero | elevada | oscura | no | cremosa | + | + |

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|---|--------|----------|---------|-------------|--------|----|---------|---|---|
| MJ - 79 | bacilo | - | blanca | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 80 | bacilo | - | crema | Circular | hialino | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 81 | bacilo | - | blanca | Circular | entero | elevada | oscura | no | cremosa | - | + |
| MJ - 82 | bacilo | - | blanca | Circular | hialino | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 83 | bacilo | - | crema | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 84 | bacilo | - | crema | Circular | hialino | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 85 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 86 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | | cremosa | + | + |
| MJ - 87 | bacilo | - | blanca | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 88 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 89 | Coco | + | Crema | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 90 | Coco | + | Blanca | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 91 | bacilo | - | crema | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 92 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 93 | bacilo | - | Blanca | Circular | entero | Plana | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 94 | bacilo | - | blanco | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 95 | bacilo | - | crema | Circular | Hialino | semielevada | oscura | Si | Cremosa | + | + |
| MJ - 96 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 97 | bacilo | - | blanco | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 98 | bacilo | - | crema | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | Cremosa | + | + |
| MJ - 99 | bacilo | - | crema | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | Cremosa | - | + |
| MJ - 100 | bacilo | - | crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | Cremosa | + | + |
| MJ - 101 | bacilo | - | crema | Circular | Hialino | semielevada | oscura | Si | Cremosa | + | + |
| MJ - 102 | coco | + | crema | Circular | Entero | semielevada | oscura | Si | Cremosa | + | - |
| MJ - 103 | bacilo | + | crema | Circular | Hialino | semielevada | oscura | no | Cremosa | + | + |
| MJ - 104 | coco | + | crema | Circular | hialino | convexa | oscura | si | Cremosa | + | - |
| MJ - 105 | bacilo | - | crema | Circular | entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 106 | bacilo | + | blanco | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 107 | bacilo | - | blanco | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | + | + |

| | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|---|--------|----------|---------|-------------|--------------|----|---------|---|---|
| MJ - 108 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 109 | bacilo | - | blanco | Circular | hialino | semielevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 110 | bacilo | - | blanco | Circular | entero | semielevada | oscura | no | cremosa | - | + |
| MJ - 111 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | - | + |
| MJ - 112 | bacilo | - | blanco | Circular | entero | elevada | oscura | si | cremosa | + | + |
| MJ - 113 | Coco | + | Crema | Circular | entero | Convexa | Oscura | si | Cremosa | + | - |
| MJ - 114 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | convexa | oscura | Si | cremosa | + | + |
| MJ - 115 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | convexa | oscura | Si | cremosa | + | + |
| MJ - 116 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | elevada | transparente | si | cremosa | - | + |
| MJ - 117 | bacilo | - | Crema | Circular | entero | convexa | oscura | Si | cremosa | + | + |
| MJ - 118 | coco | + | Crema | circular | Hialino | convexa | oscura | Si | cremosa | + | - |
| MJ - 119 | coco | + | Crema | circular | Hialino | convexa | oscura | Si | cremosa | + | - |
| MJ - 120 | coco | + | Crema | circular | Entero | convexa | oscura | si | cremosa | + | - |
| MJ - 121 | bacilo | - | Crema | circular | entero | convexa | oscura | Si | cremosa | + | + |

ANEXO 04.

Crecimiento en ausencia de NaCl y a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20%) de bacterias halófilas.

| Concentración de NaCl | Cepas (MJ) |
|-----------------------|--|
| 0 - 2 % | 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 58, 59, 61, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 81, 85, 87, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 119, 121. |
| 4 - 6 % | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121. |
| 8 - 10 % | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121. |
| 12 - 14 % | 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 121. |
| 16 - 18 % | 2, 3, 9, 10, 11, 14, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 40, 42, 45, 47, 48, 51, 53, 54, 55, 58, 62, 63, 64, 67, 70, 72, 75, 76, 78, 85, 86, 89, 90, 91, 93, 100, 101, 103, 106, 107, 108, 111, 115, 119, 121. |
| 20% | 2, 10, 40, 42, 55, 62, 64, 76, 86, 90, 91, 100, 101, 108, 111. |

ANEXO 05

Tabla Nº 01. Actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente al sustrato caseína.

| Hidrolisis en mm | |
|------------------|---------|
| Cepas | Caseína |
| MJ - 1 | 31 |
| MJ - 2 | 29 |
| MJ - 3 | 33 |
| MJ - 11 | 29 |
| MJ - 21 | 25 |
| MJ - 24 | 29 |
| MJ - 29 | 12 |
| MJ - 40 | 30 |
| MJ - 41 | 22 |
| MJ - 43 | 30 |
| MJ - 44 | 12 |
| MJ - 45 | 16 |
| MJ - 46 | 10 |
| MJ - 47 | 31 |
| MJ - 54 | 30 |
| MJ - 63 | 21 |
| MJ - 64 | 33 |
| MJ - 65 | 20 |
| MJ - 66 | 35 |
| MJ - 67 | 15 |
| MJ - 69 | 18 |
| MJ - 71 | 16 |
| MJ - 72 | 20 |
| MJ - 78 | 10 |
| MJ - 79 | 33 |
| MJ - 81 | 33 |
| MJ - 84 | 33 |
| MJ - 85 | 10 |
| MJ - 86 | 33 |
| MJ - 87 | 30 |
| MJ - 98 | 30 |
| MJ - 99 | 20 |
| MJ - 100 | 30 |
| MJ - 106 | 10 |
| MJ - 107 | 30 |
| MJ - 108 | 21 |
| MJ - 109 | 12 |

Tabla N° 02. Actividad hidrolítica de las bacterias halófilas frente al sustrato almidón.

| Hidrolisis en mm | |
|------------------|---------|
| Cepas | Almidón |
| M J - 13 | 7 |
| M J - 24 | 7 |
| M J - 39 | 7 |
| M J - 40 | 7 |
| M J - 43 | 7 |
| M J - 51 | 7 |
| M J - 59 | 7 |
| M J - 60 | 7 |
| M J - 63 | 7 |
| M J - 64 | 8 |
| M J - 67 | 9 |
| M J - 70 | 8 |
| M J - 75 | 7 |
| M J - 80 | 8 |
| M J - 84 | 6 |