

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**INFERENCIA DE SECUENCIAS CODIFICANTES DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS PRODUCIDAS POR CEPAS BACTERIANAS
PREVIAMENTE AISLADAS DE COMPOSTA**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MASTER EN
BIOCIENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN BIODESCUBRIMIENTO**

ROQUE GUILLERMO RIVAS PÁRRAGA

**DIRECTOR: MVZ. ANTONIO JAVIER VALLECILLO MAZA, Ph.D.
CO-DIRECTOR: MAURICIO ESTEBAN MOSQUERA JORDÁN, Ph.D.**

Quito, junio 2021

© Escuela Politécnica Nacional (2021)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Roque Guillermo Rivas Párraga, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.



Roque Guillermo Rivas Párraga

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por el Ing. Roque Guillermo Rivas Párraga, bajo mi supervisión.



Mvz. Antonio J. Vallecillo, Ph.D.
DIRECTOR DE PROYECTO



Mauricio Mosquera Jordán, Ph.D.
DIRECTOR DE PROYECTO

A Jessy, Gael, Roque, Maura, Naty, Karla, Alejandro y Sohito.
Los amo y admiro.

Inferencia de Secuencias Codificantes de Enzimas Proteolíticas Producidas por Cepas Bacterianas Previamente Aisladas de Composta

Resumen: A pesar de la importancia de las proteasas termoestables para la mejora de los procesos industriales, se han realizado pocos esfuerzos en la prospección de nuevas enzimas a partir de microorganismos en Ecuador. El objetivo de este estudio fue identificar la actividad proteolítica de cepas bacterianas termófilas previamente aisladas de composta e inferir las secuencias codificantes de estas enzimas mediante una caracterización fenotípica y genómica. Tres aislados de un total de 20 mostraron actividad proteolítica a 55 °C, en medio LB enriquecido con leche descremada. La diversidad genética y la filogenia de las cepas bacterianas con actividad proteolítica se determinó mediante el análisis de las secuencias del ARNr 16S. Dos cepas se clasificaron como estrechamente relacionadas con *Bacillus subtilis* y una con *Bacillus thermoamylovorans*. Adicionalmente, se secuenció y anotó el genoma completo de dos de las cepas con actividad proteolítica. En ellas se identificaron cinco secuencias codificantes relacionadas con enzimas proteolíticas extracelulares potencialmente responsables de la actividad enzimática observada en los ensayos fenotípicos: Proteasa extracelular menor (Epr), Metaloproteasa extracelular (mpr), Proteasa extracelular menor (vpr), Bacilopeptidasa F (bpr) y Proteasa neutral B (nprB).

Palabras clave: compost; filogenia; genoma; proteasas; secuenciación; termófilos.

Inference of Proteolytic Enzyme Coding Sequences Produced by Bacterial Strains Previously Isolated from Compost

Abstract: Thermostable proteases are very important for the improvement of industrial processes; however, few efforts have been made in prospecting new enzymes from microorganisms in Ecuador. This study aimed to identify proteolytic activity of thermophilic bacterial strains previously isolated from compost and infer the coding sequences of those enzymes through genomic and phenotypic characterization. Three isolates out of twenty showed proteolytic activity at 55 °C, in LB media enriched with skimmed milk. The genetic diversity and phylogeny of the proteolytic-thermophilic bacterial strains were determined by analyzing 16S rRNA sequences. Bacterial strains were classified as closely related to *Bacillus subtilis* and *Bacillus thermoamylovorans*. Additionally, the whole genomes of two proteolytic strains were sequenced and annotated. We identified five coding sequences associated with extracellular proteases potentially responsible for enzymatic activities observed in the phenotypic assays: Minor extracellular protease (Epr), Extracellular metalloprotease (mpr), Minor extracellular protease (vpr), Bacilopeptidase F (bpr), and Neutral protease B (nprb).

Keywords: compost; genome; phylogeny; proteases; sequencing; thermophiles.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos tecnológicos mediados por enzimas reducen los tiempos, costos energéticos y además no son tóxicos (Choi et al., 2015; Li et al., 2012a). Para 2014, las ventas de enzimas industriales en el mercado global alcanzaron 4 200 millones de dólares y se espera que esta cifra se incremente a 6 300 millones en 2022 (Industrial Enzymes Market, 2016). La capacidad de mantener su actividad bajo condiciones extremas de temperatura vuelve a las enzimas termoestables atractivas para varias industrias (van den Burg, 2003; Zamost et al., 1991). Por lo antes mencionado, en las últimas décadas se ha incrementado el estudio de microorganismos que viven en ambientes extremos, en particular los termófilos que son extremófilos y residen en ambientes con alta temperatura (van den Burg, 2003). El aumento en el interés de descubrir la

biodiversidad de extremófilos se deriva, principalmente, de su potencial uso en la biotecnología y otras industrias. En el caso particular de los termófilos, el interés se debe a que sintetizan enzimas que trabajan a elevadas temperaturas; estas conocidas como enzimas termoestables. Los termófilos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en diversos ambientes calientes, tales como fuentes geotermales, corrientes hidrotermales en las profundidades de los océanos y en la composta (Antunes et al., 2016; Knapik et al., 2019; Reysenbach et al., 2000). El compostaje es un proceso en el cual el metabolismo microbiano descompone materia orgánica y eleva la temperatura sobre los 50 °C, incluso a temperaturas entre 60 y 80 °C (Antunes et al., 2016; Ryckeboer et al., 2003). El proceso se realiza principalmente por consorcios de microorganismos mesofílicos y termofílicos (Alfreider et al., 2002; Federici et al., 2011; Jurado et al., 2014; Kuok et al., 2012; Partanen et al., 2010). Por lo tanto, el compostaje es una prometedora fuente de bacterias termofílicas y nuevas enzimas

termoestables, incluidas las proteasas (da Cruz Ramos et al., 2016; Ramos et al., 2019). Las proteasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos, utilizadas extensamente (60% de las ventas de enzimas) en la industria (Haki y Rakshit, 2003). Las proteasas son usadas en diversas industrias, tales como las de alimentos, bebidas, papel, detergentes, cuidado personal y salud, y en biorremediación (Akin, 2012; Haki y Rakshit, 2003; He et al., 2018; Singh et al., 2016; Yun y Byung-Jo, 2012). Las enzimas proteolíticas termoestables también son muy apreciadas en diversas aplicaciones industriales. Los usos de proteasas termoestables incluyen la degradación de la quitina presente en los desechos de la producción del camarón, la hidrólisis de películas gelatinosas para recuperación de plata en la industria fotográfica, degradación de priones responsables de encefalopatías espongiiformes y la limpieza de lentes de contacto (Ismail et al., 2014; Mhamdi et al., 2017; Nakiboğlu et al., 2001; Rajput y Gupta, 2013). En la búsqueda de este tipo de enzimas se emplean diversos métodos experimentales. El tamizaje fenotípico es un método clásico para la prospección de enzimas, data del año 1940 y el descubrimiento de los antibióticos penicilina y estreptomycin (Faddis y Fleming, 1947). El tamizaje fenotípico se basa en someter microorganismos a presión selectiva (medios de cultivo enriquecidos o restrictivos, o con indicadores), manipulando las condiciones de cultivo y garantizando el crecimiento casi exclusivo de los microorganismos que expresan rasgos específicos que les permiten sobrevivir a estas condiciones o muestran una señal indicativa de esas capacidades (Li et al., 2012b). Para la identificación de actividad proteolítica, generalmente, se utilizan medios enriquecidos con proteínas como presión selectiva, a la vez que dicha capacidad es visualmente identificable (Chantawannakul et al., 2002; Sacherer et al., 1994; Sokol et al., 1979). En la actualidad, los métodos clásicos de tamizaje se combinan con la caracterización genómica para identificar las cepas aisladas e inferir regiones codificantes. A pesar de su importancia por su amplia gama de aplicaciones, la diversidad de proteasas termoestables en microorganismos ecuatorianos no ha sido explorada. Por ello, el objetivo de este proyecto fue identificar cepas bacterianas proteolíticas aisladas de composta, e inferir secuencias codificantes de proteasas a partir del estudio de sus genomas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

De un biobanco de bacterias termófilas aisladas de material fertilizante obtenido mediante compostaje, realizado en dos plantas procesadoras localizadas en el sur de Ecuador por Clavijo et al. (2018), se tomaron 20 cultivos puros para realizar el tamizaje para la identificación de actividad proteolítica.

2.2. Identificación de actividad proteolítica

Cada uno de los diferentes aislados bacterianos fue sembrado por estría en placas de agar Luria-Bertani (LB-L) [10 g l⁻¹ NaCl (Sigma, S3014), 10 g l⁻¹ triptona (Sigma, T7293), 5 g l⁻¹ extracto de levadura (Sigma, Y1625) y 15 g l⁻¹ de agar bacteriológico (Sigma, A1296)] enriquecido con 2,5% (m/v)

de proteína total (25 g l⁻¹ de proteína contenida en leche descremada). Las placas inoculadas se incubaron por 72 h a 55 °C en un Lab-Line 315 Incubator (Barnstead International); durante el periodo de incubación, los cultivos fueron revisados cada 24 h para identificar la presencia de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano como indicativo de actividad proteolítica. Los aislados que mostraron actividad proteolítica fueron sembrados en 5 ml de medio LB [10 g l⁻¹ NaCl (Sigma, S3014), 10 g l⁻¹ triptona (Sigma, T7293) y 5 g l⁻¹ extracto de levadura (Sigma, Y1625)] y fueron incubados a 55 °C por 72 h. De los cultivos obtenidos se tomaron 50 µl, los cuales fueron colocados en pocillos de aproximadamente 2 mm de diámetro creados en placas de agar LB-L. Dos réplicas de las placas así preparadas se incubaron a dos temperaturas distintas, 37 °C y 55 °C. Después de 24 h, las placas Petri fueron inspeccionadas en busca de zonas de hidrólisis alrededor de los orificios y se fotodocumentaron mediante un Gel Doc™ EZ Imaging System (Bio-Rad), con el esquema de color Coomassie incluido en el software Image Lab™.

2.3. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de las cepas bacterianas con actividad proteolítica se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Durand et al. (2015) con algunas modificaciones que a continuación se describen. Los aislados bacterianos se cultivaron en 50 ml de medio LB a 55 °C por 72 h. Para obtener la biomasa, los cultivos fueron centrifugados a 4 500 × g por 10 min, a temperatura ambiente. Las pastillas obtenidas después de decantar cuidadosamente el medio de cultivo se resuspendieron en 1 ml de *buffer* de lisis (200 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA; 200 mM NaCl; 1,7% SDS). La suspensión se fraccionó (475 µl) en dos tubos eppendorf (2 ml) y estos se incubaron a 55 °C por 12 h, previa adición de 25 µl de una solución de proteinasa K (20 mg µl⁻¹). Una vez concluida la lisis, se añadieron 25 µl de una solución de ARNasa A (20 mg ml⁻¹) y la suspensión se incubó a 37 °C por 30 min. El ADN se extrajo con un volumen aproximado de 500 µl de una solución de fenol-cloroformo-A isoamílico 25:24:1. El ADN presente en la fase acuosa se precipitó con 2,5 volúmenes (1,2 ml) de etanol absoluto frío (4 °C) y la pastilla obtenida por centrifugación a 14 000 × g, por 10 min a 4 °C, fue lavada con 1 ml de una solución de etanol al 70%. La pastilla fue secada a temperatura ambiente durante toda la noche y, una vez seca, el ADN se disolvió en 60 µl de agua estéril de grado “biología molecular” y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La pureza y la concentración del ADN se cuantificó en un espectrofotómetro de microplacas Epoch (BioTek).

2.4. Amplificación del gen ARNr 16S

Los fragmentos del gen ARNr 16S se amplificaron utilizando *primers* 27F y 1495R, como en el método descrito por Kuisiense et al. (2007) en mezclas de reacción de PCR de 25 µl, con el kit Platinum® PCR Supermix (ThermoFisher). Para la reacción de PCR se mezcló 22,5 µl de Platinum® PCR Supermix (1X), 0,5 µl de agua ultrapura, 0,5 µl de cada *primer* (10 µM) y 1 µl de ADN genómico (50 ng µl⁻¹). El perfil de temperatura utilizado para la amplificación consistió en 95 °C por 5 min, 35 ciclos de denaturación a 95 °C por 1 min,

alineamiento de *primers* a 50 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel al 1% de agarosa teñido con bromuro de etidio. Los productos de PCR se purificaron según el protocolo descrito por Sun et al. (2012) y se enviaron a secuenciar a un proveedor de servicios de secuenciación tipo Sanger.

2.5. Análisis filogenético del gen ARNr 16S

Las secuencias sentido y antisentido del gen ARNr 16S se ensamblaron usando el método *De novo assembly* del software Geneious Prime 2020.0.5 (<https://www.geneious.com>). Las secuencias ensambladas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank (NCBI, National Centre for Biotechnology Information) utilizando el software BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Se seleccionaron secuencias con porcentajes de similitud mayores al 99%. Las secuencias de nuestro estudio se alinearon con las secuencias más similares disponibles en la base de datos GenBank utilizando una combinación de los métodos de alineamiento ClustalW y MUSCLE incluidos en el software MEGA X (<https://www.megasoftware.net>). El análisis filogenético se realizó utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo Kimura 2 como el mejor modelo de sustitución sugerido por el software MEGA X (Kimura, 1980; Kumar et al., 2018). El análisis se realizó con 73 secuencias. El árbol consenso se infirió a partir de 1 000 réplicas. El árbol final se visualizó utilizando la herramienta Tree Explorer incluida en MEGA X.

2.6. Secuenciación y ensamblaje del genoma

Aproximadamente 15 µg de ADN genómico se enviaron a un proveedor de servicios para la secuenciación de tercera generación y el ensamblado del genoma de las bacterias con actividad proteolítica. Los servicios del proveedor incluyeron la construcción de librerías genómicas tipo PacBio de 20 kb SMRTbell TPK (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA), la secuenciación realizada en el secuenciador PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA) y el ensamblado del genoma utilizando la configuración predeterminada de la herramienta HGAP en el portal SMRT (v2.3) (Chin et al., 2013; *SMRT Analysis Software*, 2015). El proceso de ensamblado incluyó un pre ensamblaje, un ensamblaje por el método *De novo* combinado con AssembleUnitig de PacBio, y un pulido del genoma ensamblado con la herramienta Quiver.

2.7. Predicción de genes relacionados a actividad proteasa

Las secuencias de los genomas se subieron a la plataforma web Galaxy y se utilizó el servidor público usegalaxy.org para analizar los datos. La herramienta Prokka se usó para la anotación de los genomas (Batut et al., 2018; Seemann, 2014). Este proceso permitió identificar las ubicaciones de los genes y todas las regiones de codificación en el genoma, además, determinar qué función cumplen los genes encontrados. Se filtraron los datos para identificar aquellos genes anotados que codifican proteasas utilizando la herramienta Grep v2.14. Se identificaron aquellas secuencias de proteasas que incluyen

fragmentos que codifican péptidos señal utilizando la herramienta SignalP v5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Armenteros et al., 2019). El genoma se dibujó con la herramienta CIRCOS (Versión 0.69.8) en el software Galaxy.

3. RESULTADOS

3.1. Screening de cepas de bacterias proteolíticas

Se utilizó un total de 20 cultivos puros de cepas bacterianas termófilas para el tamizado de la actividad proteolítica. De estos, 3 cepas bacterianas mostraron actividad enzimática, pues formaron zonas hidrolizadas en el medio LB agar enriquecido con leche descremada tras 24 horas de incubación (Figura 1a). Los aislados mostraron una mayor actividad proteolítica a 55 °C, como se deduce de los mayores diámetros de las zonas de hidrólisis en comparación con lo observado cuando las placas se incubaron a 37 °C. Por otro lado, se observó que un aislado (1086.2) no mostró actividad proteolítica a 37 °C (Figura 1b).

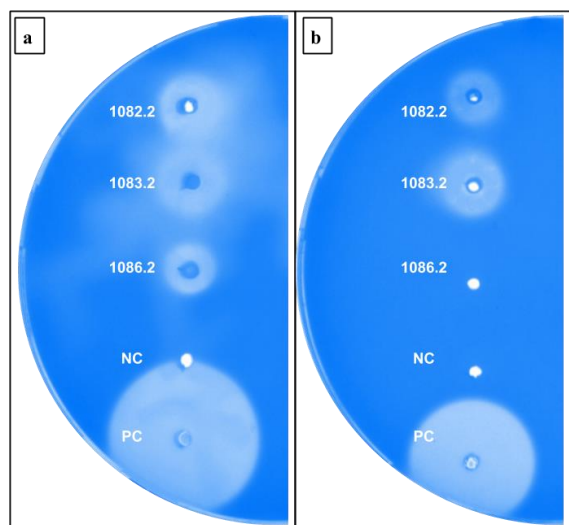


Figura 1. Actividad proteolítica cepas 1082.2, 1083.3 y 1086.2. a. Incubación a 55 °C - 24 h. b. Incubación a 37 °C - 24 h. NC. Control negativo: Medio LB enriquecido con leche descremada. PC. Control positivo: 10 µl de proteinasa K (10 µg µl⁻¹).

3.2. Identificación de cepas bacterianas

Se identificó que las tres cepas bacterianas con actividad proteolítica son bacilos Gram-positivos formadores de esporas (Figura 2). Las tres cepas se incluyeron en el género *Bacillus*, en el filo *Firmicutes*. El árbol filogenético revela que dos cepas bacterianas (1082.2 y 1083.2) se agruparon en una rama estrechamente relacionada con cepas de *Bacillus subtilis*, mientras que la otra cepa bacteriana (1086.2) se agrupó en una rama estrechamente relacionada con *Bacillus thermoamylovorans* (Figura 3).

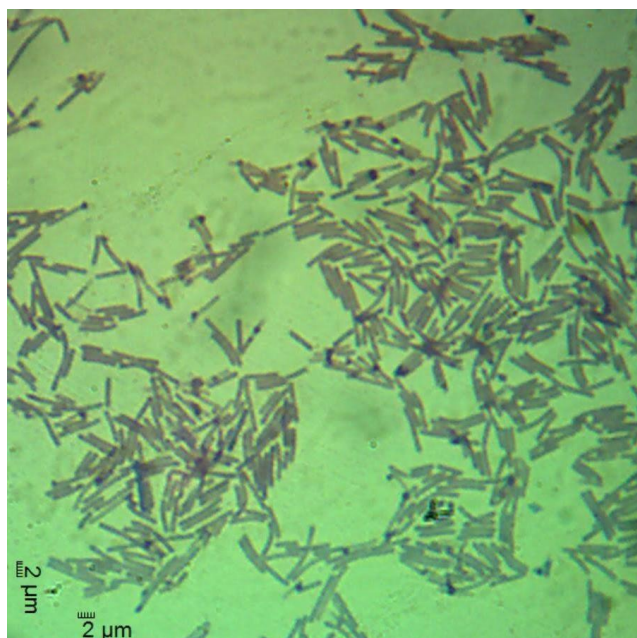


Figura 2. Tinción de Gram de la cepa bacteriana proteolítica 1086.2

3.3. Características generales de los genomas ensamblados

En la Tabla 1, se resumen las características generales de los genomas ensamblados. Se encontraron 88 genes relacionados con proteasas. Mediante el análisis para la identificación de la presencia de un péptido señal para su secreción con la herramienta SignalP v5.0, se determinó que en ambas cepas existe un total de 28 (31,8%) posibles proteasas de tipo extracelular (Tabla 2, Figuras 4 y 5).

Tabla 1. Características de los genomas.		
Características	1082.2	1086.2
Tamaño (pb)	4 064 613	4 240 703
Contenido de G+C (%)	43,85	43,54
Cromosoma circular	Sí	Sí
CDS	4 007	4 250
ARNt	87	86
ARNr	30	30
Genes proteasas	88	87
Genes proteasas extracelulares	28	28

4. DISCUSIÓN

4.1. Actividad proteásica

En este estudio se observaron tres cepas bacterianas termófilas (1082.2, 1083.2 y 1086.2) que mostraron actividad proteolítica. La mayor actividad de las cepas se observó a 55 °C; esto sugiere que las proteasas producidas son termoestables (Figura 1). Ohta et al. (1966) demostraron que muchas de las enzimas obtenidas a partir de bacterias termófilas usualmente son termoestables.

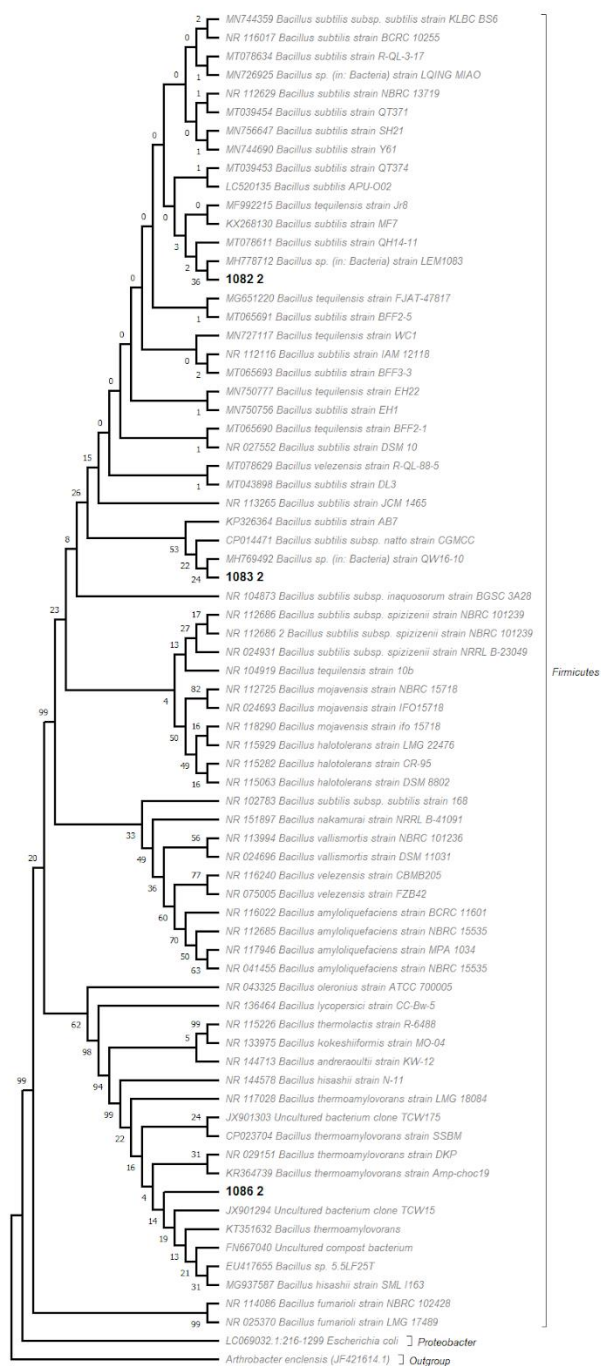


Figura 3. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias del gen del ARNr 16S para las cepas bacterianas proteolíticas. Número de acceso al GenBank: MW251504, MW251505 y MW251506.

Además, Morozkina et al. (2010) sugieren que la termoestabilidad enzimática es una adaptación que permite a la bacteria sobrevivir a ambientes hostiles. La diversidad funcional de las proteasas puede agruparse en virtud de si se encuentran de forma extracelular o intracelular (Culp y Wright, 2017). Las proteasas intracelulares bacterianas son muy específicas y están involucradas en varios procesos biológicos en el interior de la célula, tales como la remoción de péptidos señal en proteínas recién sintetizadas, inactivación de proteínas regulatorias y ruptura de proteínas anormales o foráneas (Gottesman, 1984; Mount, 1980).

Tabla 2. Predicción de secuencias de péptidos señal presentes en proteasas y la función biológica que se les atribuye.

Ubicación	Nombre del gen	Péptido señal	Prob (%)	Función biológica
GLMMOBIC_03131	<i>D-gamma-glutamyl-meso-diaminopimelic acid endopeptidase CwlS</i>	Sec/SPI	99,64	Biogénesis/degradación de la pared celular
GLMMOBIC_02076	<i>Peptidoglycan endopeptidase LytF</i>	Sec/SPI	99,64	Biogénesis/degradación de la pared celular
GLMMOBIC_02244	<i>Neutral protease B</i>	Sec/SPI	99,51	Proteasa degradadora de caseína
GLMMOBIC_00791	<i>Minor extracellular protease Epr</i>	Sec/SPI	99,40	Proteasa extracelular
GLMMOBIC_03331	<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacB</i>	Sec/SPI	99,30	Biosíntesis de peptidoglicano
GLMMOBIC_01334	<i>Extracellular metalloprotease</i>	Sec/SPI	99,12	Proteasa extracelular
GLMMOBIC_03360	<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacF</i>	Sec/SPI	99,09	Biosíntesis de peptidoglicano
GLMMOBIC_00758	<i>Minor extracellular protease vpr</i>	Sec/SPI	98,60	Proteasa extracelular
GLMMOBIC_03015	<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC</i>	Sec/SPI	98,59	Organización de la pared celular
GLMMOBIC_00798	<i>Aminopeptidase YwaD</i>	Sec/SPI	98,22	Proteólisis
GLMMOBIC_02081	<i>putative peptidoglycan endopeptidase LytE</i>	Sec/SPI	98,18	Biosíntesis de peptidoglicano
GLMMOBIC_00423	<i>Peptidoglycan DL-endopeptidase CwlO</i>	Sec/SPI	98,07	Organización de la pared celular
GLMMOBIC_01081	<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA</i>	Sec/SPI	95,21	Biosíntesis de peptidoglicano
GLMMOBIC_02210	<i>Cell wall-associated protease</i>	Sec/SPI	93,63	Organización de la pared celular
GLMMOBIC_02698	<i>Bacillopeptidase F</i>	Sec/SPI	91,85	Serín endopeptidasa
GLMMOBIC_00169	<i>L-Ala--D-Glu endopeptidase</i>	Sec/SPI	81,86	Organización de la pared celular
GLMMOBIC_00467	<i>Carboxy-terminal processing protease CtpB</i>	Sec/SPI	80,29	Proteólisis
GLMMOBIC_03986	<i>Putative signal peptide peptidase SppA</i>	Sec/SPI	77,25	Serín peptidasa
GLMMOBIC_03151	<i>Carboxy-terminal processing protease CtpA</i>	Sec/SPI	73,77	Señal de traducción
GLMMOBIC_03480	<i>Signal peptidase I W</i>	Sec/SPI	63,96	Procesadora de péptido señal
GLMMOBIC_02182	<i>Signal peptidase I V</i>	Sec/SPI	63,69	Procesadora de péptido señal
GLMMOBIC_01148	<i>ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH</i>	Sec/SPI	57,30	Proteólisis
GLMMOBIC_02290	<i>Oligoendopeptidase F, plasmid</i>	Sec/SPI	55,59	Proteólisis
GLMMOBIC_01391	<i>Peptidoglycan L-alanyl-D-glutamate endopeptidase CwlK</i>	Sec/SPI	41,76	Organización de la pared celular
GLMMOBIC_01528	<i>Peptidoglycan D,D-transpeptidase MrdA</i>	Sec/SPII	99,92	Biosíntesis de peptidoglicano
GLMMOBIC_01446	<i>Putative L,D-transpeptidase YciB</i>	Sec/SPII	99,83	Biosíntesis de peptidoglicano
GLMMOBIC_03154	<i>Putative carboxypeptidase YodJ</i>	Sec/SPII	99,48	Carboxipeptidasa
GLMMOBIC_03440	<i>SpoIVB peptidase</i>	Sec/SPII	67,29	Esporulación

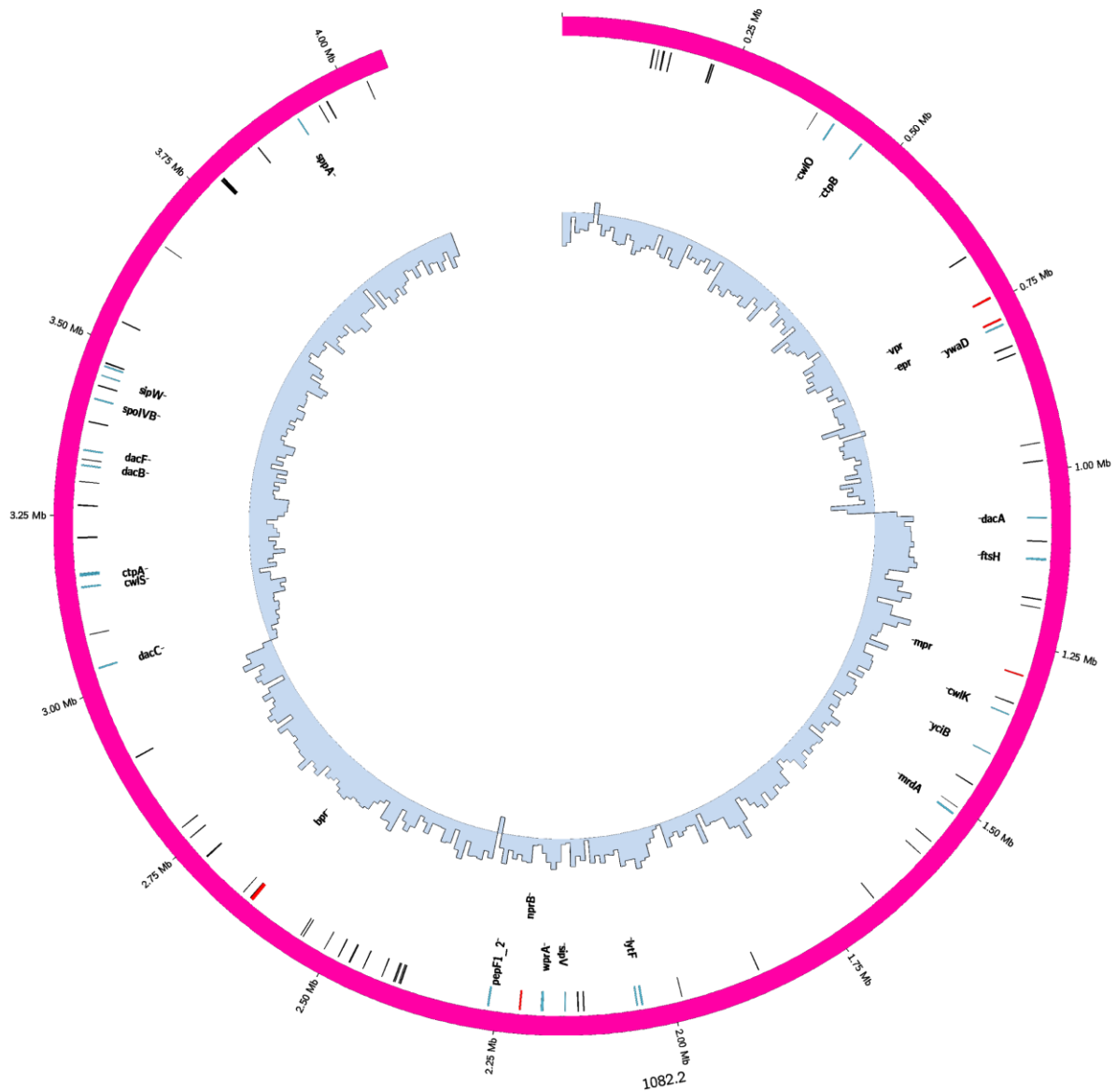


Figura 4. Mapa circular del genoma de la cepa 1082.2. Las características de afuera hacia adentro son: secuencias codificantes de proteasas (negro: intracelulares, azul: secretadas a membrana/pared celular, rojo: extracelulares), sesgo de contenido de Guanina y Citosina.

En cambio, las proteasas extracelulares son secretadas por las bacterias al medio. Algunas de estas proteasas son toxinas o factores relacionados con virulencia, mientras que otras exhiben baja especificidad y degradan proteínas para producir péptidos pequeños y aminoácidos que pueden ser transportados y posteriormente utilizados como fuente de nutrientes (Wandersman, 1989). Las actividades proteolíticas de las cepas 1082.2, 1083.2 y 1086.2 pueden ser consideradas poco específicas (degradadoras de caseína) y aparentemente se secretan al exterior de la célula, y forman un halo de degradación alrededor de las colonias (Figura 1).

4.2. Identificación de las cepas con actividad proteolítica

Las tres cepas bacterianas que mostraron actividad proteolítica del estudio se identificaron como pertenecientes al género *Bacillus*, organismos de tipo Gram-positivos y formadores de esporas (Figura 2). Resultados similares fueron obtenidos por Strom (1985), quien observó que varias especies heterotróficas de *Bacillus*, formadoras de esporas, se aislaron de composta a 60 °C. Es bien conocido que el género *Bacillus* puede sobrevivir a ambientes hostiles debido a su capacidad de formar endosporas (Jurado et al., 2014).

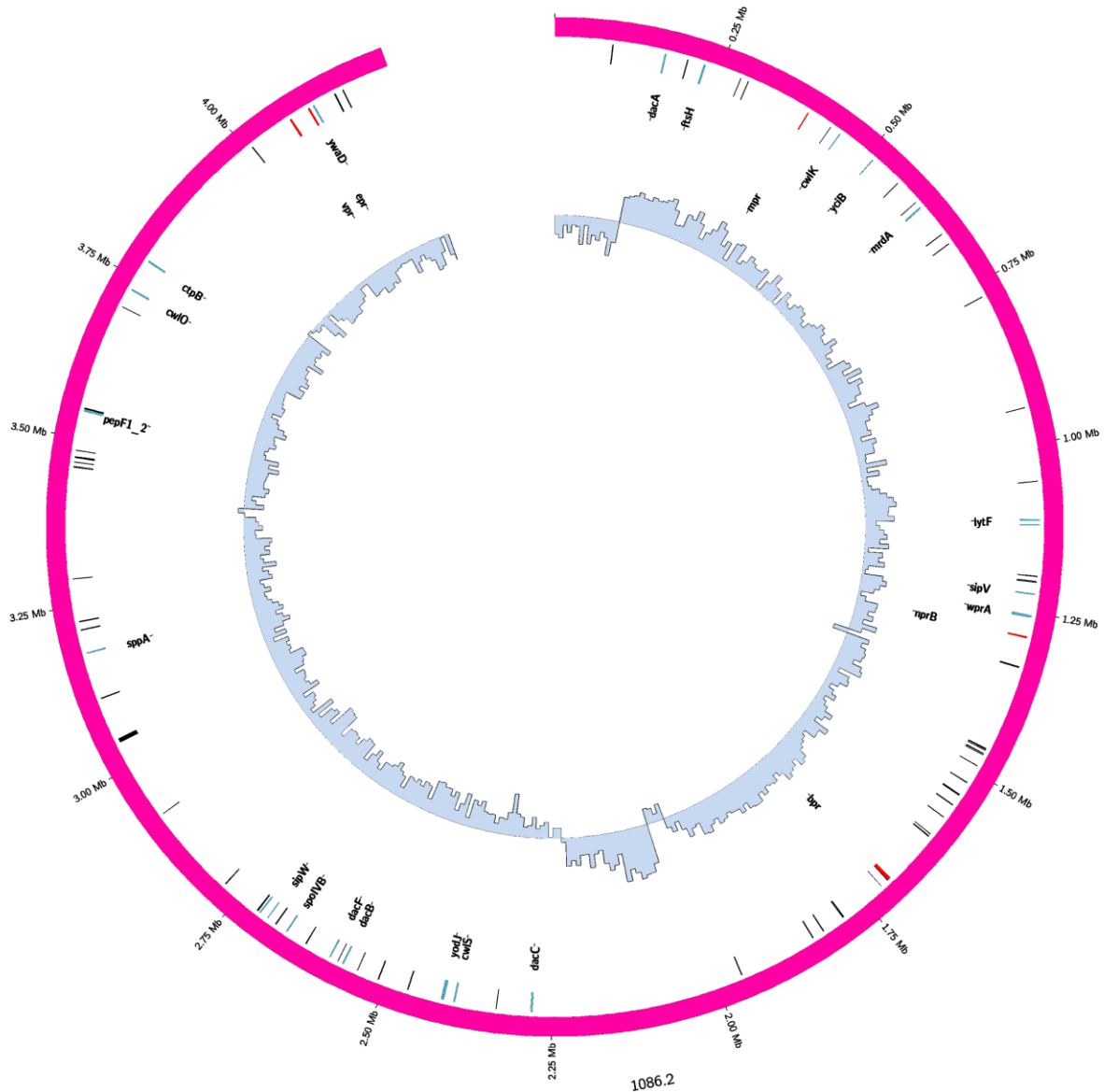


Figura 5. Mapa circular del genoma de la cepa 1086.2. Las características de afuera hacia adentro son: secuencias codificantes de proteasas (negro: intracelulares, azul: secretadas a membrana/pared celular, rojo: extracelulares), sesgo de contenido de Guanina y Citosina.

Al comparar el gen ARNr 16S de nuestras cepas con secuencias de la base de datos GenBank, dos cepas fueron agrupadas cerca de *B. subtilis* y una cepa se agrupó cerca de *B. thermoamylovorans* (Figura 3). Existen varios reportes de las mismas especies creciendo a condiciones similares a las de nuestro estudio. *B. subtilis* se encuentra comúnmente en las fases mesofílicas y termofílicas de los procesos de compostaje, mientras que *B. thermoamylovorans* se detecta especialmente durante la fase termofílica (Dees y Ghiorse, 2001; Federici et al., 2011; Ryckeboer et al., 2003).

4.3. Secuenciación y ensamblaje del genoma

Por un lado, las cepas 1082.2, 1083.2 fueron clasificadas como *B. subtilis*, mientras que la cepa 1086.2 como *B. thermoamylovorans* mediante el análisis filogenético del gen ARNr 16S, sin embargo, comparten la capacidad de producir

enzimas proteolíticas extracelulares y termoestables (Figura 1). Con el fin de identificar de manera predictiva las secuencias codificantes de las proteínas responsables de la actividad proteolítica, se sometió a secuenciación el genoma de las cepas 1082.2 y 1086.2 (Figuras 4 y 5). La secuenciación del genoma se realizó utilizando la tecnología PacBio SMRT. La extraordinaria longitud de sus secuencias simplifica enormemente el proceso de ensamblaje del genoma (Hoefler et al., 2013). Las secuencias generadas por secuenciación de segunda generación son cortas y generan una cobertura del genoma menor que las tecnologías de tercera generación (Ferrarini et al., 2013). Además, el ensamblaje de genomas basado solamente en secuencias cortas sin ningún genoma de referencia todavía es un reto bioinformático (Koren y Phillippy, 2015). El ensamblaje por el método *De novo* usualmente conlleva fragmentar las secuencias en piezas aún más pequeñas conocidas como *k-mers*, que generalmente poseen entre 21 y 101 pb (Miller et al., 2010). Cuando los

genomas presentan secuencias repetitivas de la longitud de los *k-mers*, se hace imposible reconstruir correctamente el genoma, lo que lleva a ensamblajes altamente fragmentados (Bleidorn, 2016). Secuencias largas (mayores a 8 000 pb) permiten mejoras significativas de los ensamblajes del genoma (Koren y Phillippy, 2015). La plataforma PacBio produce secuencias más largas (mayores a 10 000 pb); esto incrementa su potencial para generar datos genómicos con menos *gaps* y *contigs* más largos. Para el ensamblaje de los genomas se aplicó el proceso jerárquico (HGAP) a los datos generados a partir de la secuenciación de librerías genómicas 20kb SMRTbell TPK. Con las secuencias de la cepa 1082.2 se ensambló un genoma de un solo *contig* con una longitud de 4,06 Mb y 43,85% de contenido de G+C. Estos resultados son similares a los encontrados por otros investigadores (Ertekin et al., 2020; Franco-Sierra et al., 2020; Núñez-Montero et al., 2020). Ellos describen que el genoma de *B. subtilis* tiene una longitud de 4,22 Mb y un contenido de 43,5% de G+C. Por otro lado, con las secuencias de la cepa 1086.2 se ensambló un genoma de un solo *contig* de 4,24 Mb y un contenido de 43,54% de G+C. En contraste, los resultados de este estudio difieren con los publicados por Cai et al. (2018) y Krawczyk (2015), quienes describen que el genoma de *B. thermoamylovorans* tiene una longitud de 4,02 Mb y un contenido de 37,5% de G+C. Estas variaciones probablemente se deben a las diferencias en los ambientes en los que fueron aisladas las muestras. Se ha demostrado la capacidad de las bacterias del género *Bacillus* para adquirir ADN del ambiente e insertarlo exitosamente en su genoma como un mecanismo evolutivo que le permite sobrevivir a condiciones adversas tales como el estrés y la escasez de nutrientes (Claverys et al., 2006; Finkel y Kolter, 2001).

4.4. Anotación de los genomas

Los genomas se anotaron con el software Prokka, herramienta ampliamente utilizada para la anotación rápida de genomas procariotas (Seemann, 2014). Al analizar el genoma 1082.2 se encontró un total de 4 007 regiones codificantes de proteínas, 87 genes de ARNt y 30 genes de ARNr. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por otros estudios (Ertekin et al., 2020; Franco-Sierra et al., 2020; Núñez-Montero et al., 2020). Ellos describen que el genoma de *B. subtilis* tiene un total de 4 237 regiones codificantes de proteínas, 30 genes de ARNr y 85 genes de ARNt. En el caso de la cepa 1086.2 se encontraron 4 250 regiones codificantes de proteínas, 30 genes de ARNr y 86 genes de ARNt. Los resultados de este estudio difieren de los presentados por Cai et al. (2018) y Krawczyk et al. (2015), quienes describen que el genoma de *B. thermoamylovorans* tiene 3 645 regiones codificantes de proteínas, 24 genes de ARNr y 75 genes de ARNt. Estas variaciones probablemente también estén relacionadas a la capacidad de las cepas de adquirir ADN del ambiente.

4.5. Identificación *in silico* de las proteasas extracelulares

Se depuró las regiones codificantes de proteínas para identificar aquellos genes relacionados con actividad proteolítica con ayuda de la herramienta Grep v2.14. Los genomas de las cepas 1082.2 y 1086.2 se anotaron, respectivamente, con 88 y 87 genes homólogos a conocidos

genes que codifican enzimas proteolíticas (Figuras 4 y 5). Dado que ambas cepas pertenecen al género *Bacillus*, comparten la gran mayoría de las regiones codificantes de proteasas (87); sin embargo, se observó la presencia de una proteasa exclusiva en la cepa 1082.2. Se trata de una metaloproteasa poco caracterizada, que probablemente está involucrada en la producción de un péptido conocido como YydF (UniProt, 2021). Las 87 regiones codificantes de proteasas corresponden tanto a proteasas intracelulares como extracelulares. Para la secreción de proteasas extracelulares y otros tipos de proteínas, las células procariotas poseen varias formas de transportar a estos péptidos a sus diferentes locaciones, lo cual involucra la asistencia de sistemas dedicados a la secreción de proteínas. Los sistemas de secreción más comúnmente encontrados en bacterias son el Sec (*general secretion*) y el Tat (*twin arginine translocation*) (Green y Meccas, 2016). A diferencia del sistema Sec, que transporta proteínas en un estado desplegado, el sistema Tat puede trasladar proteínas plegadas a través de la bicapa lipídica (Armenteros et al., 2019). Los sistemas de secreción, para identificar las proteínas a secretar, reconocen los péptidos señal que forman parte de las proteínas en estado inmaduro. Estos péptidos señal son removidos durante el transporte hacia la membrana para generar la proteína extracelular madura (Wandersman, 1989). Por lo antes descrito, para determinar qué genes codifican proteasas extracelulares, se realizó una predicción de la presencia de péptidos señal en las proteasas encontradas en los genomas de este estudio con el software SignalP v5.0. Se encontró un total de 28 genes asociados a enzimas proteolíticas extracelulares en ambas cepas 1082.2 y 1086.2 (Tabla 2, Figuras 4 y 5). Todas estas proteasas podrían ser secretadas al exterior de la célula por el sistema de secreción Sec, con la ayuda de enzimas peptidasas del péptido señal conocidas como SPase I y SPase II. Esto sugiere que todas las proteasas extracelulares producidas por las cepas 1082.2 y 1086.2 se secretan en un estado desplegado hacia el exterior de la célula. Las proteasas identificadas en el análisis *in silico* cumplen roles fundamentales en la fisiología y bioquímica de estas cepas bacterianas. Dos proteasas (7,1%) están involucradas en la regulación de la biogénesis de la membrana y pared celular. Cinco (17,9%) cumplen funciones relacionadas a la organización de la membrana y pared celular. Seis (21,4%) regulan la biosíntesis de peptidoglicanos. Cuatro peptidasas de péptido señal (14,3%) son requeridas para el funcionamiento de los sistemas de secreción de proteínas. Una proteasa (3,6%) está involucrada en el proceso de esporulación que le permite a la bacteria sobrevivir a condiciones hostiles del ambiente (Horneck, 1993). Cuatro proteasas (14,3%) son fuertemente reguladas para evadir la proteólisis incontrolada en las células bacterianas, que a diferencia de los eucariotas, no pueden aislar las actividades enzimáticas por separación de organelas con estructuras membranosas (Lodish y Zipursky, 2001). La carboxypeptidasa YodJ cumple con el rol de reciclar los aminoácidos de D-alanina derivados de la pared celular (Sidiq, 2016). Estas 23 proteasas (82,14%) descritas, se secretan únicamente hasta la membrana o la pared celular para cumplir funciones fisiológicas. Adicionalmente a estos genes esenciales, las 5 proteasas (17,86%) que se describen a continuación son expulsadas por las bacterias al espacio extracelular y, por lo tanto, son las mejores candidatas a responsables de la actividad proteolítica observada en los

ensayos fenotípicos en medios enriquecidos con caseína. Estas proteasas fueron anotadas como Proteasa extracelular menor (Epr), Metaloproteasa extracelular (mpr), Proteasa extracelular menor (vpr), Bacilopeptidasa F (bpr) y Proteasa neutral B (nprb), sin embargo, poco se conoce de la función fisiológica de estas enzimas. De hecho, se ha observado que las bacterias pueden sobrevivir sin expresar estos genes (Sidiq, 2016; Sloma et al., 1988, 1990, 1991; X. C. Wu et al., 1990). Algunos investigadores sugieren que estas proteasas podrían cumplir un rol de enzimas hidrolíticas depuradoras que proporcionan a la célula aminoácidos derivados de la degradación de proteínas foráneas (Sidiq, 2016; J. W. Wu y Chen, 2011; X. C. Wu et al., 1990). Sloma et al. (1988) determinaron que al silenciar el gen *Proteasa extracelular menor* (Epr) en cepas de *Bacillus subtilis*, no se observan diferencias apreciables en la actividad proteolítica en ensayos con caseína. Por otro lado, Wu et al. (1990), Sloma et al. (1990) y Sloma et al. (1991) clonaron, respectivamente, las proteasas *Bacilopeptidasa F* (bpr), *Metaloproteasa extracelular* (mpr) y *Proteasa extracelular menor* (vpr) de *B. subtilis* y determinaron que estos genes son responsables de una alta actividad proteolítica cuando se las cultiva en medios enriquecidos con proteína. Asimismo, la *Proteasa neutral B* (nprb) ha sido descrita como una proteasa capaz de hidrolizar caseína en ensayos *in vitro*, y se ha observado que retiene hasta el 65% de su actividad después de ser sometida a temperaturas de 65 °C por 20 minutos (Tran et al., 1991). Además Tran et al. (1991) describen que la Proteasa neutral (nprb) es considerada la proteasa extracelular con más actividad enzimática en *B. subtilis* y produce del 20 al 70% de la actividad proteolítica total presente en el medio de cultivo.

4.6. Potenciales aplicaciones de las proteasas extracelulares encontradas

Las proteasas microbianas son enzimas muy importantes en diversas aplicaciones industriales y representan más de la mitad del total de las ventas del mercado mundial de enzimas. Muchas proteasas industriales son extracelulares, algunos ejemplos de ello son la *Thermoase PC10F* (Amano Enzyme Inc., Japón), *Neutrase* (Novo Nordisk, Dinamarca) y *Protin PC10F* (Amano Enzyme Inc., Japón). Estas proteasas son extensamente utilizadas; en la industria de alimentos para la generación de productos de panadería y bebidas, y en otras industrias para la obtención de cuero, películas fotográficas y tratamientos para la salud. Las proteasas extracelulares encontradas en este estudio poseen interesantes cualidades que pueden ser útiles para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, hay reportes del uso de la Proteasa neutral B (nprb) de *B. subtilis* en la síntesis de Celite-545 y Polyamida PA6, polímeros importantes en las industrias de filtros y nylon, respectivamente (Clapés et al., 1995). Bavaro et al. (2016) describen el uso de la Proteasa neutral B (nprb) inmovilizada en la síntesis de Capecitabina, un potente agente quimioterapéutico utilizado para el tratamiento de cáncer de colon y de mama. También se ha descrito su uso en la hidrólisis de desechos de crustáceos y en la producción de almidón de arroz (Wang y Wang, 2004; Yang et al., 2000). Por otro lado, Ghosh et al. (2009) analizaron la utilidad de la Proteasa extracelular menor (vpr) en la hidrólisis de plumas. Las plumas son uno de los principales desechos de la industria avícola, son

muy difíciles de degradar y están compuestas en su mayor parte por queratina. Las queratinasas en su gran mayoría son serino-proteasas o metaloproteasas (Gupta y Rammani, 2006). Adicionalmente, Kho et al. (2005) y Omura et al. (2005) demostraron que la Proteasa extracelular menor (vpr) y la Bacilopeptidasa F (bpr) tienen propiedades fibrinolíticas, antitrombóticas y favorecen la disminución de la presión sanguínea. Otras aplicaciones generales de proteasas extracelulares incluyen la reducción de gluten en alimentos, aumento de nitrógeno disponible en procesos fermentativos, remoción del pelo en la industria del cuero y el procesamiento de desechos provenientes de películas de rayos X (Bhattacharya, 2007; Patil y Chaudhari, 2009; Priest et al., 1992; Rao et al., 1998; Thanikaivelan et al., 2004). La tecnología de genes recombinantes, ingeniería de proteínas y evolución dirigida son herramientas biotecnológicas cada vez más relevantes y utilizadas en los procesos de fabricación de enzimas industriales a gran escala.

5. CONCLUSIONES

En este estudio, se investigó la actividad proteolítica termoestable en cepas bacterianas termófilas aisladas de composta. Se demostró que en el genoma de las cepas 1082.2 y 1086.2 existen secuencias de ADN que codifican enzimas proteolíticas extracelulares, entre las cuales están la Proteasa extracelular menor (Epr), Metaloproteasa extracelular (mpr), Proteasa extracelular menor (vpr), Bacilopeptidasa F (bpr) y Proteasa neutral B (nprb). Se encontró que las enzimas proteolíticas extracelulares producidas por las cepas 1082.2 y 1086.2 son termoestables y presentan una mayor actividad proteolítica a 55 °C, en comparación con la observada a 37 °C. Las cepas bacterianas se clasificaron como estrechamente relacionadas con *Bacillus subtilis* y *Bacillus thermoamylovorans*, especies descritas como mesófila-termófila y termófila, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por los fondos competitivos internos de la Universidad de Cuenca (XIII Convocatoria Interna) a través del proyecto "Metagenómica de comunidades microbianas en suelos agrícolas bajo sistemas de manejo orgánico y convencional" bajo el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2018-0084 otorgado por la Dirección Nacional de Biodiversidad del Ministerio del Ambiente. R-RP agradece a la SENESCYT - Ecuador por el apoyo económico durante el proceso de investigación y al programa de postgrado VLIR Network Ecuador.

REFERENCIAS

- Akin, M. S. (2012). Accelerated ripening of Kashar cheese with encapsulated protease. *African journal of biotechnology*, 11(66). <https://doi.org/10.5897/ajb12.1630>
- Alfreider, A., Peters, S., Tebbe, C. C., Rangger, A., & Insam, H. (2002). Microbial Community Dynamics During Composting of Organic Matter as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Compost science & utilization*, 10(4), 303–312. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2002.10702094>
- Antunes, L. P., Martins, L. F., Pereira, R. V., Thomas, A. M., Barbosa, D., Lemos, L. N., Silva, G. M. M., Moura, L. M. S., Epamino, G. W. C., Digiampietri, L. A., Lombardi, K. C., Ramos, P. L., Quaggio, R. B., de

- Oliveira, J. C. F., Pascon, R. C., Cruz, J. B. da, da Silva, A. M., & Setubal, J. C. (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 6, 38915. <https://doi.org/10.1038/srep38915>
- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Batut, B., Hiltmann, S., Bagnacani, A., Baker, D., Bhardwaj, V., Blank, C., Bretaudeau, A., Brillet-Guéguen, L., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Doppelt-Azeroual, O., Erxleben, A., Freeberg, M. A., Gladman, S., Hoogstrate, Y., Hotz, H.-R., Houwaart, T., Jagtap, P., ... Grünig, B. (2018). Community-Driven Data Analysis Training for Biology. *Cell Systems*, 6(6), 752–758.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.05.012>
- Bavaro, T., Cattaneo, G., Serra, I., Benucci, I., Pregolato, M., & Terreni, M. (2016). Immobilization of Neutral Protease from *Bacillus subtilis* for Regioselective Hydrolysis of Acetylated Nucleosides: Application to Capecitabine Synthesis. *Molecules*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/molecules21121621>
- Bhattacharya, S. K. (2007). *Enzyme Mixtures and Complex Biosynthesis*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bleidorn, C. (2016). Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. *Systematics and biodiversity*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/14772000.2015.1099575>
- Cai, L., Zheng, S.-W., Shen, Y.-J., Zheng, G.-D., Liu, H.-T., & Wu, Z.-Y. (2018). Complete genome sequence provides insights into the biodrying-related microbial function of *Bacillus thermoamylovorus* isolated from sewage sludge biodrying material. *Bioresource Technology*, 260, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.121>
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatiroe, E., & Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia: journal of the Science Society of Thailand*, 28(3), 241. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.241>
- Chin, C.-S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E. E., Turner, S. W., & Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*, 10(6), 563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>
- Choi, J.-M., Han, S.-S., & Kim, H.-S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biortechadv.2015.02.014>
- Clapés, P., Torres, J.-L., & Adlercreutz, P. (1995). Enzymatic peptide synthesis in low water content systems: Preparative enzymatic synthesis of [Leu]- and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3(3), 245–255. [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(95\)00019-d](https://doi.org/10.1016/0968-0896(95)00019-d)
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., & Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 451–475. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142139>
- Clavijo-Rosales, D. F. (2018). *Análisis de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje, e identificación de la presencia de bacterias termófilas, a través de técnicas de biología molecular*. <http://dspace.uca.edu.ec/jspui/handle/123456789/29921>
- Culp, E., & Wright, G. D. (2017). Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.138>
- da Cruz Ramos, G. F., Ramos, P. L., Passarini, M. R. Z., Vieira Silveira, M. A., Okamoto, D. N., de Oliveira, L. C. G., Zezzo, L. V., Marem, A., Santos Rocha, R. C., da Cruz, J. B., Juliano, L., & de Vasconcelos, S. P. (2016). Cellulolytic and proteolytic ability of bacteria isolated from gastrointestinal tract and composting of a hippopotamus. *AMB Express*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0188-x>
- Dees, P. M., & Ghiorse, W. C. (2001). Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(2), 207–216. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00805.x>
- Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M.-H., Carlin, F., & Remize, F. (2015). Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Microbiology*, 45(Pt A), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.015>
- Ertekin, O., Kutnu, M., Taşkin, A. A., Demir, M., Karataş, A. Y., & Özcengiz, G. (2020). Analysis of a bac operon-silenced strain suggests pleiotropic effects of bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology*, 58(4), 297–313. <https://doi.org/10.1007/s12275-020-9064-0>
- Faddis, M. O., & Fleming, A. (1947). Penicillin: Its Practical Application. *The American Journal of Nursing*, 47(2), 139. <https://doi.org/10.2307/3457309>
- Federici, E., Pepi, M., Esposito, A., Scargetta, S., Fidati, L., Gasperini, S., Cenci, G., & Altieri, R. (2011). Two-phase olive mill waste composting: community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresource Technology*, 102(23), 10965–10972. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.062>
- Ferrarini, M., Moretto, M., Ward, J. A., Šurbanovski, N., Stevanović, V., Giongo, L., Viola, R., Cavalieri, D., Velasco, R., Cestaro, A., & Sargent, D. J. (2013). An evaluation of the PacBio RS platform for sequencing and de novo assembly of a chloroplast genome. *BMC Genomics*, 14, 670. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-670>
- Finkel, S. E., & Kolter, R. (2001). DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6288–6293. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001>
- Franco-Sierra, N. D., Posada, L. F., Santa-María, G., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V., & Álvarez, J. C. (2020). *Bacillus subtilis* EA-CB0575 genome reveals clues for plant growth promotion and potential for sustainable agriculture. *Functional & Integrative Genomics*, 20(4), 575–589. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00736-x>
- Ghosh, A., Chakrabarti, K., & Chattopadhyay, D. (2009). Cloning of feather-degrading minor extracellular protease from *Bacillus cereus* DCUW: dissection of the structural domains. *Microbiology*, 155(Pt 6), 2049–2057. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027573-0>
- Gottesman, S. (1984). Bacterial Regulation: Global Regulatory Networks. *Annual Review of Genetics*, 18(1), 415–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.18.1.415>
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: An overview. *En Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (pp. 213–239). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch8>
- Gupta, R., & Rammani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17–34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)
- He, Z., Sun, R., Tang, Z., Bu, T., Wu, Q., Li, C., & Chen, H. (2018). Biodegradation of Feather Waste Keratin by the Keratin-Degrading Strain 8. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 314–322. <https://doi.org/10.4014/jmb.1708.08077>
- Hoefler, B. C., Konganti, K., & Straight, P. D. (2013). De Novo Assembly of the *Streptomyces* sp. Strain Mg1 Genome Using PacBio Single-Molecule Sequencing. *Genome Announcements*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00535-13>
- Horneck, G. (1993). Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: results from experiments in space. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere: The Journal of the International Society for the Study of the Origin of Life*, 23(1), 37–52. <https://doi.org/10.1007/BF01581989>
- Industrial Enzymes Market. (2016, octubre). *Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022*. Industrial Enzymes Market. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>
- Ismail, K. S., Jadhav, A. A., Harale, M. A., Gadre, S. V., & Williamson, M. T. (2014). Study of protease enzyme from bacillus species and its application as a contact lens cleanser. *British Biomedical Bulletin*, 2(2), 293–302.
- Jurado, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., & Moreno, J. (2014). Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 162, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.145>
- Kho, C. W., Park, S. G., Cho, S., Lee, D. H., Myung, P. K., & Park, B. C. (2005). Confirmation of Vpr as a fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 39(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.08.008>

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- Knapik, K., Becerra, M., & González-Siso, M.-I. (2019). Microbial diversity analysis and screening for novel xylanase enzymes from the sediment of the Lobios Hot Spring in Spain. *Scientific Reports*, 9(1), 11195. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47637-z>
- Koren, S., & Phillippy, A. M. (2015). One chromosome, one contig: complete microbial genomes from long-read sequencing and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.014>
- Krawczyk, A. O., Berendsen, E. M., Eijlander, R. T., de Jong, A., Wells-Bennik, M. H. J., & Kuipers, O. P. (2015). Draft Genome Sequences of Four *Bacillus thermoamylovorans* Strains Isolated from Milk and Acacia Gum, a Food Ingredient. *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00165-15>
- Kuisiense, N., Raugalas, J., Stuknyte, M., & Chitavichius, D. (2007). Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00954.x>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuok, F., Mimoto, H., & Nakasaki, K. (2012). Effects of turning on the microbial consortia and the in situ temperature preferences of microorganisms in a laboratory-scale swine manure composting. *Bioresource Technology*, 116, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.106>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012a). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012b). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Lodish, H., & Zipursky, S. L. (2001). Molecular cell biology. *Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 126–133.
- Mhamdi, S., Ktari, N., Hajji, S., Nasri, M., & Sellami Kamoun, A. (2017). Alkaline proteases from a newly isolated *Micromonospora chaüyaphumensis* S103: Characterization and application as a detergent additive and for chitin extraction from shrimp shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(Pt A), 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.036>
- Miller, J. R., Koren, S., & Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95(6), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.001>
- Morozkina, E. V., Slutskaia, E. S., Fedorova, T. V., Tugaï, T. I., Golubeva, L. I., & Koroleva, O. V. (2010). Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 46(1), 5–20. <https://doi.org/10.1134/S0003683810010011>
- Mount, D. W. (1980). The Genetics of Protein Degradation in Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 14(1), 279–319. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.14.120180.001431>
- Nakiboğlu, N., Toscali, D., & Yaşa, İ. (2001). Silver recovery from waste photographic films by using enzymatic method. *Turkish Journal of Chemistry*, 25(3), 349–353.
- Núñez-Montero, K., Quezada-Solís, D., Khalil, Z. G., Capon, R. J., Andreote, F. D., & Barrientos, L. (2020). Genomic and Metabolomic Analysis of Antarctic Bacteria Revealed Culture and Elicitation Conditions for the Production of Antimicrobial Compounds. *Biomolecules*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biom10050673>
- Ohta, Y., Ogura, Y., & Wada, A. (1966). Thermostable protease from thermophilic bacteria. I. Thermostability, physicochemical properties, and amino acid composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(24), 5919–5925.
- Omura, K., Hitosugi, M., Zhu, X., Ikeda, M., Maeda, H., & Tokudome, S. (2005). A newly derived protein from *Bacillus subtilis* natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *Journal of Pharmacological Sciences*, 99(3), 247–251. <https://doi.org/10.1254/jphs.fp0050408>
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., & Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, 10, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>
- Patil, U., & Chaudhari, A. (2009). Purification and characterization of solvent-tolerant, thermostable, alkaline metalloprotease from alkalophilic *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7926. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 84(9), 1255–1262.
- Priest, F. G., & Others. (1992). Synthesis and secretion of extracellular enzymes in bacteria. *Microbial degradation of natural products*, 1–26.
- Rajput, R., & Gupta, R. (2013). Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. *Bioresource Technology*, 133, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.091>
- Ramos, P. L., Kondo, M. Y., Santos, S. M. B., de Vasconcelos, S. P., Rocha, R. C. S., da Cruz, J. B., Eugenio, P. F. M., Cabral, H., Juliano, M. A., Juliano, L., Setubal, J. C., da Silva, A. M., & Cappellini, L. T. D. (2019). A Tropical Composting Operation Unit at São Paulo Zoo as a Source of Bacterial Proteolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 282–297. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2810-7>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), 597–635.
- Reysenbach, A. L., Banta, A. B., Boone, D. R., Cary, S. C., & Luther, G. W. (2000). Microbial essentials at hydrothermal vents. *Nature*, 404(6780), 835. <https://doi.org/10.1038/35009029>
- Ryckboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., & Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of microbiology*, 53(4), 349–410.
- Sacherer, P., Défago, G., & Haas, D. (1994). Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*, 116(2), 155–160.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sidiq, K. R. (2016). *Cell wall metabolism in Bacillus subtilis*. <http://theses.ncl.ac.uk/jspui/handle/10443/3243>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Sloma, A., Ally, A., Pero, J. (1988). Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170(12), 5557–5563. <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5557-5563.1988>
- Sloma, A., Rudolph, C. F., Rufo, G. A., Jr, Sullivan, B. J., Theriault, K. A., Ally, D., & Pero, J. (1990). Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 1024–1029. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.1024-1029.1990>
- Sloma, A., Rufo, G. A., Jr, Theriault, K. A., Dwyer, M., Wilson, S. W., & Pero, J. (1991). Cloning and characterization of the gene for an additional extracellular serine protease of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173(21), 6889–6895. <https://doi.org/10.1128/jb.173.21.6889-6895.1991>
- SMRT analysis software. (2015, agosto 6). <https://www.pacb.com/products-and-services/analytical-software/smrt-analysis/>
- Sokol, P. A., Ohman, D. E., & Iglewski, B. H. (1979). A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 9(4), 538–540.
- Strom, P. F. (1985). Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 899–905.
- Sun, Y., Sriramajayam, K., Luo, D., & Liao, D. J. (2012). A quick, cost-free method of purification of DNA fragments from agarose gel. *Journal of Cancer*, 3, 93–95. <https://doi.org/10.7150/jca.4163>
- Thanikaivelan, P., Rao, J. R., Nair, B. U., & Ramasami, T. (2004). Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology*, 22(4), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.008>
- Tran, L., Wu, X. C., & Wong, S. L. (1991). Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173(20), 6364–6372. <https://doi.org/10.1128/jb.173.20.6364-6372.1991>
- UniProt. (2021). *Putative peptide zinc metalloprotease protein YydH*. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q45594>

- van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00060-2)
- Wandersman, C. (1989). Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Molecular Microbiology*, 3(12), 1825–1831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00169.x>
- Wang, L., & Wang, Y.-J. (2004). Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.11.002>
- Wu, J. W., & Chen, X. L. (2011). Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3532-8>
- Wu, X. C., Nathoo, S., Pang, A. S., Carne, T., & Wong, S. L. (1990). Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(12), 6845–6850.
- Yang, J.-K., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., & Wang, S.-L. (2000). Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and microbial technology*, 26(5), 406–413. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00164-7)
- Yun, C., & Byung-Jo, H. (2012). The Effects of Foot Cleansing Cosmetics Containing Immobilized Protease. *Journal of Investigative Cosmetology*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.15810/jic.2012.8.1.006>
- Zamost, B. L., Nielsen, H. K., & Starnes, R. L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(2), 71–81. <https://doi.org/10.1007/bf01578757>

ANEXOS

ANEXO I

FICHAS TÉCNICAS DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOMAS ENSAMBLADOS DE LAS CEPAS 1082.2 Y 1086.2.

FICHA TÉCNICA I

CONTROL DE CALIDAD DE LAS LIBRERÍAS GENÓMICAS

Muestra: ADN genómico de las cepas 1082.2 y 1086.2

Objetivo: Determinar la concentración, volumen y el tamaño de las librerías genómicas utilizadas para la secuenciación de los genomas de las cepas 1082.2 y 1086.2.

Desarrollo:

El cálculo de la concentración de las librerías genómicas se realizó utilizando el kit Qubit® dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific) en el equipo Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). El análisis se realizó por un proveedor de servicios externo.

Tabla FTL.1 Resultados del control de calidad de las librerías genómicas.

Nombre	Tipo de librería	Concentración (ng/ul)	Volumen (ul)	Tamaño (bp)
1082.2	20kb SMRTbell TPK	39,5	25	20 000
1086.2	20kb SMRTbell TPK	43,6	25	20 000

Se verificó la distribución y el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados por PCR a partir de 3 ul de cada librería en el equipo Agilent Technologies 2 100 Bioanalyzer (Agilent) utilizando un Bioanalyzer chip DNA 1 200 (Agilent). Este análisis se realizó por un proveedor de servicios externos y los resultados se observan en las Figuras FTL.1 y FTL.2.

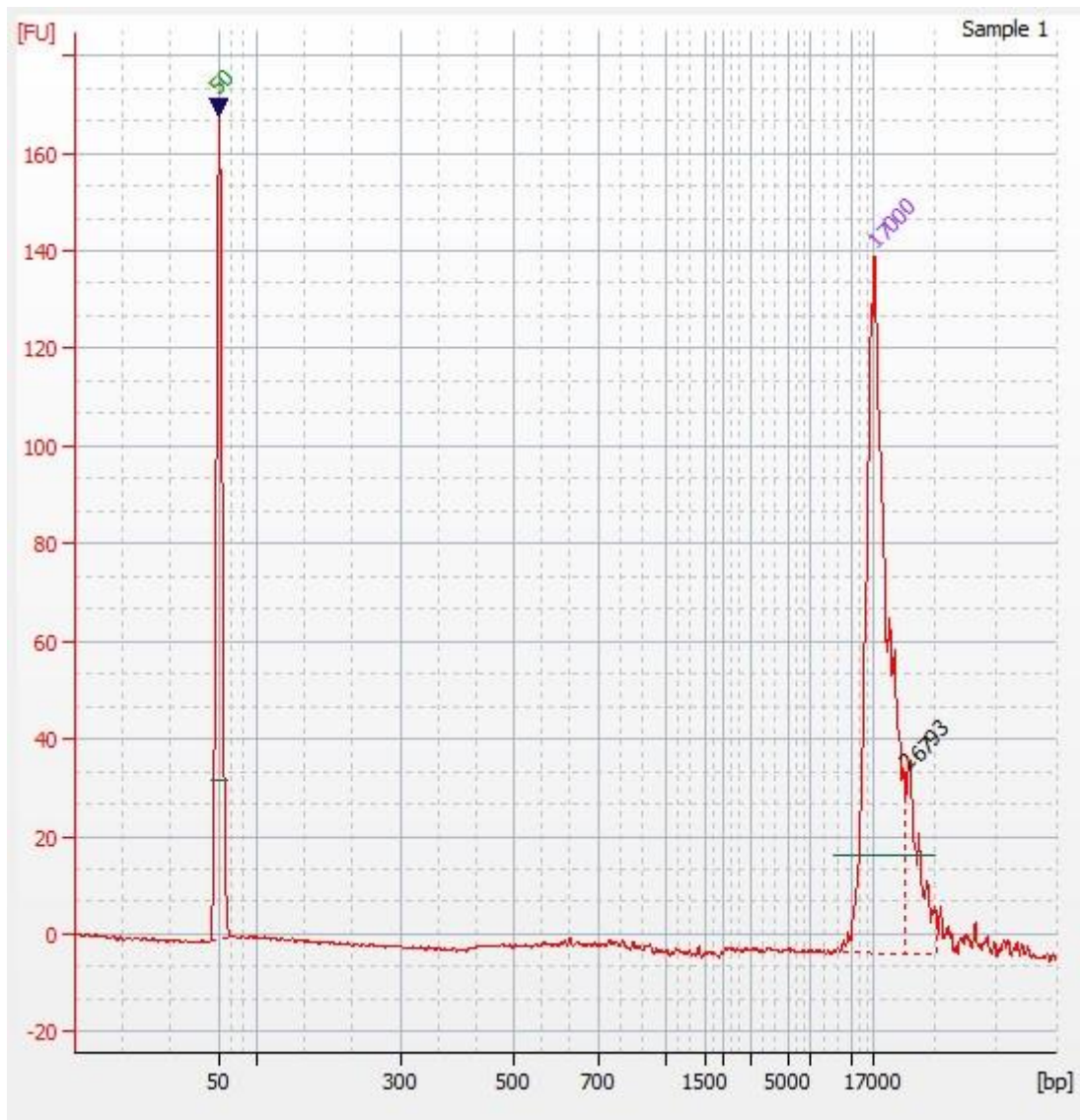


Figura FTL.1 Distribución del tamaño de la librería genómica de la cepa 1082.2. FU: unidades de fragmentos. bp: pares de bases.

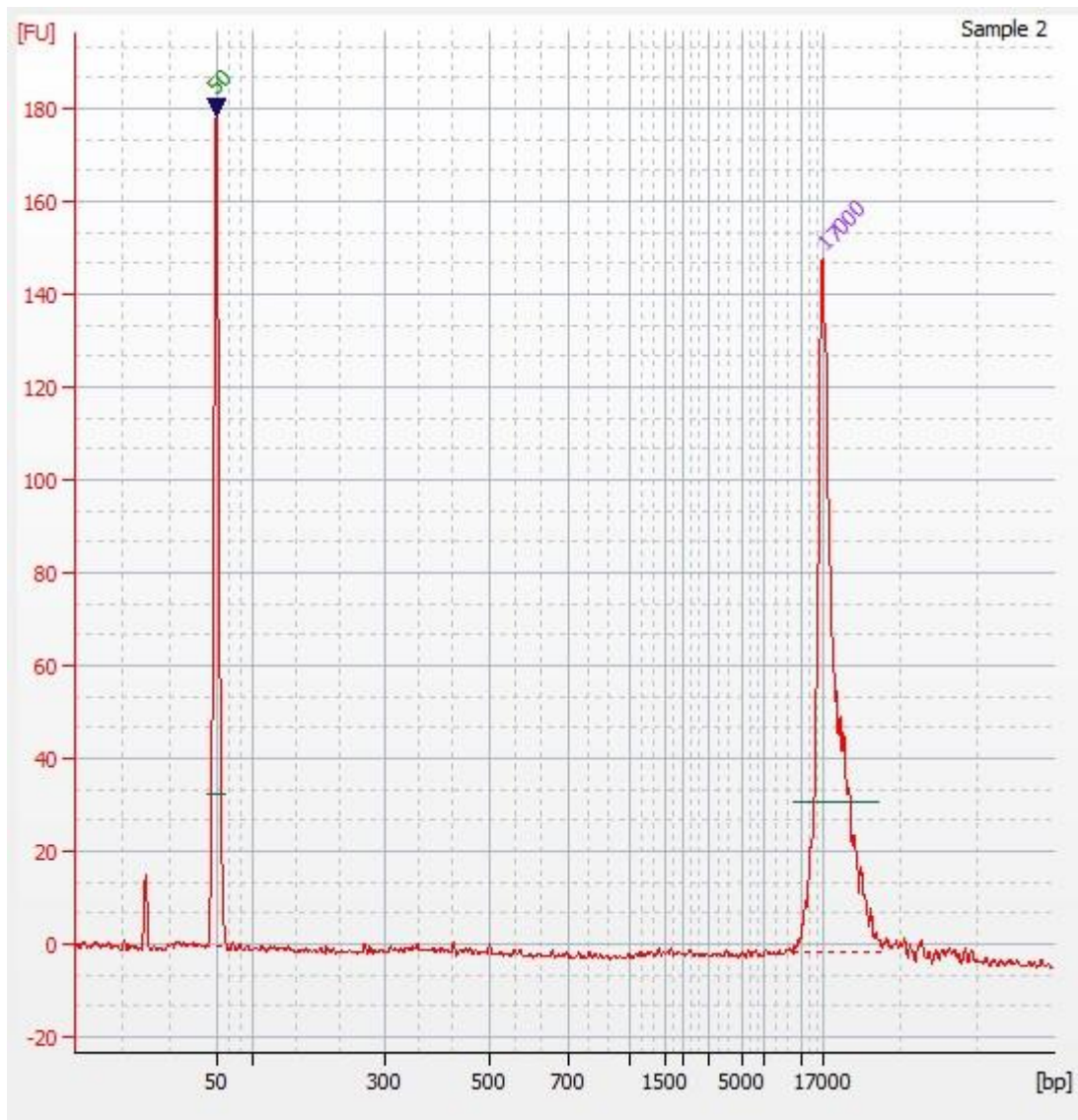


Figura FTL.2 Distribución del tamaño de la librería genómica de la cepa 1086.2. FU: unidades de fragmentos. bp: pares de bases.

FICHA TÉCNICA II

SECUENCIACIÓN Y PREPROCESAMIENTO DE LOS GENOMAS

Muestra: Librerías genómicas de las cepas 1082.2 y 1086.2

Objetivo: Secuenciar y preprocesar las librerías genómicas de las cepas 1082.2 y 1086.2.

Desarrollo:

La secuenciación del genoma se realizó utilizando el secuenciador PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). Se filtraron las secuencias con mejor calidad para facilitar el proceso de ensamblado. Este análisis se realizó por un proveedor de servicios externo. En la tabla FTII.1 se resumen las características de las secuencias filtradas.

Tabla FTII.1 Resultados del control de calidad de las librerías genómicas.

Variable	1082.2	1086.2
Longitud media (pb)	9 149	8 971
N50 (pb)	13 740	14 230
Bases totales	1 280 183 078	1 043 506 503
Número de secuencias	139 916	116 314

Donde:

- Longitud media: longitud media de las secuencias que pasaron el proceso de filtrado.
- N50: N50 es una medida para describir la calidad de los genomas ensamblados que están fragmentados en contigs de diferente longitud. N50 es la longitud de contig más corta necesaria para cubrir el 50% del genoma. Es decir, la mitad de la secuencia del genoma está cubierta por contig mayores o iguales al tamaño del contig N50.
- Bases totales: El número total de bases en las secuencias que pasaron el proceso de filtrado.
- Número de secuencias: número total de secuencias que pasaron el filtrado.

La distribución de la longitud de las secuencias producidas por la secuenciación de las librerías genómicas de las cepas 1082.2 y 1086.2 se observan en las Figuras FTII.1 y FTII.2.

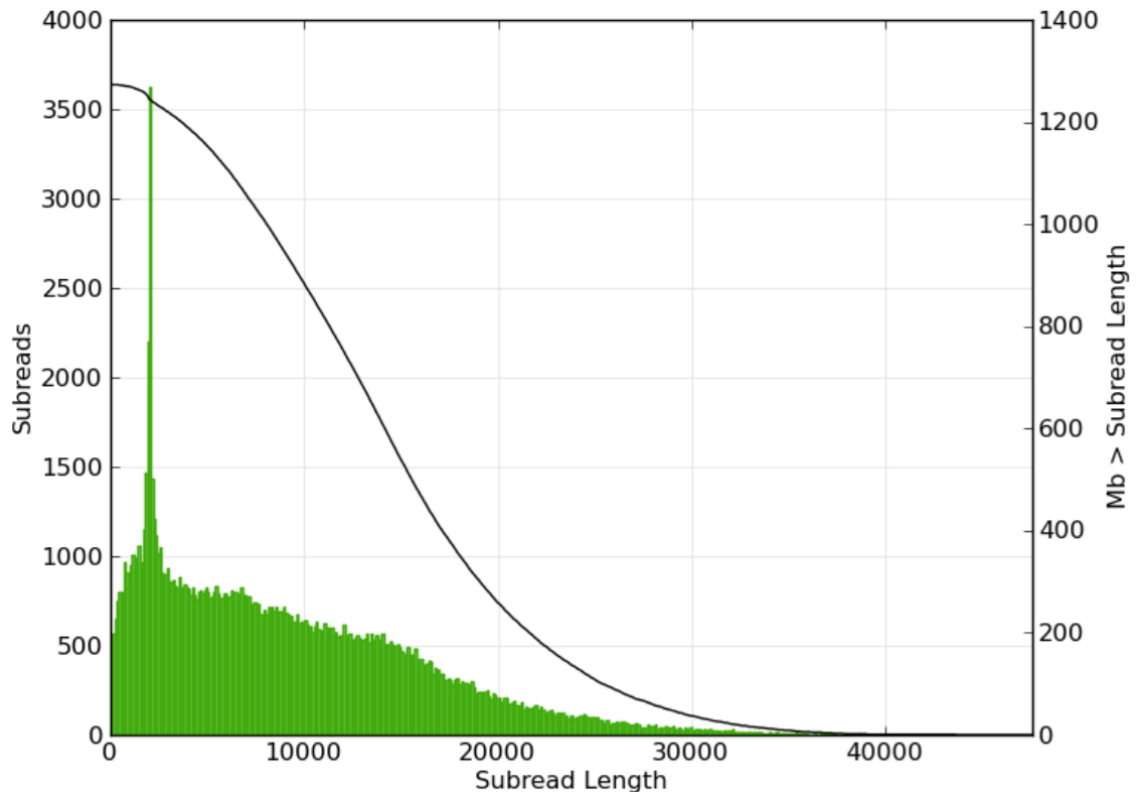


Figura FTII.1 Distribución del tamaño de las secuencias de la cepa 1082.2.

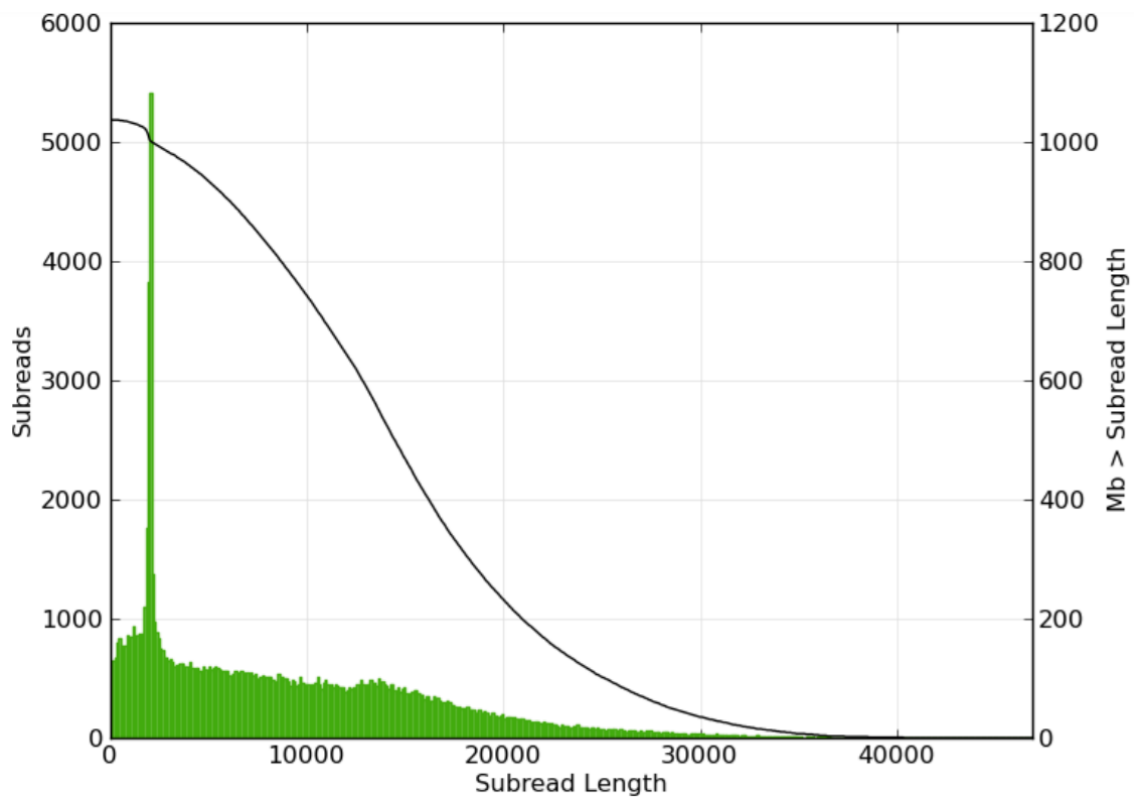


Figura FTII.2 Distribución del tamaño de las secuencias de la cepa 1086.2.

FICHA TÉCNICA III

CONTROL DE CALIDAD DE LOS GENOMAS ENSAMBLADOS

Muestra: Genomas ensamblados de las cepas 1082.2 y 1086.2

Objetivo: Evaluar la integridad de los genomas ensamblados mediante el uso de la herramienta BUSCO.

Desarrollo:

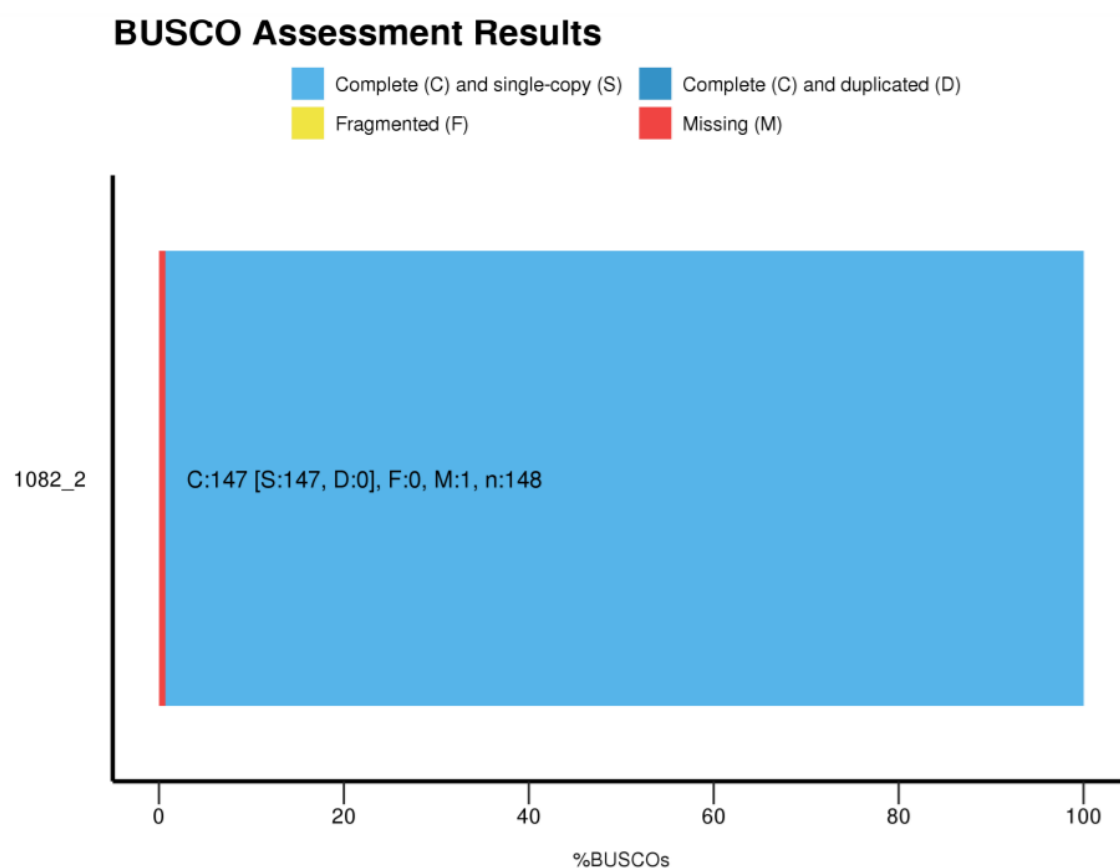
El análisis con la herramienta BUSCO (<https://busco.ezlab.org/>), se basa en el concepto de ortólogos de copia única que se conservan en gran medida entre las especies estrechamente relacionadas. Se estudió la integridad del ensamblaje de los genomas buscando secuencias ortólogas de copia única descubiertos entre las especies de bacterias. Las secuencias se clasifican como "Completas" si sus longitudes se encuentran dentro de las expectativas de las longitudes de coincidencia del perfil de BUSCO. Si se encuentran más de una vez, se clasifican como "duplicados". Las secuencias que se recuperan parcialmente se clasifican como 'fragmentadas', y los grupos para los que no hay coincidencias que pasen las pruebas de ortología se clasifican como 'No encontrados'. Este análisis se realizó por un proveedor de servicios externo. Cuando los BUSCO completos son más altos pueden indicar un buen ensamblaje, sin embargo, para especies distintas a los organismos modelo, pueden aparecer BUSCO relativamente bajos debido a las características de la muestra, así como a lo incompleto del ensamblaje.

En la tabla FTIII.1, se observa un resumen del resultado de análisis de calidad de los genomas ensamblados de las cepas 1082.2 y 1086.2.

Tabla FTIII.1 Resultados del control de calidad de los genomas ensamblados.

Estatus	1082.2	1086.2
BUSCOs completos y de copia única (S)	147 (99,32%)	147 (99,32%)
BUSCOs completos y de copia única (S)	0 (0%)	0 (0%)
BUSCOs fragmentados (F)	1 (0%)	1 (0%)
BUSCOs no encontrados (M)	1 (0,68%)	1 (0,68%)
Total BUSCOs encontrados	148 (100%)	148 (100%)

En las figuras FTIII.1 y FTIII.2, se observa gráficamente el resultado de análisis de calidad de los genomas ensamblados de las cepas 1082.2 y 1086.2, respectivamente.

**Figura FTIII.1** Calidad del genoma ensamblado de la cepa 1082.2.

BUSCO Assessment Results

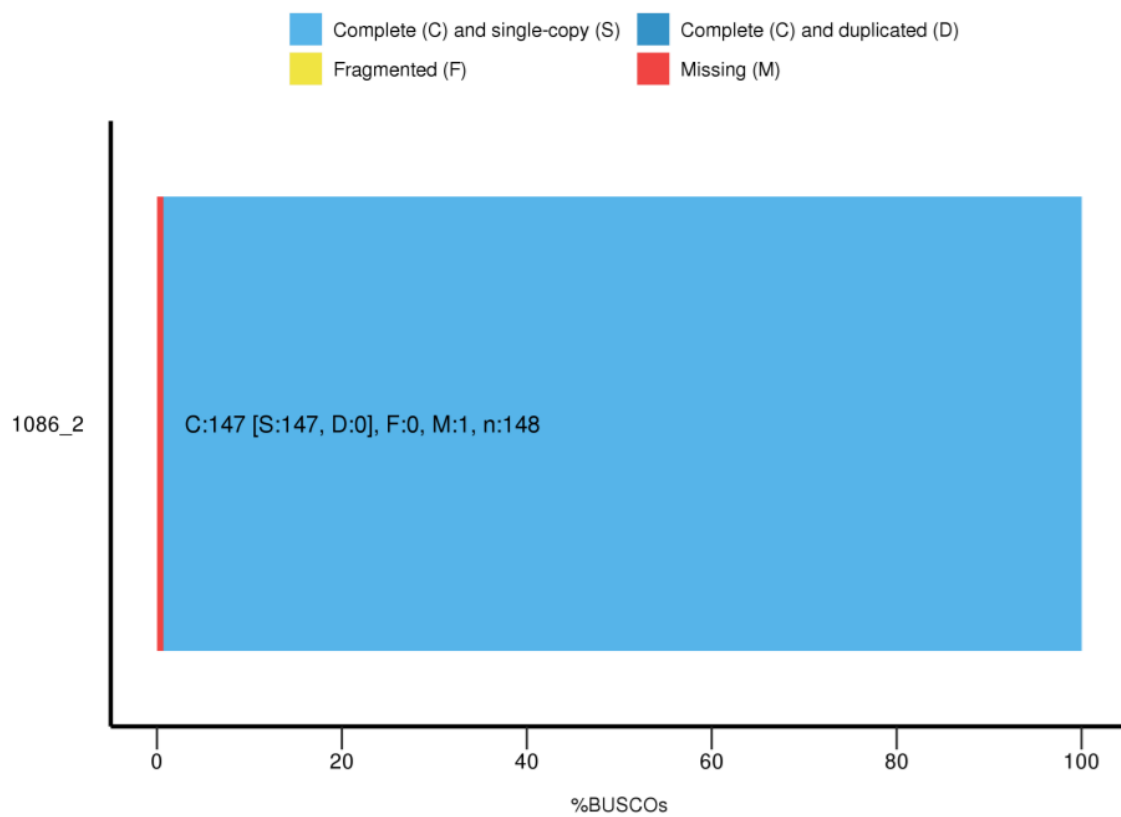


Figura FTIII.2 Calidad del genoma ensamblado de la cepa 1086.2.

ANEXO II

FICHAS TÉCNICAS DE LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

FICHA TÉCNICA I

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS LB (LB-L) Y LB-AGAR (LBA-L) ENRIQUECIDOS CON LECHE DESCREMADA

Objetivo: Preparar medios de cultivo con elevado contenido de proteína para la estimulación y observación de actividad proteolítica de cepas bacterianas.

Desarrollo:

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizó los reactivos detallados en la Tabla FTI.1. Se preparó el medio sin la leche descremada y se autoclavó por 15 min a 121 °C. Posteriormente, cuando el medio alcanzó una temperatura de 55 °C aproximadamente, se añadió al medio de cultivo la leche líquida descremada ultrapasteurizada precalentada a 37°C en el interior de una cámara de flujo laminar. El medio LBA-L se dispensó en cajas petri y se dejó solidificar. Los medios se incubaron a temperatura ambiente por 24 h para determinar si hubo contaminación. Finalmente, los medios sin contaminación se utilizaron para los análisis posteriores.

Tabla FTI.1 Reactivos empleados para elaborar medios de cultivo.

Reactivo	LB-L	LBA-L
NaCl (g/L)	10	10
Triptona (g/L)	10	10
Extracto de levadura (g/L)	5	5
Agar (g/L)	-	15
Agua destilada (mL)	667	667
Leche líquido descremada con 2,5% de proteína (mL/L)	333	333

FICHA TÉCNICA II

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS LB (LB), LB-AGAR (LBA), CALDO NUTRITIVO (CN) Y AGAR NUTRITIVO (AN)

Objetivo: Preparar medios de cultivo con el contenido de nutrientes necesarios para el crecimiento de cepas bacterianas.

Desarrollo:

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizó los reactivos detallados en la Tabla FTII.1. Se preparó el medio y se autoclavó por 15 min a 121 °C. Los medios LBA y AN se dispensaron en cajas petri y se dejaron solidificar. Los medios se incubaron a temperatura ambiente por 24 h para determinar si hubo contaminación. Finalmente, los medios sin contaminación se utilizaron para los análisis posteriores.

Tabla FTII.1 Reactivos empleados para elaborar medios de cultivo.

Reactivo	LB	LBA	CN	AN
NaCl (g/L)	10	10	-	-
Triptona (g/L)	10	10	-	-
Extracto de levadura (g/L)	5	5	-	-
Extracto de carne (g/L)	-	-	3	3
Peptona (g/L)	-	-	5	5
Agar (g/L)	-	15	-	15
Agua destilada (mL)	1 000	1 000	1 000	1 000

ANEXO III

FICHAS TÉCNICAS DEL BIOBANCO DE CEPAS

FICHA TÉCNICA I

LISTADO DE CEPAS BACTERIANAS DEL BIOBANCO

En la Tabla FTI.1, se detallan las cepas bacterianas termófilas del reactivadas. Las cepas criopreservadas en un biobanco (a -80 °C) se reactivaron mediante la siembra por estrías en el medio Agar Nutritivo y se incubaron a 55 °C por 24 h.

Tabla FTII.1 Reactivos empleados para elaborar medios de cultivo.

ID	Especie (accession number)	Medio	Reactivación
1078.1	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	LB	26/11/2018
1078.2	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (NR_040961.1)	LB	26/11/2018
1079.1	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1079.2	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	LB	26/11/2018
1080.1	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1080.2	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	LB	26/11/2018
1081.1	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1081.2	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1082.1	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	LB	26/11/2018
1082.2	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1082.2.2	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (NR_113974.1)	LB	26/11/2018
1083.1	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1083.2	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (NR_043232.1)	LB	26/11/2018
1084.2	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (NR_040961.1)	LB	26/11/2018
1085.1	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1085.2	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (NR_043021.2)	LB	26/11/2018
1086.1	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1086.2	<i>n.i.</i>	LB	26/11/2018
1078.2	<i>Bacillus kochii</i> (NR_117050.1)	AN	26/11/2018
1081.1	<i>Bacillus licheniformis</i> (NR_113799.1)	AN	26/11/2018

**n.i.* Cepa no identificada.