

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CAPTAR NaCl IN VITRO DE
BACTERIAS HALÓFILAS PROVENIENTES DE LAS LAGUNAS DE MEJÍA,
AREQUIPA - 2017**

Tesis presentada por las Bachilleres:
García Hennings Téllez, Elizabeth Diana
Huaco Alamo, Hilda Sofia

Para optar el Título Profesional de:
Ingeniera Biotechnóloga

Asesor:
Dra. Valderrama Valencia, María Rosario

Arequipa – Perú
2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2011000048552

N° Trámite en Fac. 131-2011
Fecha Recep. Fac. 21-12-2011

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **HUACO ALAMO, Hilda Sofía**
GARCIA HENNINGS TELLEZ, Elizabeth Diana



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS HALOFILAS PROCEDENTES DE LA LAGUNA SALINAS, AGUADA BLANCA, AREQUIPA Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD PARA CAPTURAR SODIO"

DICTAMINADORES: 1) *Dr. Oscar Murriel Pinazo* 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis presentado por el recurrente, cumplimos con informar que se ha revisado, formulado las observaciones y corregido, debiendo cambiar el título a : **"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS HALOFILAS PROCEDENTES DE LA LAGUNA SALINAS, AGUADA BLANCA, AREQUIPA Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD PARA REDUCIR SODIO"**, luego de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS :   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 27/12/2011

ASESOR: *Dra. Maria Valderrama Valencia*

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes , el título debe cambiar a : **"AISLAMIENTO, CARACTERIZACION BIOQUIMICA, MOLECULAR Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE CAPTAR NaCl IN VITRO DE BACTERIAS HALOFILAS PROVENIENTES DE LAS LAGUNAS DE MEJIA, AREQUIPA-2017"**, después de lo cual, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

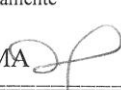

FIRMA  FECHA 26/06/2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga*
- 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*
- 3) *Ing. José Miguel Carpio Carpio*

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA   (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 10/07/2018

JURADOS: PRESIDENTE *Blgo. CARLOS EITEL IVAN PAZ ALIAGA*
VOCAL *Dra. CINTHIA CORDOVA BARRIOS*
SECRETARIO *Ing. JOSE MIGUEL CAPIO CAPIO*

FECHA 20/07/18 HORA 18.00 LOCAL SUH C-402

FIRMA DEL DECANO  FECHA 17/07/18

DEDICATORIA

Dedicamos la tesis a Dios por permitir abrir caminos para que logremos nuestros objetivos, por su misericordia e infinita bondad.

A nuestras familias por su apoyo incondicional, sus palabras sabias y su amor que nos alentó y empujo a continuar a pesar de las dificultades.



AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por esta oportunidad y permitírnos culminar la tesis.

Gracias a la Universidad y Catedráticos por habernos formado y brindado los conocimientos necesarios para desarrollarnos como excelentes profesionales.

Gracias a nuestra asesora de tesis la Dra. María Rosario Valderrama Valencia por su disposición a compartir sus conocimientos, por su apoyo de principio a fin y acompañarnos en el proceso, además de animarnos a continuar y no permitírnos declinar.

Gracias a nuestras familias por apoyarnos incondicionalmente y motivarnos cada día.



INTRODUCCIÓN

A lo largo de la costa peruana, especialmente en los valles, la salinidad se ha manifestado como un factor limitante en la implementación de proyectos de riego, desarrollo de actividades agrícolas y para fines recreacionales, ya que tiende a degradar la calidad del suelo junto a sus propiedades físicas y químicas, dando paso a su abandono y a las correspondientes pérdidas económicas (Ramirez, 2016).

La salinización de los suelos, es el proceso de acumulación de sales solubles. Esto puede darse en forma natural, cuando se trata de suelos bajos y planos, que son periódicamente inundados por ríos o arroyos, o si el nivel de las aguas subterráneas es poco profundo y el agua que asciende por capilaridad contiene sales disueltas. Cuando este proceso tiene un origen antropogénico, generalmente está asociado a sistemas de riego (Garcia, 2015).

Se llama suelo salino a un suelo con exceso de sales solubles, la sal dominante es el Cloruro de Sodio (NaCl), razón por la cual se le denomina suelo salino-sódico. Es común frenar o revertir el proceso mediante costosos «lavados» de los suelos para lixiviar las sales, o pasar a cultivar plantas que toleren mejor la salinidad (Garcia, 2015).

Los suelos afectados por sales se desarrollan usualmente en zonas áridas y semiáridas, donde la evaporación es mayor que la precipitación. También, puede presentarse esta problemática en zonas con prolongados períodos de sequía, como en lugares templados, secos y trópicos secos. Otros sectores donde es posible encontrar suelos con similares problemas, son los cercanos al mar (costas, lagunas, litorales y pantanos), o bien en la cercanía de manantiales de aguas y napas freáticas salinas. En consecuencia, la salinidad en forma natural, está ampliamente distribuida a nivel mundial y se incrementa a medida que se presentan cambios climáticos; procesos geomorfológicos de sedimentación, erosión y redistribución de materiales; así como cambios en la hidrología superficial y subterránea (Ramirez, 2016).

No existe información actualizada a nivel nacional, concerniente al tema de salinidad desde la década del 70. Según la información recopilada por el Instituto Nacional de Desarrollo (INADE), el Perú, en ese entonces, tenía aproximadamente un millón de hectáreas con aptitud para riego en la costa peruana; de las cuales, cerca de 750 000 hectáreas estaban cultivadas, y de éstas, casi la mitad con problemas de salinidad y mal drenaje. Según Pastor

(2010), la salinización de los suelos agrícolas en las zonas de la costa peruana, es un proceso contaminante y creciente, por esta razón la pequeña agricultura tiene limitaciones financieras para enfrentar el problema (Ramirez, 2016).

El problema que ocasiona la salinización del suelo, es la pérdida de fertilidad; lo que imposibilita el cultivo agrícola (Garcia, 2015). Arequipa es zona agrícola y con los años la acumulación de sales se irá incrementando haciendo que los suelos se conviertan en suelos salinos. Si logramos limpiar las áreas salinas de los suelos, lograremos ampliar las zonas agrícolas.

En el mundo de los microorganismos, existe una gran diversidad filogenética que excede en gran medida la de los macroorganismos. La búsqueda de microorganismos de gran interés industrial y ambiental, ha conducido a los investigadores a realizar estudios en nuevas zonas de la región (Benavides et al., 2008).

Ejemplos de esta biodiversidad incluye a los extremófilos, que se han adaptado para sobrevivir en diversos ambientes hostiles. En particular, los halófilos son de interés para científicos debido a sus mecanismos únicos de supervivencia, aplicaciones y usos en biotecnología, industria alimentaria, industria farmacéutica, medicina y biorremediación (Oliart et al., 2016).

Así mismo mediante la identificación de especies bacterianas se pretende ampliar la base de datos de microorganismos conocidos, contribuyendo así al conocimiento de la biodiversidad de la región (Benavides et al., 2008).

El presente estudio pretende aislar bacterias halófilas capaces de vivir en ambientes extremos e identificar las que son capaces de captar NaCl, que podrían utilizarse para la recuperación de suelos salinos.

RESUMEN

En la actualidad, hablar de salinidad no es ajeno a la realidad nacional. Se ha manifestado como un factor limitante en la agricultura. Por ello es necesario buscar la forma de desalinizar los terrenos y se ha visto que los microorganismos tienen esta capacidad.

El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento, caracterización bioquímica, molecular y evaluación de la capacidad de captar NaCl *in vitro* de bacterias halófilas provenientes de las Lagunas de Mejía, Arequipa. Se tomaron 3 muestras de agua de las cuales se obtuvo una muestra compósito, dicha muestra fue sembrada e incubada a 37°C por 48 horas en medio de Aislamiento de Bacterias Halofílicas a una concentración de 15.89 % de NaCl. Se obtuvieron 6 colonias; luego se realizó un acondicionamiento de las colonias obtenidas, en medio de Aislamiento de Bacterias Halofílicas con concentraciones de NaCl de 15.89 %, 20.89 % y 25.89 %. Se obtuvo un óptimo crecimiento en el medio que contenía hasta 20.89 % de NaCl, todas ellas son Bacilos, cuatro (4) Gram + y dos (2) Gram -. La caracterización bioquímica se llevó a cabo con las pruebas LIA, TSI, Citrato de Simmons, SIM, MRVP, Catalasa y Oxidasa. La caracterización molecular con el gen ARNr 16S, identificó 6 cepas: *Virgibacillus siamensis* (H1), *Halobacillus sp.* (H2), *Halobacillus hunanensis* (H3), *Salinicola zeshunii* (H4), *Bacillus halophilus* (H5) y *Kushneria sp* (H6). El consumo de NaCl se demostró midiendo la conductividad durante un periodo de 48 horas en un medio de cultivo, partiendo de una concentración de 20.57 % NaCl (202.6 mS/cm). Todas las cepas bacterianas demostraron tener capacidad de captar NaCl *in vitro*, siendo la bacteria *Kushneria sp.* la que presentó mayor capacidad de captar NaCl hasta 16.97 % NaCl (180.9 mS/cm), mientras que *Halobacillus hunanensis* presentó menor capacidad de hasta 18.83 % NaCl (192.1 mS/cm).

Palabras Clave: Halófilas, NaCl, *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis*, *Salinicola zeshunii*, *Bacillus halophilus*, *Kushneria sp.*

ABSTRACT

Nowadays, speaking of salinity is not foreign to the national reality. It has manifested itself as a limiting factor in agriculture. Therefore it is necessary to find ways to desalinate the land and it has been shown that it can be achieved through the use of microorganisms.

The research objectives were to isolate, characterize biochemically as well as molecularly and to evaluate the capacity to capture NaCl *in vitro* of halophilic bacteria from The Lagoons of Mejía, Arequipa. The bacteria were isolated from water samples in a *Halophilic Bacterium* Isolation medium at 15.89% NaCl concentration, incubated at 37 ° C for 48 hours. Six (6) colonies were obtained; then a conditioning of the colonies obtained was carried out in the medium of Isolation of Halophilic Bacteria with 15.89%, 20.89% and 25.89% NaCl concentrations. Optimal growth was obtained in the medium containing up to 20.89% NaCl. All of them were Bacillus, four (4) Gram + and two (2) Gram -. The biochemical characterization was carried out with the LIA, TSI, Simmons Citrate, SIM, MRVP, Catalase and Oxidase tests. The molecular characterization with the 16S rRNA gene, identified 6 strains: *Virgibacillus siamensis* (H1), *Halobacillus sp.* (H2), *Halobacillus hunanensis* (H3), *Salinicola zeshunii* (H4), *Bacillus halophilus* (H5) and *Kushneria sp.* (H6). The NaCl consumption was demonstrated by measuring the conductivity during a 48 hour period starting from 20.57% NaCl concentration (202.6 mS / cm). All the bacterial strains showed capacity to capture NaCl *in vitro* being the *Kushneria sp.* bacterium the one with the greater capacity, giving as final concentration 16.97% NaCl (180.9 mS / cm) and the *Halobacillus hunanensis* the one with the smaller capacity showing a final concentration of 18.83% NaCl (192.1 mS / cm).

Key Words: Halophilic, NaCl, *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis*, *Salinicola zeshunii*, *Bacillus halophilus*, *Kushneria sp.*

ÍNDICE

HIPOTESIS	1
OBJETIVOS	2
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO	3
1.1. EXTREMÓFILOS	3
1.2. MICROORGANISMOS HALOFILOS	3
1.3. LOS TRES DOMINIOS DE LA VIDA.....	5
1.4. BACTERIAS HALOFILAS	6
1.4.1. MECANISMO DE ADAPTACIÓN DE LOS ORGANISMOS HALÓFILOS	7
1.4.2. MODIFICACIONES DE LA MORFOLOGIA CELULAR	9
1.4.3. CRECIMIENTO Y METABOLISMO BACTERIANO	9
1.4.4. IMPORTANCIA Y APLICACIONES DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS	13
1.5. AMBIENTES SALINOS	18
1.5.1. MEJIA	19
1.5.2. SANTUARIO LAGUNAS DE MEJIA	20
1.6. IDENTIFICACIÓN BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS	23
1.6.1. Agar de Hierro y Lisina (LIA).....	23
1.6.2. Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP)	24
1.6.3. Prueba Indol (SIM)	24
1.6.4. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)	25
1.6.5. Citrato de Simmons	25
1.6.6. Prueba de la Catalasa	26
1.6.7. Prueba de la Oxidasa	26
1.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS.....	26
1.7.1. CARACTERÍSTICAS DEL ARNr 16S	27
1.7.2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ARNr 16S.....	30
1.7.3. APLICACIÓN DE LA BIOINFORMÁTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	30
1.7.3.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS.....	30
1.7.3.2. BASE DE DATOS.....	31
1.7.3.3. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS	36

1.8.	CAPACIDAD DE BACTERIAS HALÓFILAS DE CAPTAR NaCl IN VITRO	36
1.8.1.	Métodos para la medición de salinidad	37
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS		40
2.1.	IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	40
2.1.1.	Identificar la zona de muestreo.....	40
2.1.2.	Toma de muestra de agua en las Lagunas de Mejía	40
2.2.	AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALOFILAS	40
2.2.1.	Acondicionamiento de las bacterias halófilas (límite de crecimiento en NaCl)	41
2.3.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BACTERIAS HALÓFILAS.....	42
2.4.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS HALÓFILAS.....	42
2.4.1.	Prueba TSI.....	42
2.4.2.	Prueba LIA	43
2.4.3.	Prueba Citrato de Simmons	43
2.4.4.	Prueba SIM	43
2.4.5.	Prueba MRVP.....	43
2.4.6.	Prueba Catalasa.....	44
2.4.7.	Prueba Oxidasa.....	44
2.5.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS HALÓFILAS	44
2.5.1.	Extracción de ADN genómico de bacterias halófilas	44
2.5.2.	Determinación de la calidad del ADN extraído.....	45
2.5.2.1.	Integridad del ADN extraído	45
2.5.2.2.	Pureza del ADN extraído	45
2.5.3.	Amplificación del segmento genético ARNr 16S	46
2.5.3.1.	Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	47
2.5.3.2.	Visualización de los productos amplificados por la PCR	47
2.5.4.	Secuenciación de la secuencia ARNr 16S	47
2.5.5.	Identificación Molecular de las cepas	48
2.5.6.	Alineamiento y construcción del árbol filogenético.....	48
2.6.	EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS DE CAPTAR NaCl IN VITRO.....	48
2.6.1.	Estandarización de la curva de crecimiento, determinación de la fase logarítmica y cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias halófilas	48

2.6.2. Evaluación de la capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl in vitro..	50
.....	50
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1. IDENTIFICACIÓN Y OBTENCION DE LA MUESTRA	51
3.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALOFILAS	52
3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS .	
.....	54
3.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUIMICA DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS ..58	
3.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS..60	
3.5.1. Extracción de ADN de bacterias halófilas.....	60
3.5.2. Determinación de la calidad del ADN extraído.....	61
3.5.3. Amplificación del segmento genético ARNr 16S	61
3.5.4. Secuenciación del segmento genético ARNr 16S	62
3.5.5. Identificación Molecular de las cepas	67
3.5.6. Alineamiento y construcción del árbol filogenético.....	72
3.6. EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS DE	
CAPTAR NaCl IN VITRO.....	73
3.6.1. Estandarización de la curva de crecimiento, determinación de la fase	
logarítmica y cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias halófilas	73
3.6.2. Determinación de la capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl.....	78
CAPITULO IV. CONCLUSIONES	85
CAPITULO V. RECOMENDACIONES	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	94
ANEXO 1. Toma de muestra	94
ANEXO 2. Pruebas Bioquímicas	94
ANEXO 3. Extracción de ADN	98
ANEXO 4. PCR.....	99
ANEXO 5. Electroferogramas de las cepas.....	100
ANEXO 6. Determinación del consumo del sal.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Clasificación de halófilas basada en su crecimiento en Cloruro de Sodio (DasSarma y Arora, 2002).....	4
Tabla N° 2. Clasificación de halófilas basada en su crecimiento en Cloruro de Sodio (Kanekar et al., 2011)	4
Tabla N° 3. Comparación de los tres dominios de la vida. (Sadava y Purves, 2009)	6
Tabla N° 4. Medio de Aislamiento de Bacterias Halófilas (Quesada et al., 1982)	41
Tabla N° 5. Mezcla de Reacción para PCR.....	46
Tabla N° 6. Condiciones de PCR	47
Tabla N° 7. Crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de NaCl.....	53
Tabla N° 8. Características morfológicas de las cepas halófilas	55
Tabla N° 9. Características morfológicas de las cepas halófilas.	57
Tabla N° 10. Características bioquímicas de las cepas halófilas nativas	58
Tabla N° 11. Medición de la pureza y concentración de ADN genómico de cepas halófilas.	61
Tabla N° 12. Microorganismos que presentaron homología con la secuencia del gen ARNr 16S	70
Tabla N° 13. Multiplicación de bacterias halófilas en diferentes concentraciones de Triptona	73
Tabla N° 14. Determinación de la Velocidad Específica de Crecimiento.....	78
Tabla N° 15. Medida de la conductividad en diferentes concentraciones de Triptona + NaCl.....	78
Tabla N° 16. Conductividad para cada cepa en determinado tiempo y su conversión a % NaCl.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Los tres dominios de la vida (Woese et al., 1990).....	5
Figura N° 2. Movimiento de iones en microorganismos halófilos (Garzón, 2015)	8
Figura N° 3. Curva de crecimiento bacteriano, sistema cerrado (Varela y Grotiuz, 2006). 11	
Figura N° 4. Trofofase e Idiofase (Salmerón et al., 2015)	13
Figura N° 5. Ubicación Distrito de Mejía.....	20
Figura N° 6. Lagunas de Mejía.....	21
Figura N° 7. Área total del Santuario de Mejía	22
Figura N° 8. Estructura secundaria del ARNr 16S.....	28
Figura N° 9. Ubicación de los puntos de muestreo (Muestra 1) -17.141587,- 71.867419;(Muestra 2) -17.146961, -71.865933; (Muestra 3) -17.148901, -71.860680.	51
Figura N° 10. Colonias axénicas de bacterias halófilas aisladas en medio de aislamiento para bacterias halofílicas	52
Figura N° 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico extraído de las cepas halófilas.....	60
Figura N° 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S de las cepas halófilas.....	62
Figura N° 13. Árbol filogenético construido en base a las secuencias del gen ARNr 16S. 72	
Figura N° 14. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Virgibacillus siamensis</i> a las 75 horas 74	
Figura N° 15. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Halobacillus sp.</i> a las 75 horas	75
Figura N° 16. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Halobacillus hunanensis</i> a las 75 horas	75
Figura N° 17. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Salinicola zeshunii</i> a las 75 horas	76
Figura N° 18. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Bacillus halophilus</i> a las 75 horas.....	76
Figura N° 19. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Kushneria sp</i> a las 75 horas	77
Figura N° 20. Curva estándar de Tripton+ % NaCl.....	79
Figura N° 21. Relación crecimiento bacteriano <i>Virgibacillus siamensis</i> vs % NaCl en el tiempo	81
Figura N° 22. Relación crecimiento bacteriano <i>Halobacillus sp.</i> vs % NaCl en el tiempo 81	
Figura N° 23. Relación crecimiento bacteriano <i>Halobacillus hunanensis</i> vs % NaCl en el tiempo	82
Figura N° 24. Relación crecimiento bacteriano <i>Salinicola zeshunii</i> vs % NaCl en el tiempo	82

Figura N° 25. Relación crecimiento bacteriano *Bacillus halophilus* vs % NaCl en el tiempo82

Figura N° 26. Relación crecimiento bacteriano *Kushneria sp.* vs % NaCl en el tiempo83



HIPOTESIS

De acuerdo a los casos reportados de hallazgos de diferentes bacterias halófilas en diversos cuerpos de agua salada, es posible aislar bacterias halófilas de las Lagunas de Mejía que tengan la capacidad de captar Cloruro de Sodio (NaCl) *in vitro*.



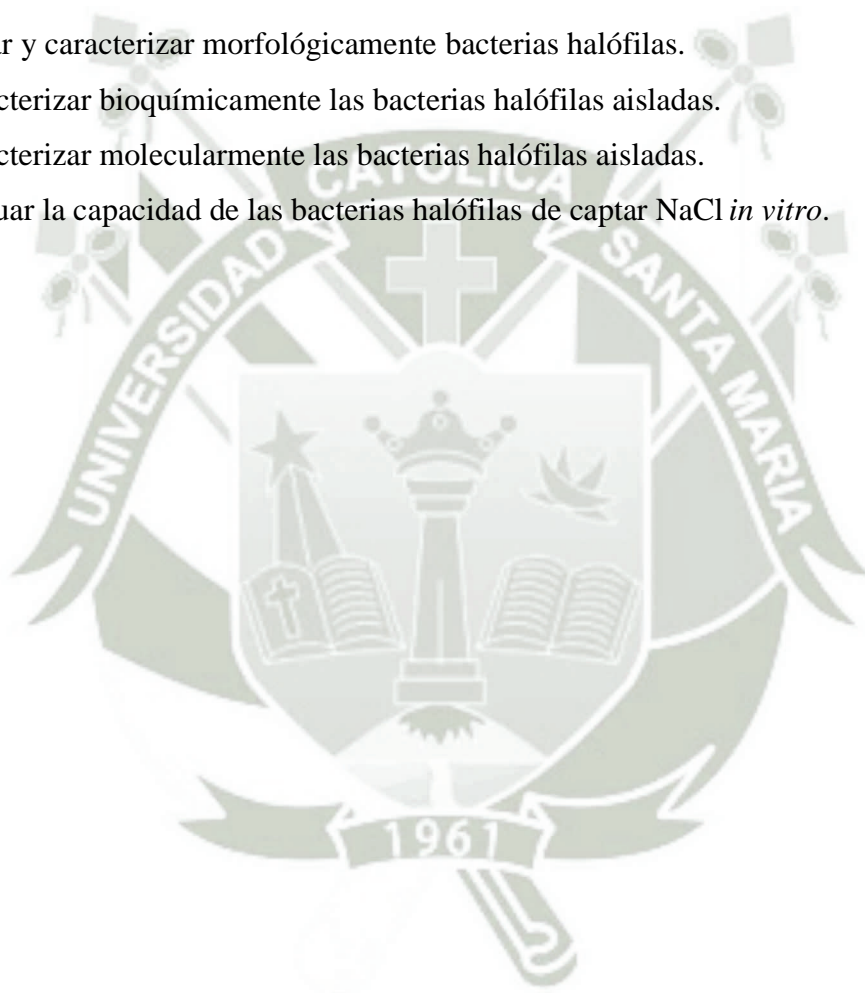
OBJETIVOS

GENERAL

Aislar, caracterizar bioquímica, molecularmente y evaluar la capacidad de captar NaCl *in vitro* de bacterias halófilas.

ESPECÍFICOS

1. Aislar y caracterizar morfológicamente bacterias halófilas.
2. Caracterizar bioquímicamente las bacterias halófilas aisladas.
3. Caracterizar molecularmente las bacterias halófilas aisladas.
4. Evaluar la capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl *in vitro*.



CAPITULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. EXTREMÓFILOS

Desde los años 1970 se demostró la existencia de vida microbiana con capacidades de adaptación a ambientes extremos. El término extremófilo fue usado por primera vez, por MacElroy en 1974. “Ambiente extremo”, es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otro organismo. Los extremófilos son capaces de crecer bajo condiciones que podría matar a la mayoría de otras criaturas y muchos no pueden sobrevivir en los ambientes considerados globalmente normales. Estos organismos se desarrollan óptimamente bajo condiciones extremas de temperaturas muy elevadas (55-121°C) o bajas (-2-20°C), alta salinidad (NaCl 2- 5M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 4) (Madigan et al., 1997).

Este término también incluye al que puede tolerar altos niveles de radiación o compuestos tóxicos. Bajo la denominación de extremófilos se incluyen diferentes taxones de Procariotas (bacterias y Arqueas) y Eucariotas (Rothschild et al., 2001).

1.2. MICROORGANISMOS HALOFILOS

Tal como menciona DasSarma y Arora (2002), el término Halófilo viene del griego, donde “halo” es sal y “filo” es amante de, es decir, significa amante de la sal. Las sales se requieren para todas las formas de vida pero los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento. Los microorganismos halófilos muestran respuestas diferentes a concentraciones diferentes, por ello se han propuesto diferentes esquemas para clasificarlas como Truper y Galinski en 1986, Vreeland en 1987 y Ramos-Comenzana en 1989.

La clasificación más utilizada por los científicos fue propuesta por DasSarma y Arora (2002). Tal como se puede apreciar en la Tabla N° 1 esta clasificación está basada en el crecimiento óptimo de los microorganismos con respecto a la concentración de NaCl, según la cual se las divide en las siguientes categorías: Halófilos leves 0.2 y 0.85 M (2-5 %),

Halófilos moderados, crecen entre 0.85 y 3.4 M (5-20 %) de NaCl, y Halófilos extremos, que crecen de 3.4 a 5.1 M (20-30%) de NaCl.

Tabla N° 1. Clasificación de halófilas basada en su crecimiento en Cloruro de Sodio (DasSarma y Arora, 2002)

	Concentración de NaCl	
	Molaridad, M	Porcentaje, %
Halófilos Ligeros o Débiles	0.2 - 0.85	2 – 5
Halófilos moderados	0.85 - 3.4	5 - 20
Halófilos extremos	3.4 - 5.1	20 - 30

Y según Kanekar et al. (2011) las bacterias halófilas se clasifican en cuatro categorías (Tabla N° 2):

Tabla N° 2. Clasificación de halófilas basada en su crecimiento en Cloruro de Sodio (Kanekar et al., 2011)

Clasificación	Concentración de NaCl % (p/v)
Halotolerantes	0 – 5
Halófilos débiles	1 – 5
Halófilos moderados	5 – 15
Halófilos extremos	15 – 30

En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (Russel, 1993).

1.3. LOS TRES DOMINIOS DE LA VIDA

A partir de los años setenta, Woese y otros biólogos interesados en la filogenia de los microorganismos han estudiado la bioquímica de los organismos procarióticos. Estos investigadores, concentrando su atención en las secuencias de nucleótidos del RNA presente en los ribosomas, establecieron que lo que hasta entonces se había considerado como el reino Monera se compone en realidad de dos clases muy diferentes de organismos. Woese et al. (1990) ha dado a estos dos grupos los nombres de Bacteria y Archaea y ha propuesto que se debe clasificar la vida en tres dominios (Audesirk et al., 2008), tal como se muestra en la Figura N° 1 y la Tabla N° 3.

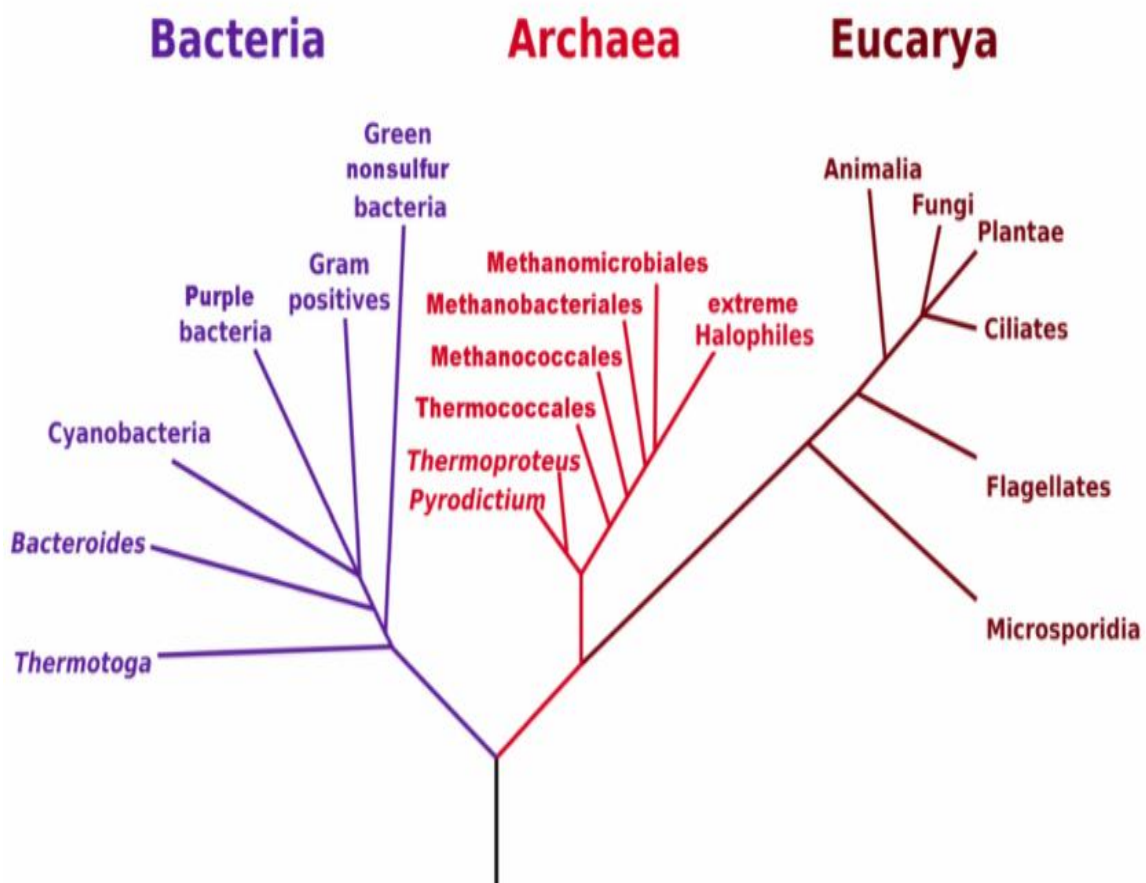


Figura N° 1. Los tres dominios de la vida (Woese et al., 1990)

Tabla N° 3. Comparación de los tres dominios de la vida. (Sadava y Purves, 2009)

LOS TRES DOMINIOS DE LA VIDA EN LA TIERRA			
Características	Bacteria	Archaea	Eukarya
Envoltura Nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Orgánulos recubiertos por membrana	Ausente	Ausente	Presente
Peptidoglicanos en la pared celular	Presente	Ausente	Ausente
Lípidos de membrana	Unión éster Hidrocarburos no ramificados	Unión éter Algunos hidrocarburos ramificados	Unión éster Hidrocarburos no ramificados
Ribosomas	70S	70S	80S
tRNA iniciador (Aminiócido iniciador de la síntesis de proteínas)	Formilmencionina	Metionina	Metionina
Operones	Si	Si	No
Plásmidos	Si	Si	Raro
RNA Polimerasa	Una	Una	Tres
Ribosomas sensibles a cloranfenicol y estreptomycin (respuesta a antibióticos)	Si inhibe el crecimiento	No inhibe el crecimiento	No inhibe el crecimiento
Intrones (Partes no codificantes de los genes)	Raros	Presentes en algunos genes	Presentes
Histonas asociadas con el DNA	Ausentes	Presentes	Presentes
Cromosoma circular	Presente	Presente	Ausente
Capacidad de crecer a temperaturas mayores de 100°C	No	Algunas	No
Algunos son Metanógenos	No	Si	No
Algunos fijan Nitrógeno	Si	Si	No
Algunos tienen fotosíntesis basada en clorofila	Si	No	Si

1.4. BACTERIAS HALOFILAS

Las bacterias halófilas son capaces de reproducirse y realizar funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales que en su ausencia (Gonzales-Hernández y Peña, 2002).

1.4.1. MECANISMO DE ADAPTACIÓN DE LOS ORGANISMOS HALÓFILOS

Las bacterias adaptadas a vivir en ambientes hipersalinos se enfrentan a un medio con una fuerza iónica elevada (Galinski y Truper, 1994), por lo cual la adaptación al medio consiste en equilibrar la presión osmótica interna con la externa, con el fin de mantener la integridad celular y sus funciones vitales. Esta osmoadaptación es posible gracias a dos estrategias, la primera es la acumulación de grandes cantidades de sales (principalmente KCl) en el interior de la célula y la segunda ocurre mediante el empleo de compuestos orgánicos (Garzón, 2015).

En los organismos no halófilos las células se rompen cuando son expuestas a salinidades mayores de 10-12% de NaCl, debido a la marcada diferencia en la concentración del catión sodio (Na^+) entre el interior y el exterior de las células; pues la alta concentración de Na^+ en el exterior provoca un incremento en la presión ejercida sobre la célula, lo que conduce a una pérdida de agua celular y, consecuentemente, a su inevitable ruptura (Kushner y Kamekura, 1988).

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (Russell, 1993).

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación. El primero de ellos, denominado mecanismo “**salt-in**” es típico de Arqueas y Haloanaerobiales (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- . El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas. Las cargas positivas acumuladas se compensan

con iones negativos, como cloruro (Cl^-) o fosfato (PO_3^{2-}). De este modo, se propicia la adaptación de todos los sistemas intracelulares a una alta concentración (hasta 373 g/L) de Cloruro de Potasio (KCl) en el citoplasma (Dennis y Shimmin, 1997) (Vreeland y Hochstein, 1992).

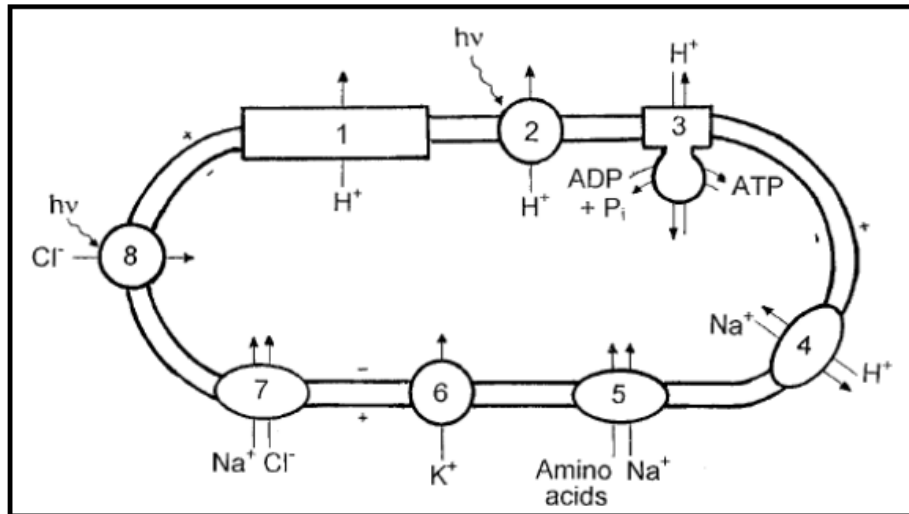


Figura N° 2. Movimiento de iones en microorganismos halófilos (Garzón, 2015)

Como se muestra en la Figura N° 2 las bacterias halófilas, presentan diferentes mecanismos para generar un balance osmótico con el medio externo, entre estos se encuentran: 1. Eliminación de protones H^+ debido al transporte de electrones de la cadena respiratoria, durante el crecimiento aerobio en halófilas. 2. Liberación de protones durante la fosforilación a nivel de sustrato teniendo como intermediario ATPasas. 3. En presencia de luz se da la salida de protones mediada por la acción de la bacteriorodospina en algunas bacterias. 4. Bomba de intercambio antiporter de Na^+ / H^+ , en la cual se presenta un gradiente de sodio a expensas de un gradiente de protones con una estequiometría de un ion Na^+ por dos protones que entran a la célula. 5. El sodio ingresa a la célula mediante un gradiente de Na^+ asociado al transporte de aminoácidos. 6. La entrada pasiva de K se da por medio del potencial de membrana de la célula. 7. El transporte de Cl^- independiente de luz se da asociado al transporte de Na^+ y dependiente de luz. 8. Bomba que incorpora Cl^- al citoplasma gracias a halorodopsina. La adaptación a la fuerza iónica a la que se ven expuestas las bacterias halófilas significa un gasto energético para el microorganismo, por lo que la estrategia de acumulación de KCl es menos costosa que la acumulación de solutos compatibles o salt out, pero requiere una mayor adaptación de la maquinaria celular (Garzón, 2015).

El segundo mecanismo conocido como “**salt out**”, es el que utilizan las bacterias tanto halófilas como no halófilas, además de las arqueas metanogénicas halófilas moderadas. Estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan **solutos compatibles**, que son compuestos orgánicos de tipo aminoácido, azúcar o alcohol y su presencia es característica de cada especie y los sistemas intracelulares no requieren adaptación alguna, ya que la sal se mantiene fuera de la célula. Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede, por ejemplo cuando las bacterias se cultivan en un medio mínimo. Los principales solutos compatibles descritos a la fecha son: aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína (Ramírez et al., 2004).

1.4.2. MODIFICACIONES DE LA MORFOLOGIA CELULAR

Las bacterias halófilas presentan modificaciones estructurales en la pared y membranas celulares evidenciándose en alteraciones en la composición, síntesis de proteínas, lípidos y ácidos grasos dándose mayores alteraciones morfológicas a concentraciones mayores a 2 M de NaCl. Una respuesta a las altas concentraciones de NaCl es el aumento de los fosfolípidos cargados negativamente presentes en la membrana, como es el caso del género Halomonas, el cual es capaz de vivir en un amplio rango de concentraciones de sal (0,05-3,40 M), debido a la composición de lípidos en la membrana (Garzón, 2015).

1.4.3. CRECIMIENTO Y METABOLISMO BACTERIANO

El paso esencial para iniciar el estudio de una cepa bacteriana, es el cultivo. Este paso es importante para proveer de una población de bacterias que puedan ser analizadas mediante pruebas bioquímicas, serológicas, genéticas y de susceptibilidad a los antibióticos. El cultivo es el proceso de propagación de los microorganismos en el laboratorio, que se obtiene aportando las condiciones ambientales adecuadas y los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. **El crecimiento** se define como el aumento del número de bacterias en una población determinada. A continuación se detalla en la Figura N°3 las fases del crecimiento bacteriano en un sistema cerrado citado por Varela y Grotiuz (2006).

a) Fase de Latencia

Las bacterias transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco, sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación. Hay aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. Por lo tanto, la mal llamada fase de latencia implica intensa actividad metabólica (Varela y Grotiuz, 2006).

b) Fase Exponencial

Las células se dividen a velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial. Próximo al final de esta fase, se produce la liberación de exotoxinas por las bacterias que las producen (Varela y Grotiuz, 2006).

c) Fase Estacionaria

Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos determinan el cese del crecimiento. Hay pérdida de células por muerte, la cual es balanceada por la formación de nuevas células. Cuando esto ocurre, el conteo total de células aumenta levemente aunque el de las bacterias viables permanece constante. Hacia el final de esta etapa, puede ocurrir la esporulación en aquellas bacterias que poseen este mecanismo de resistencia (Varela y Grotiuz, 2006).

d) Fase de Muerte

Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente y, por lo tanto la curva de crecimiento declina. Las características de la curva de crecimiento pueden variar, dependiendo de las características propias del microorganismo, del estado metabólico del inóculo, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación.

Las condiciones físicas y químicas del medio donde el microorganismo crece afectan las actividades de éstos. La comprensión de cómo influye el ambiente en el crecimiento, nos ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos que permitan estudiar y controlar el crecimiento bacteriano. Además, existen sistemas de cultivo abiertos que son poco usados en el laboratorio de microbiología clínica (Varela y Grotiuz, 2006).

El cultivo continuo (con aporte y salida de nutrientes y requerimientos a una tasa constante), permite mantener a las bacterias en una misma fase de crecimiento durante un largo período de tiempo (por ejemplo en la fase estacionaria o en la exponencial). Dicha técnica es interesante por ejemplo para los procesos productivos (Varela y Grotiuz, 2006).

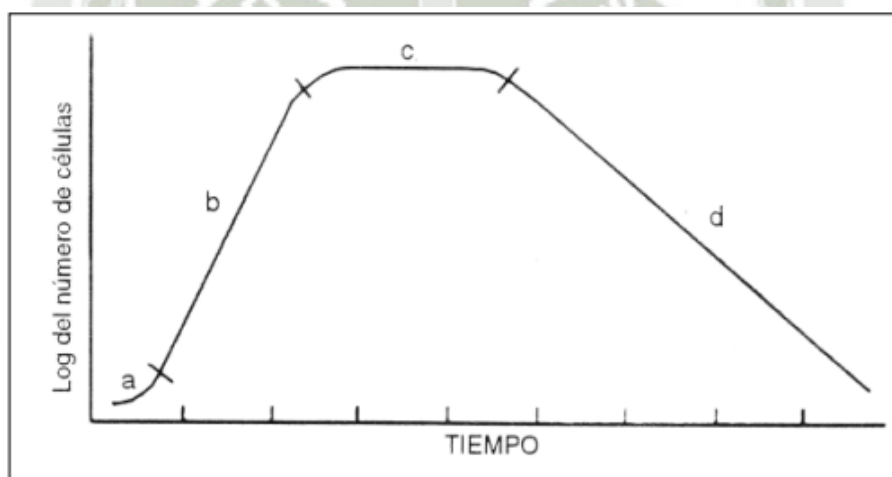


Figura N° 3. Curva de crecimiento bacteriano, sistema cerrado (Varela y Grotiuz, 2006)

El metabolismo se refiere a la suma de reacciones bioquímicas requeridas para la generación de energía y el uso de la energía para sintetizar material celular a partir de moléculas del medio ambiente. Según Varela y Grotiuz (2006) el metabolismo se divide en:

- Catabolismo. Reacciones de generación de energía.
- Anabolismo. Reacciones de síntesis que requieren de energía.

Las reacciones catabólicas producen energía como ATP, el cual es utilizado en las reacciones anabólicas para sintetizar el material celular a partir de nutrientes. Se producen en el curso de las reacciones metabólicas anabólicas o catabólicas que tiene lugar durante

las fases de crecimiento y que contribuyen a la producción de biomasa o energía por las células. Hay dos tipos fundamentales de productos metabólicos: primarios y secundarios (Varela y Grotiuz, 2006).

Un metabolito primario es el que se forma durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo, mientras que un metabolito secundario es el que se forma cerca del final de la fase de crecimiento, frecuentemente cerca de, o en la fase estacionaria del crecimiento según Varela y Grotiuz (2006):

Metabolitos primarios microbianos

Los metabolitos primarios son moléculas de bajo peso molecular que tiene lugar durante las fases de crecimiento y que contribuyen a la producción de biomasa o energía por las células. Se producen durante la fase logarítmica de crecimiento (trofofase) como producto del metabolismo, y son esenciales para la función del microorganismo. La producción neta se relaciona con el crecimiento y la cantidad de sustrato (<https://microorganismosusoindustrial.wikispaces.com/METABOLISMO>)

Metabolitos secundarios microbianos

Los metabolitos secundarios se producen durante la fase estacionaria. Los metabolitos secundarios se definen por las siguientes características: (<https://microorganismosusoindustrial.wikispaces.com/METABOLISMO>)

- Productos naturales que tienen una distribución taxonómica restringida.
- Se forman una vez que el crecimiento se ha detenido.
- Suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados.
- Cada metabolito secundario sólo lo forman relativamente pocos organismos.
- Los metabolitos secundarios, aparentemente no son esenciales para el crecimiento y la reproducción.
- La formación de metabolitos secundarios es extremadamente dependiente de las condiciones de crecimiento, especialmente de la composición del medio.

En la Figura N° 4 se observa la **trofofase** que es la fase de crecimiento logarítmico (el prefijo *trofos*, significa "crecimiento") donde normalmente no se producen los metabolitos secundarios, mientras que la fase de producción de metabolitos es la **idiofase** (Parés y Juárez, 2002).

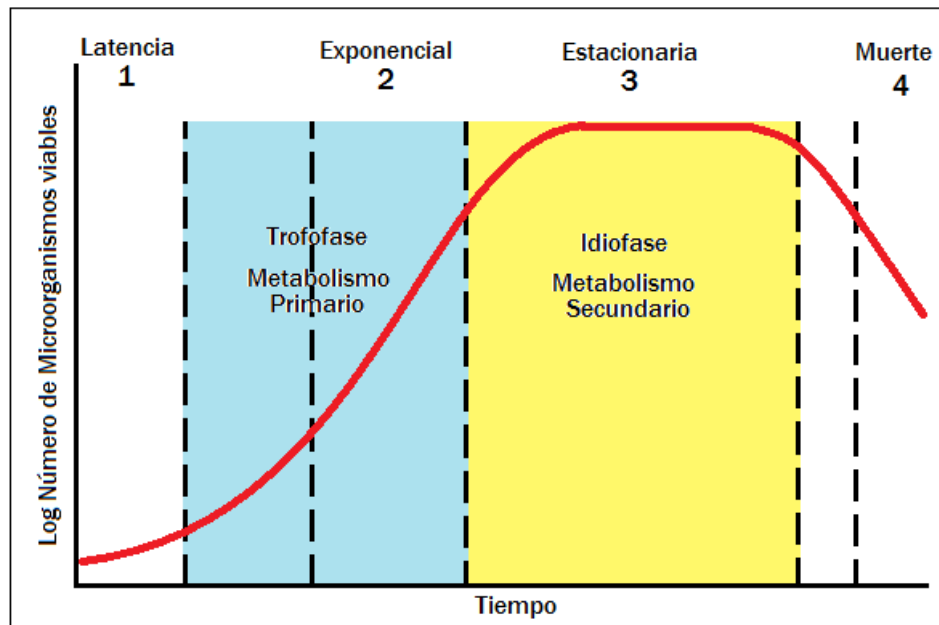


Figura N° 4. Trofofase e Idiofase (Salmerón et al., 2015)

1.4.4. IMPORTANCIA Y APLICACIONES DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Los microorganismos halófilos han desarrollado complejos procesos de adaptación que les han permitido hacer frente a las condiciones ambientales extremas que caracterizan a los ambientes salinos. Uno de los más importantes mecanismos de adaptación que han desarrollado estos microorganismos es la acumulación intracelular de solutos u osmolitos compatibles, y cuya principal característica es la de no interactuar con el metabolismo celular, por lo que su función es puramente osmótica (Ventosa et al., 1998).

Desde que se inició su estudio, las bacterias halófilas moderadas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico. Así, no sólo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. Por ejemplo, son microorganismos fáciles de cultivar y con escasos

requerimientos nutricionales, pudiendo utilizar una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía. Además, su tolerancia a elevadas concentraciones salinas reduce al mínimo los riesgos de contaminaciones en el laboratorio. A continuación se describen aplicaciones de estos microorganismos (Ventosa y Nieto, 1995).

a) Producción de Enzimas

Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad. La mayoría de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento provienen de bacterias halófilas moderadas. Así, se han descrito varias hidrolasas de interés industrial del tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y 5'-nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas. La nucleasa H, producida por *Micrococcus varians*, subsp. *halobius*, por ejemplo, es especialmente interesante para la producción de los agentes aromatizantes ácido 5'-inosínico y ácido 5'-guanílico (Ramírez et al., 2004).

Hidrolasas halófilas producidas de diversas bacterias halófilas y su uso industrial ya han sido descritas tales como las Amilasas: *Haloferax mediterranei*, *Halobacterium salinarium*, *Nesterenkinia halobia*, *Halomonas meridiana*, *Halobacillus sp.* para la sacarificación de microalgas marinas, hidrólisis de almidón y textiles, alimentos, fabricación de cerveza y destilación industrial; Proteasas: *Bacillus sp.*, *Halobacillus sp.*, *Virgibacillus sp.*, *Natrialba magadii*, para la síntesis de péptidos, para la preparación de salsa de pescado y formulación de detergentes; Lipasas tal como *Salinivibrio sp.*, *Natrococcus sp.*, como aditivos para detergentes, utilizadas en la industria de alimentos y papel, y en biocatálisis; DNAsas, como *Micrococcus varians*, *Bacillus sp.*, N23-2 utilizadas como agentes de sabor ácido 5'-guanílico y ácido 5'-inosínico; Celulasas y Pululanases como *Bacillus sp.*, biocatalizador en solventes orgánicos y fluidos supercríticos (Delgado et al., 2012).

En Perú se han hecho estudios, en ambientes salinos como Pilluana, Huacho, Maras, Chilca, Paracas y Ventanilla en la que se obtuvieron 12 especies bacterianas con gran potencial biotecnológico, en la producción de hidrolasas capaces de

hidrolizar tween 80, aceite de oliva, almidón, caseína, lactosa y ADN (Flores et al., 2010).

A nivel industrial, la degradación del almidón requiere diversas condiciones catalíticas desde muy suaves hasta extremas, para ello se caracterizaron bacterias halófilas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Halomonas* con actividad amilolítica provenientes de las Salinas de San Blas-Junín, estas bacterias son capaces de crecer en diferentes rangos salinos y algunas poseen la capacidad de producir proteasas, lipasas y DNasas (Canales et al., 2014).

b) Producción de Polímeros

Los microorganismos halófilos tienen la capacidad de producir biopolímeros de diferentes clases entre los cuales encontramos:

Exopolisacáridos, biosurfactantes, liposomas, lectinas y bioplásticos. Los exopolisacáridos (EPS) son biopolímeros producidos extracelularmente por bacterias halófilas, teniendo aplicaciones en la industria alimentaria como: espesante, emulgente y gelificante, en la industria farmacéutica y en procesos de biodegradación. Los exopolisacáridos sulfatados son poco frecuentes entre los exopolisacáridos de origen microbiano, sin embargo, algunos microorganismos halófilos estudiados sintetizan polímeros en cuya composición se detectan grupos sulfato (Castillo y Barragán, 2011).

Una de las ventajas de estos exopolisacáridos es que tienen actividad moduladora de la proliferación de distintos tipos celulares, entre ellos células tumorales. Bloquea la entrada de células virales en células hospederas, además, los exopolisacáridos le dan la capacidad a las células bacterianas de formar biofilms permitiéndoles la adhesión a diferentes superficies (Castillo y Barragán, 2011).

Otras de las ventajas que le conceden los exopolisacáridos a las bacterias halófilas es la capacidad de captar metales pesados. Su actividad viscozante y emulgente, adicionalmente algunos exopolisacáridos pueden ser fuentes de oligosacáridos ricos en fucosa, presentando potenciales aplicaciones en cosmética y medicina (Mata, 2006).

Los liposomas sirven para el transporte de compuestos en medicina y cosmética; El Ácido poli-g-D-glutámico (PeA) como humectante y espesante y los polihidroxialcanoatos para prótesis y plásticos biodegradables (Meseguer, 2004).

Los biosurfactantes mejoran la remediación de suelo y agua contaminados con aceite, disminuyen la tensión superficial, incrementan la solubilidad y movilidad de hidrocarburos hidrofóbicos, promoviendo la degradación. Los microorganismos halófilos o halotolerantes productores de biosurfactantes podrían jugar un papel importante en la acelerada remediación de medios ambientes salinos contaminados con aceite. Las bacterias halófilas también han sido usadas para la producción de bioplásticos, los polihidroxialcanoatos (PHA) que son compuestos bacterianos acumulados intracelularmente; como son plásticos biodegradables podrían reemplazar a los termoplásticos derivados del aceite (Margesin y Schinner, 2001).

c) Solutos Compatibles

Las bacterias halófilas moderadas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles (Ramírez et al., 2006), que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial, ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad (Louis y Galinski, 1997).

También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática (biosensores, PCR, etc.) y en la industria farmacéutica y cosmética (Margesin y Schinner, 2001).

d) Biodegradación de Residuos y Biorremediación

Las bacterias halófilas moderadas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos. Constituyen una importante

alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas. Esto sucede, por ejemplo, en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas (Oren et al., 1993).

Las investigaciones realizadas por la FAO en el 2002 concluyeron que la agricultura enfrenta problemas muy serios como es la presencia de sodio y condiciones salinas en los suelos, interfiriendo en el crecimiento adecuado de la mayoría de los cultivos. La FAO y la UNESCO calculan que el área total de suelos salinos en el mundo es de 397 millones de hectáreas y los suelos sódicos corresponden a 434 millones de hectáreas. (Sanchez y Arguello, 2006)

La recuperación de los suelos sódicos se ha hecho principalmente cambiando el sodio en complejo coloidal por otro catión, aplicando principalmente sales solubles de calcio ó sales de calcio con baja solubilidad (cal agrícola), siendo esta una opción costosa, pero mediante pruebas hechas en el año 2006 se planteó la alternativa en la cual algunas bacterias halófilas con capacidad de capturar sodio *in vitro* se utilizarían en un biorreactor para la bioremediación de suelos sódicos y salinos, formando un consorcio entre bacterias autóctonas y bacterias a las cuales se les ha comprobado su capacidad de capturar sodio (Sánchez y Arguello, 2006).

En el mismo año se desarrollaron procesos para el tratamiento biológico eficiente de ecosistemas contaminados con productos del petróleo en presencia de sal (Betancur et al., 2006).

e) Alimentos Fermentados

Las bacterias halófilas moderadas también tienen diversas aplicaciones en el campo de la alimentación. Así en la elaboración de la salsa de soya intervienen determinadas especies del género *Tetragenococcus*. Los granos de trigo y soya se resuspenden en agua con NaCl al 19% y se dejan durante 9 meses en oscuridad. *T. halophila* se emplea como indicador de la fermentación, pudiendo alcanzar una

densidad de 10^8 UFC/ml en la salsa de soya, que contiene una concentración aproximadamente 3M de NaCl (Röling y Van Verseveld, 1996).

f) Otros usos potenciales

Además de los usos citados anteriormente, existe un amplio grado de posibles aplicaciones que aún están siendo objeto de estudio, pues es obvio que existe un gran potencial biotecnológico. Algunas de estas aplicaciones ya están en el mercado otras están en estudio, otras a escala piloto o ya en desarrollo. Lo único que cabe esperar es un futuro muy prometedor (Meseguer, 2004).

1.5. AMBIENTES SALINOS

Ambiente extremo es aquel que presenta valores extremos de determinados parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH, presión hidrostática, potencial redox, actividad del agua, salinidad, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos, condiciones inusuales poco favorables o letales para la mayoría de organismos. Los organismos que toleran e incluso requieren para su desarrollo estas condiciones se los denomina organismos extremófilos (Ventosa y Nieto, 1995).

Los ambientes hipersalinos están distribuidos globalmente y son muy estudiados en biogeoquímica (Spear et al., 2003). Estos se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de sal y más de un alto contenido de iones (factor que le atribuye la característica de ser un ambiente inhóspito para la mayoría de los microorganismos), características ambientales peculiares tales como elevadas o muy bajas temperaturas, elevados valores de pH o bajas concentraciones de oxígeno. Los suelos salinos están extendidos por todo el mundo y son aquellos que presentan una concentración superior al 0.2 % de sales solubles. Se ha revelado la presencia de una diversidad de microorganismos que logran desarrollarse y vivir en estas condiciones extremas. Dentro de los hábitats hipersalinos formados en suelos, se encuentran los desiertos de sal que están distribuidos en el mundo, en estos lugares la evaporación del agua es predominantes sobre las precipitaciones (Narváez, 2007).

Los ambientes salinos acuáticos se caracterizan por tener una concentración de sales inorgánicas más elevada que el agua de mar, que corresponde aproximadamente a un 3.5 % de sales. En base al origen y naturaleza de las sales presentes se clasifican a las aguas salinas en talasosalinas y atalosalinas. Las aguas talasosalinas tienen origen marino y poseen una composición salina similar a la del agua de mar, como las lagunas costeras hipersalinas, que se encuentran distribuidas por las zonas cálidas del mundo. En las salinas la evaporación del agua permite la concentración de las sales, manteniendo proporciones relativas muy similares a las que se presentan en el mar. Las salinas a más elevada concentración de sales, presentan más características como estar sometidas a irradiación solar, a oscilaciones de temperaturas entre el día y la noche y poseer un bajo contenido de oxígeno, ya que su solubilidad en estos medios tan concentrados es mínima. Una excepción dentro de este tipo de aguas talasosalinas la representa el Gran Lago Salado, en Utah (Estados Unidos) ya que no siendo su origen marino, mantiene una composición química similar a la del agua de mar. Las aguas atalosalinas son aquellas formadas por disoluciones de depósitos minerales de origen continental, como los lagos salados naturales, cuya concentración salina no se asemeja a la del agua de mar, los cationes predominantes en estas aguas son cationes divalentes como el Ca^+ y el Mg^+ . La composición iónica de estas aguas puede variar en función de las características topográficas, geológicas o climatológicas a las que estén sometidas. Las aguas atalosalinas se encuentran en el Mar Muerto, en algunos lagos hipersalinos de la Antártida, los lagos Wadi Natru en Egipto, el lago Magadi en Kenia, entre otros (Narváez, 2007).

1.5.1. MEJIA

La información proporcionada por el SERNANP indica que el distrito de Mejía se encuentra localizado dentro de la provincia de Islay, que se integra a la región de Arequipa, tal como se observa en la Figura N° 5. Este distrito fue creado mediante Ley Regional N° 8 el 27 de enero de 1920. Mejía abarca una extensión territorial de 100.78 Km^2 . Con una Latitud de 17.0983 y Longitud de 71.9058 y se encuentra a una Altitud de 23 msnm.



Figura N° 5. Ubicación Distrito de Mejía

1.5.2. SANTUARIO LAGUNAS DE MEJIA

El Santuario Nacional Lagunas de Mejía (Figura N°6) se estableció el 24 de febrero de 1984, mediante Decreto Supremo N° 015-84-AG. Está situado en la costa de Arequipa, con una extensión de 690.6 Ha de humedales en la desembocadura del río Tambo; reviste enorme interés por ser una de la estaciones para aves migratorias más importantes en toda la costa peruana. En el Santuario es posible encontrar 141 especies de aves, de las cuales 84 son residentes de la costa peruana y 57 , migratorias, o sea que se las encuentra en esta zona sólo en una determinada época del año, en su afán de escapar del crudo invierno de otras latitudes. De las migratorias, 17 llegan a Mejía de otras partes del Perú, 4 de otros países de Sudamérica y 34 desde América del Norte (SERNANP, 2015).



Figura N° 6. Lagunas de Mejía

El Plan Maestro del Santuario Nacional de Lagunas de Mejía indica que las lagunas sufren un impacto permanente por contaminantes provenientes de la agricultura aledaña, principalmente por agroquímicos, residuos sólidos de sedimentos que pueden ingresar por filtración, así como de manera superficial cuando la disponibilidad hídrica es alta (SERNANP, 2015).

Ubicación y Geografía

Está ubicado en la costa del Pacífico sur del Perú, en el departamento de Arequipa, en los distritos de Mejía, Deán Valdivia y en una pequeña porción de Punta Bombón, a escasos metros de la línea de marea del Océano Pacífico (Figura N° 7). Su área de influencia abarca diferentes tipos de hábitats: pantanos, fangales salinos, totorales, monte ribereño, gramadales y vastas playas arenosas. Este complejo de hábitats reunidos en un área pequeña (690.6 hectáreas), conforma uno de los humedales más importantes de la costa occidental de Sudamérica, el mismo que alberga un elevado número de especies de aves residentes y migratorias, así como otras muestras de fauna, flora y micro flora característica de los humedales (SERNANP, 2015).

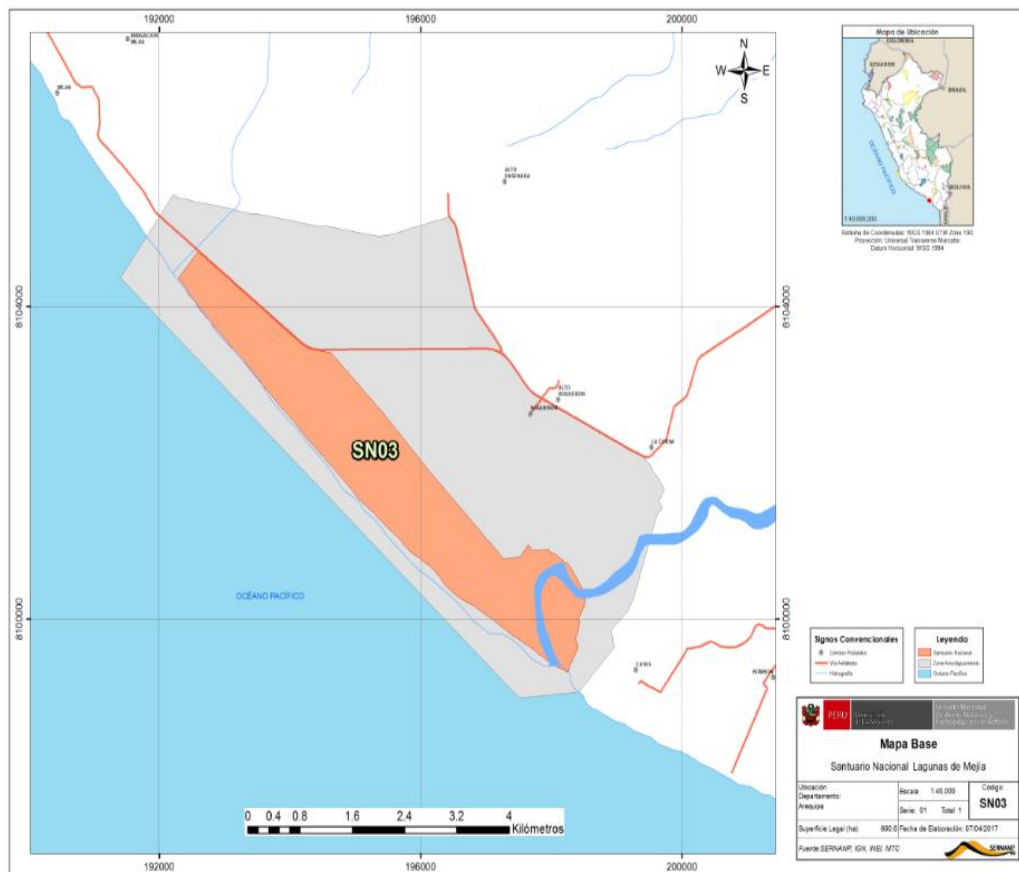


Figura N° 7. Área total del Santuario de Mejía

Clima

A pesar de su relativa cercanía a la línea ecuatorial, el área donde se localiza el Santuario Nacional Lagunas de Mejía cuenta con una temperatura media anual baja. Según la estación meteorológica más cercana (Mollendo), la temperatura media anual es de 19,8°C y la precipitación total promedio anual es de 10,8 mm. Esto se debe en gran medida a la influencia de la Corriente Peruana o de Humboldt, de aguas frías marinas, cuya presencia también impide la formación de lluvias, haciendo que esta parte del litoral sea una zona extremadamente desértica desde el departamento de Ica en Perú hasta La Serena en Chile. Las precipitaciones en el área son escasas, presentándose comúnmente las denominadas garúas producto de las neblinas invernales. El clima del lugar es propio de la zona de vida desierto seco - Templado Cálido o desierto superárido - Templado Cálido, caracterizado por ser extremadamente árido. Debido a la escasez de precipitaciones o la ausencia total de éstas, algunos años son hidrológicamente secos (SERNANP, 2015).

Lagunas

En ambos márgenes de la boca del río Tambo hay lagunas de dimensiones variables y probablemente de diferentes orígenes.

Las lagunas situadas en el sector norte de la desembocadura del río, el sistema de lagunas Iberia y Mejía, son en realidad afloramientos de agua de retorno de irrigaciones localizadas en las Pampas de Iberia. El agua que origina estas lagunas proviene de las filtraciones y flujos superficiales de la Irrigación Ensenada-Mejía-Mollendo, que data del año 1942. La Irrigación Iberia (Pampas de Iberia) influye en la laguna Iberia por efecto de filtraciones y escorrentías superficiales. El río Tambo además constituye una fuente importante de agua para las lagunas de Boquerón en vista que en su período de mayor descarga (diciembre a abril) parte de sus aguas inundan la zona baja del Boquerón alimentando las lagunas allí presentes. Esto se constata en las lagunas del sur del santuario por la presencia de aguas turbias cargadas de sedimentos. Adicionalmente, se sabe que estas lagunas reciben agua proveniente de la napa freática de la cuenca (SERNANP, 2015).

1.6. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, permite identificar distintos microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no (Benavides y Hermida, 2008).

1.6.1. Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Este método de diferenciación permite evidenciar la descarboxilación del aminoácido lisina, la desaminación del mismo y la producción de ácido sulfhídrico. Las reacciones anteriores se ponen de manifiesto mediante el viraje del indicador púrpura de bromocresol; y la formación del sulfuro de hidrógeno a partir del tiosulfato sódico, se manifiesta por la formación del sulfuro ferroso. Este medio es utilizado para la diferenciación de microorganismos en base a su capacidad para desaminar o descarboxilar la lisina y de producir sulfuro de hidrógeno (Forbes et al., 2009).

1.6.2. Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP)

Medio utilizado para la realización del ensayo de Rojo de Metilo y Voges Proskauer es particularmente útil para la clasificación de enterobacterias. En el medio de cultivo, la pluripeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol). Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros. Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo (Winn et al., 2008).

1.6.3. Prueba Indol (SIM)

Este medio de cultivo permite comprobar la formación de sulfuro, la producción de indol y observar la movilidad, es decir nos permite medir más de una característica en una sola prueba (Forbes et al., 2009). Este medio contiene polipéptidos ricos en aminoácidos azufrados, principalmente triptófano y además iones ferrosos (Rodríguez et al., 2009). Se evidencia la formación de ácido sulfhídrico por la formación de un precipitado negro. Este resultado se obtiene por la liberación de sulfuro a partir del tiosulfato por acción enzimática de la bacteria, el acoplamiento del sulfuro con el ion hidrogeno para formar gas H_2S , la detección del gas H_2S mediante sales de metales pesados como el hierro, logrando la forma de sulfuro de hierro que es precipitado negro que se formará. Esta prueba permite determinar la habilidad de la bacteria de romper el indol del aminoácido triptófano. Esta división molecular es lograda por una serie de enzimas intracelulares diferentes, un sistema que en conjunto se le llama con frecuencia *triptofanasa* (Forbes et al., 2009).

1.6.4. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)

El agar triple azúcar hierro, conocido por sus siglas del inglés TSI (Triple Sugar Iron), es un medio de gran utilidad en la identificación de bacterias Gram Negativas fermentadoras de carbohidratos. Este medio nos permite reconocer (http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297d2411990.pdf):

- i) bacterias que fermentan solo glucosa,
- ii) bacterias que fermentan además de glucosa, lactosa, sacarosa o ambas,
- iii) bacterias que no fermentan ninguno de los tres azúcares,
- iv) determinar la producción de gas producto de la fermentación de los azúcares,
- v) determinar la aparición de H_2S , producto de la reducción del Tiosulfato incorporado al medio de cultivo y
- vi) obtener el inóculo para la detección de beta galactosidasa en la prueba de hidrólisis de orto-nitro-fenil-galactósido (ONPG).

1.6.5. Citrato de Simmons

Medio utilizado para determinar la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. En el medio de cultivo, el Fosfato Monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el Citrato de Sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El Cloruro de Sodio mantiene el balance osmótico, y el Azul de Bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de Citrato Permeasa, a través del ciclo del Ácido Tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos, el medio entonces vira a azul y ésto es indicativo de la producción de Citrato Permeasa (Winn et al., 2008).

1.6.6. Prueba de la Catalasa

La Catalasa es una enzima hemoproteica, que se caracteriza por poseer una estructura tetramérica, en la cual cada subunidad contiene un grupo Hemo (Fe^{+3}). Está presente en la mayoría de las bacterias aerobias estrictas, facultativas y anaerobias aerotolerantes. La catalasa manifiesta actividad de peroxidasa, cataliza la oxidación de sustratos acoplada a la reducción de Peróxido de Hidrógeno, para formar agua y oxígeno molecular. En la prueba catalasa la reacción se efectúa con dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una de las cuales actúa como sustrato reducido y la otra como donador de átomos de hidrógeno; esto resulta en la formación de agua (sustrato reducido) y oxígeno (donador oxidado). El Peróxido de Hidrógeno es muy tóxico para las bacterias. Generalmente los microorganismos que carecen de citocromos, también carecen de catalasa, así la mayoría de las bacterias anaerobias no la poseen. Se utiliza en la diferenciación de *Streptococcus* (-), de *Staphylococcus* (+) y *Bacillus* (+), *Clostridium* (-). (http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/205_insert)

1.6.7. Prueba de la Oxidasa

La citocromo oxidasa participa en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de ciertas bacterias. La prueba se utiliza en un principio para establecer la diferenciación entre grupos de bacterias gram negativas (Winn et al., 2008).

1.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS

Hasta la aparición de los métodos de biología molecular, la forma de identificar microorganismos se basaba entre caracteres morfológicos, fisiológicos (necesidad de nutrientes) y estructurales (diferencias entre lípidos de membranas). Este método es poco confiable debido a la dificultad para comparar cepas recién aisladas con cepas anteriormente aisladas y bien caracterizadas. Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han establecido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos (Clarridge, 2004).

La secuenciación genética es uno de los métodos más eficientes dado que se puede solo amplificar por PCR el gen ribosomal 16S, separar las bandas amplificadas, secuenciar o mandar secuenciar las bandas encontradas, posteriormente comparar esas secuencias con las secuencias depositadas en los bancos de genes y poder llegar a identificar el o los microorganismos presentes en una muestra. En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador housekeeping o Gen Constitutivo está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia (Muyzer, 1999).

Las metodologías basadas en la amplificación y análisis de la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S, son las más exitosas para estudiar la diversidad microbiana. La comparación de las secuencias del ARNr 16S, ha facilitado grandemente la identificación de bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004).

1.7.1. CARACTERÍSTICAS DEL ARNr 16S

El ARNr 16S es un polirribonucleótido a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los procariontes. La conservación del gen ARNr 16S se observó por primera vez en el género *Bacillus*. De distribución universal y componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. Se caracteriza por la presencia de regiones variables especie-específicas. De igual forma se puede utilizar el término ARNr 16S o la del gen codificante ADNr 16S, pero la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) recomienda la utilización del primero. La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1550 pb, y se compone de 9 zonas variables V1-V9 y zonas conservadas (Figura

8). Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo inter-específico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas. Los cebadores universales elegidos son complementarios a las zonas conservadas del inicio del gen, en la zona de 540 pb, y al final del gen. Las zonas variables, comprendidas entre estas zonas conservadas son las regiones utilizadas para realizar una taxonomía comparativa (Fernández et al., 2010).

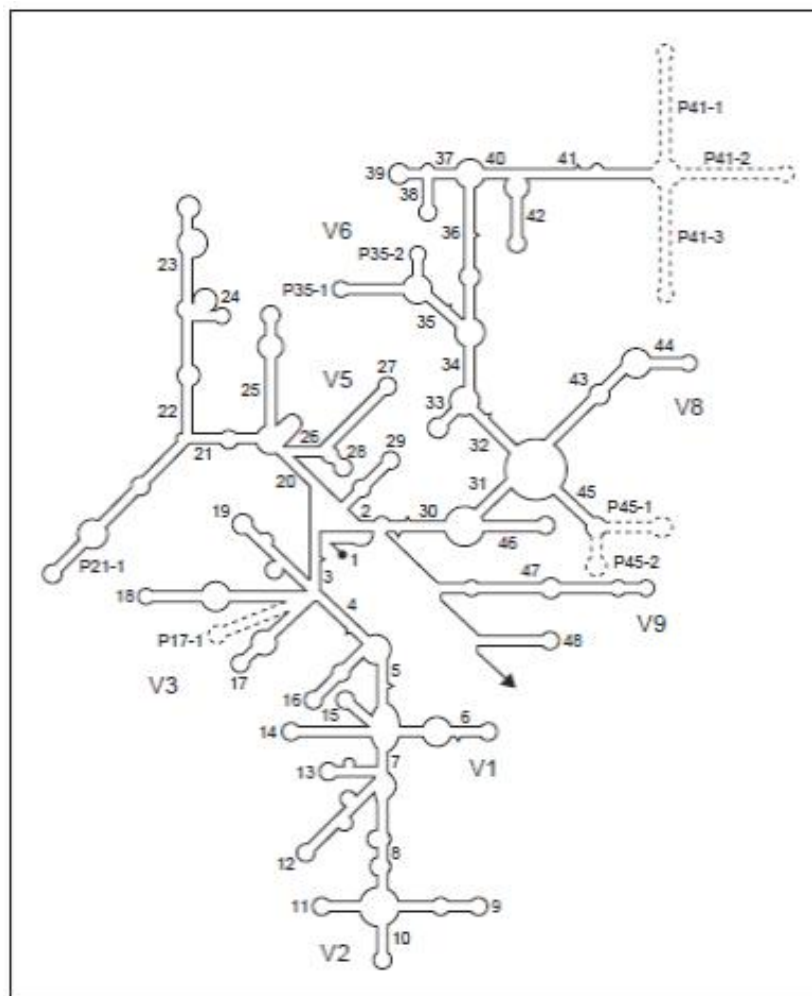


Figura N° 8. Estructura secundaria del ARNr 16S.

Las hélices, comunes a todos los seres vivos y denominadas hélices universales, se numeran de la 1 a la 48 en orden de aparición a partir del extremo 5. Las hélices específicas de procariotas se indican con Pa-b, donde a es el número de la hélice universal precedente y b el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en negrilla. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras (Rodicio y Mendoza, 2004).

El ARNr 16S presenta características que la hacen la macromolécula más utilizada actualmente para identificar micro-organismos. Las principales características según Weisburg et al. (1991) son:

- Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas. Su tamaño es lo bastante largo, con polimorfismos interespecíficos suficientes para realizar mediciones estadísticas válidas y poder diferenciar microorganismos. El ARNr 5S es de apenas 120 pares de bases (pb) por tanto no brinda información suficiente, en cambio el ARNr 16S es de 1550 pb de largo y es además menos extenso que el ARNr 23S que tiene 3000 pb.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso. Contiene regiones variables y otras altamente conservadas, tanto en su estructura primaria como secundaria. Las secuencias nucleotídicas constantes del ARNr 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de las sondas de oligonucleótidos complementarias.
- Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento. Se han determinado las secuencias de ARNr 16S para un gran número de cepas. El Genbank, la base de datos de secuencias de nucleótidos más grande, tiene más de 20 millones de secuencias de las cuales más de 90000 son del gen de ARNr 16S. Esto significa que hay muchas secuencias previamente almacenadas con las que se puede comparar las secuencias de cepas no conocidas.

1.7.2. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ARNr 16S

En la década de los ochenta los estudios de Carl Woese demostraron que todos los organismos pueden ser identificados y clasificados mediante el análisis comparativo de sus secuencias de ARNr 16S. La utilización combinada de diferentes técnicas moleculares basadas en el ARNr 16S ha permitido identificar microorganismos presentes en la naturaleza. Estas metodologías utilizan sondas de ácidos nucleicos específicas (complementarias) al gen que codifica al ARNr de la subunidad menor y permiten amplificarlo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Herrera, 2002).

Después de la PCR el segmento amplificado es secuenciado. La secuenciación ha demostrado ser uno de los métodos más útiles para identificar microorganismos. El mayor atractivo de esta técnica se basa en que los caracteres analizados (nucleótidos) son las unidades básicas de información. Las secuencias nucleotídicas deben ser primero alineadas para luego realizar una comparación estadística contra las secuencias ya publicadas. Así mismo, existe un gran número de métodos y programas computacionales que se encuentran disponibles para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas y elaboración de dendrogramas, en los que se indique la posición del nuevo microorganismo recién identificado (Rodicio y Mendoza, 2004).

1.7.3. APLICACIÓN DE LA BIOINFORMÁTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

1.7.3.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Según la definición del National Center for Biotechnology Information (NCBI), la bioinformática es un campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas tales como: biología, computación y tecnología de la información. El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas (desconocidas) con las bien-estudiadas y anotadas (conocidas) secuencias. Este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas, y la formación y la comparación del genoma (Meneses et al., 2011).

Mediante el análisis bioinformático, las secuencias de ARNr 16S obtenidas por secuenciación, son alineadas y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos disponibles, utilizando herramientas como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). El alineamiento es una herramienta cualitativa que permite dar los primeros pasos hacia la conclusión de que dos o más secuencias son homólogas y consiste en hacer coincidir las secuencias en aquellas regiones en las que se repitan el mayor número de monómeros (caracteres) posibles. Esta técnica aparentemente sencilla se hace más compleja en la medida en que el tamaño de las secuencias a comparar es mayor y más aún cuando se comparan más de dos secuencias (Kumar y Filipski, 2001).

1.7.3.2. BASE DE DATOS

Las bases de datos más relevantes en biología incluyen datos de secuencias de nucleótidos, proteínas, estructura de proteínas, genomas, expresión genética, bibliografía, taxonomía, metabolismo, factores de transcripción, etc. Principales bases de datos de secuencias de nucleótidos:

- **NCBI (EEUU) GenBank** – National Center of biotechnology Information, localizada en Washington DC. Estados Unidos.
Fundado el 4 de noviembre de 1988, y ubicado en Bethesda, Maryland, el *National Center for Biotechnology Information* es una división de la *National Library of Medicine*, uno de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Como recurso nacional de información sobre biología molecular y uno de los más poderosos en las llamadas ciencias de la vida en general, el centro desarrolla constantemente nuevas tecnologías de información para ayudar a comprender, tanto los procesos genéticos, como moleculares que controlan la salud y la enfermedad. El NCBI agrupa sus bases de datos esenciales en tres grandes sectores: Literature Databases, Molecular Databases y Genomes. Estas dos últimas clases comprenden un grupo amplio y diverso de bases de datos biológicas cuya información procede básicamente de los resultados de experimentos científicos, suministrados directamente por los laboratorios o instituciones que los realizan o publicados en la literatura científica especializada, donde con frecuencia se aplican tecnologías de experimentación de muy alto rendimiento y el análisis computacional. La información contenida en estas bases de datos comprende: funciones, estructura y

localización (tanto celular como cromosómica) de los genes, los efectos clínicos de las mutaciones, así como las similitudes entre secuencias y estructuras biológicas.

La plataforma está estructurada de acuerdo a Cañedo et al. (2009) de la siguiente manera:

Su **DATABASES** comprende cuatro grandes bases de datos:

- PubMed
- PubMed Central
- OMIM
- Books

Su **MOLECULAR DATABASES** se divide en seis clases principales las que se subdividen también en partes:

- **NUCLEOTIDE SEQUENCES**
 - Nucleotides
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>]
 - dbSNP (Single Nucleotide Polymorphisms)
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>]
 - Probe [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=probe>]
 - UniSTS (Sequence Tagged Sites)
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>]
 - PopSet (Evolutionary Relatedness)
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PopSet>]

También existen subconjuntos de secuencias, entre los que se destacan:

- GenBank
- RefSeq -Reference Sequences
- dbEST (Expressed Sequence Tags)
- dbGSS (Sequence Tagged Sites)
- dbSTS (Sequence Tagged Sites)

- **PROTEINS SEQUENCES**
Abarca bases de datos como:
 - Proteins
 - CDD (Conserved Domain Database)

- **STRUCTURES**
Incluye bases de datos como:
 - MMDB (Molecular Modeling Database)
 - 3D
 - PubChem
 - PubChem
 - PubChem BioAssay

- **GENES**
Contiene bases de datos como:
 - Gene
 - UniGene
 - HomoloGene

- **GENE EXPRESSION**
Comprende bases de datos como:
 - Entrez GEO Profiles
 - Entrez Gene DataSets
 - GENSAT

- **TAXONOMY**
Incluye:
 - Entrez Taxonomy

GENOMES El tercer sector ofrece, entre otros recursos:

- Cancer Chromosomes
- dbGaP (Genotypes and Phenotypes)

- **EMBL** (Europa) European Molecular Biology Laboratory, localizada en Hixton, Inglaterra.

Fundado en 1974, EMBL es el laboratorio insignia de Europa para las ciencias de la vida, una organización intergubernamental con más de 80 grupos de investigación independientes que cubren el espectro de la biología molecular. Opera en seis sitios: Heidelberg, Barcelona, Hamburgo, Grenoble, Roma y EMBL-EBI Hinxton. Los servicios más utilizados por EMBL son las diversas bases de datos biológicas construidas, organizadas y administradas por el Instituto Europeo de Bioinformática en Hinxton. Muchos millones de usuarios diferentes consultan estas bases de datos cada año, buscando información sobre cualquier cosa, desde secuencias de ADN, estructuras de proteínas, perfiles de expresión genética, polimorfismo genético humano o incluso análisis comparativos de genomas completos. En dos de sus sitios, Hamburgo y Grenoble, EMBL proporciona acceso a las principales fuentes de radiación de rayos X y neutrones, a cientos de usuarios de la comunidad de biología estructural por año. Como las tecnologías permiten a los biólogos seguir los eventos moleculares dentro de las células, o incluso los organismos, en tiempo real, la Instalación Avanzada de Microscopía Ligera (ALMF) de EMBL en Heidelberg es el centro de una serie de eventos en Europa, a los que los biólogos pueden acceder para aprender y utilizar la técnica actual más apropiada para abordar su problema experimental específico. Otras instalaciones más pequeñas incluyen aquellas dedicadas a la espectrometría de masas, tecnologías de micromatrices, microscopía electrónica, secuenciación de ADN y producción de proteínas (<https://www.embl.de>).

- **DDBJ** (Japón) DNA DataBank of Japan, localizada en Mishima, Japón.

El banco de datos de ADN de Japón (DDBJ) es una base de datos biológica que recopila secuencias de ADN. Se encuentra en el Instituto Nacional de Genética (NIG) en la prefectura de Shizuoka de Japón. También es miembro del International Nucleotide Sequence Database Collaboration o INSDC. Intercambia sus datos con el Laboratorio Europeo de Biología Molecular en el Instituto Europeo de Bioinformática y con GenBank en el Centro Nacional de Información

Bioteconológica a diario. Por lo tanto, estos tres bancos de datos contienen los mismos datos en cualquier momento dado.

DDBJ comenzó las actividades de banco de datos en 1986 en NIG y sigue siendo el único banco de datos de secuencia de nucleótidos en Asia. Aunque DDBJ recibe principalmente sus datos de investigadores japoneses, puede aceptar datos de contribuyentes de cualquier otro país. DDBJ es financiado principalmente por el Ministerio japonés de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología (MEXT). DDBJ tiene un comité consultivo internacional que consta de nueve miembros, 3 miembros cada uno de Europa, EE. UU. Y Japón. Este comité asesora a DDBJ sobre su mantenimiento, administración y planes futuros una vez al año. Además de esto, DDBJ también cuenta con un comité de colaboración internacional que asesora sobre diversos asuntos técnicos relacionados y se compone de participantes de alto nivel (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>).

Basic Local Alignment SearchTool (BLAST): Es un algoritmo para comparar secuencias biológicas como las secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas o las secuencias de ADN. Una búsqueda de BLAST permite comparar una secuencia desconocida con una base de datos de secuencias e identificar las secuencias en la base de datos que se parecen a la secuencia no conocida empleando un alineamiento local, el cual busca determinar pequeñas regiones de secuencias consenso. Este alineamiento es más efectivo que el alineamiento global porque hace coincidir las secuencias en el mayor número de caracteres. Desde el punto de vista los resultados que proporciona BLAST son secuencias que producen alineamientos significativos (Altschul et al., 1997).

Clustal W: Es el sistema más ampliamente utilizado para alineamiento de secuencias de ADN o proteína. Para realizar alineamientos múltiples, ClustalW utiliza métodos de alineamiento progresivo; en estos métodos las secuencias más similares, es decir, aquellas con mejores scores de alineamiento, son alineadas primero. Luego progresivamente los grupos más distantes de secuencias son alineados hasta que se obtiene un alineamiento global (Thompson et al., 1997).

1.7.3.3. ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

El análisis filogenético de ADN o de secuencias de proteínas se ha vuelto una de las importantes herramientas para estudiar la historia de la evolución de los organismos desde bacterias hasta humanos, pudiendo estudiar las relaciones evolutivas entre especies y la clasificación de estos organismos en familia, género o especie. El análisis filogenético además es importante porque nos ayuda a entender el proceso de la evolución adaptativo a nivel molecular (Jermann et al., 1995).

Para construir un árbol filogenético se usa métodos estadísticos y a medida que pasan los años han ido apareciendo nuevos métodos. Estos métodos nos ayudan a encontrar el mejor árbol filogenético, entre estos métodos podemos mencionar al método del vecino más próximo o Neighbor-joining, método basado en la evolución mínima donde se busca los árboles con la menor suma de todas sus ramas, con este método se obtiene un árbol no enraizado y aditivo en el que la longitud de sus ramas indica cambio evolutivo. Otro método utilizado es el método de Máxima Parsimonia, este método tiene como objetivo la búsqueda e identificación de un posible árbol filogenético que requiera el menor número de eventos evolutivos para dar explicación a los procesos o fenómenos observados. Esta idea fue extraída de la argumentación filosófica de la navaja de Ockham de Guillermo de Ockham en la que defiende que si se parte de dos o más hipótesis que dan lugar a explicaciones igual de válidas para un acontecimiento dado, la hipótesis más simple tiene mayor probabilidad de ser la correcta para explicar el fenómeno (Peña, 2011).

1.8. CAPACIDAD DE BACTERIAS HALÓFILAS DE CAPTAR NaCl IN VITRO

La mayoría de las bacterias halófilas desarrolla una adaptación llamada osmoregulación; la cual se resume como la síntesis de osmolitos (glutamina, prolina y glicina betaína). La minoría ha evolucionado para acumular solutos inorgánicos que se encuentran en el ambiente (Na^+ , K^+ y Mg^{2+}). Asimismo, la morfología frecuentemente se halla ligeramente modificada. Las células consiguen el equilibrio osmótico manteniendo la concentración de sales intracelular similar a la exterior. El citoplasma se halla a merced de fuerzas iónicas, por lo que ha padecido adaptaciones estructurales, que consisten en 21 sustituciones de aminoácidos y disminución de los residuos hidrofóbicos (Placy et al., 1974). Sin embargo, no se han reportado modificaciones estructurales radicales en las bacterias halófilas; así

como los cambios sustanciales en las propiedades celulares solo ocurren por encima de 2 M de NaCl equivalente. La actividad de las bacterias halófilas involucra degradación de materia orgánica, fijación de nitrógeno y producción de metabolitos (Castillo y Carvajal, 2011).

Las Bacterias halófilas tienen la capacidad de capturar iones de sodio y para evaluar esta captura in vitro, se mide la conductividad, que permite calcular la capacidad de una disolución de conducir corriente eléctrica. La conductividad mide la concentración iónica total que tiene la disolución (Engel y Reid, 2007). La variación en la cantidad de cationes influye directamente en la conductividad eléctrica ya que una disminución en la conductividad eléctrica implica una disminución de las sales (Pernasetti, 2010).

1.8.1. Métodos para la medición de salinidad

La salinidad es una propiedad importante de aguas usadas industriales y de cuerpos de agua naturales. Originalmente este parámetro se concibió como una medida de la cantidad total de sales disueltas en un volumen determinado de agua. Dado que la determinación del contenido total de sales requiere de análisis químicos que consumen mucho tiempo, se utilizan en substitución métodos indirectos para estimar la salinidad. Se puede determinar la salinidad de un cuerpo de agua a base de determinaciones de: conductividad, densidad, índice de refracción o velocidad del sonido en agua (APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1992).

Para medir la salinidad existen 3 métodos más conocidos:

Método del refractómetro:

Los refractómetros miden qué cantidad de luz se dobla o se refracta cuando pasa a través de un líquido. Entre más sales y otros materiales estén disueltos en el agua, más resistencia a la luz habrá y más se doblará. Los diferentes líquidos retraen la luz en cantidades distintas, así que para medir la salinidad exactamente (u otros contenidos de sólidos) se debe usar un refractómetro designado específicamente para el líquido que se quiera medir. Si el líquido no está mencionado específicamente en el empaque, el refractómetro probablemente fue fabricado para medir agua salada (<https://es.wikihow.com/medir-la-salinidad>).

Los refractómetros de sal se usan para medir el cloruro de sodio disuelto en el agua. Los refractómetros de agua de mar se usan para medir la mezcla de sales que se encuentra en el agua de mar o en acuarios de agua salada.

Los refractómetros están también diseñados para compensar la expansión de un material específico debido a los cambios de temperatura. (<http://reefkeeping.com/issues/2006-12/rhf/>).

Método del Hidrómetro:

Un hidrómetro mide la "gravedad específica" del agua o su densidad comparada con el H₂O pura. Debido a que la mayoría de los tipos de sales son más densas que el agua, un hidrómetro puede medir qué tanta sal hay presente. Es lo suficientemente exacto para la mayoría de propósitos, como la medición de salinidad en un acuario, sin embargo, muchos modelos de hidrómetros son inexactos o usados de una manera errónea. Este método no puede usarse con materiales sólidos (Holmes – Farley, 2002).

Los hidrómetros, también conocidos como "medidores de la gravedad específica" se presentan en diferentes diseños básicos. Los de vidrio que flotan en el agua son más exactos que los otros diseños, pero a menudo no cuentan con un listado de medidas precisas (un conteo decimal más largo). Los plásticos de "brazo" pueden ser más baratos y robustos, pero tienden a ser menos exactos con el tiempo (Hemdal, 2006).

Método del Conductímetro:

Es un método analítico basado en la conducción eléctrica de los iones en solución, que se utiliza para medir la molaridad de una disolución, determinada por su carga iónica o salina, de gran movilidad entre dos puntos de diferente potencial. La conductividad eléctrica es un fenómeno de transporte en el cual la carga eléctrica (en forma de electrones o iones) se mueve a través de un sistema (Tipler, 2004).

Se usa para medir la salinidad del suelo o del agua. Un potenciómetro eléctrico o medidor de EC (conductímetro), es el aparato más común que puede usarse para medir la salinidad del suelo. También puede usarse para medir la salinidad del agua pero uno de alta calidad

puede ser significativamente más caro que un refractómetro o hidrómetro
(<http://www.fao.org/ag/tsunami/docs/saltwater-guide.pdf>).



CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

2.1.1. Identificar la zona de muestreo

Para determinar la ubicación exacta de cada zona de muestreo se utilizó el Sistema de Posicionamiento Satelital (GPS – GARMIN, Modelo OREGON 750) para ubicar tres puntos de muestreo que sean representativos de la población bacteriana (Villota, 2014) de las Lagunas de Mejía.

2.1.2. Toma de muestra de agua en las Lagunas de Mejía

Se siguió el protocolo propuesto por Castro et al. (2011). Se tomaron 3 repeticiones de muestras del cuerpo de agua en frascos de vidrio estériles de 250 mL y a 30 cm de profundidad y se taparon herméticamente. Las muestras se colocaron en un cooler a 5°C y se transportaron hacia el laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa para su inmediato procesamiento.

Para el estudio, las repeticiones se mezclaron entre sí, para obtener una muestra homogenizada y representativa del sitio (Villota, 2014).

2.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALOFILAS

Para el aislamiento de bacterias se utilizó la metodología propuesta por Villota (2014): Se realizó una siembra directa tomando 150 uL de la muestra homogenizada de agua y se sembró en placas con Medio de Aislamiento para Bacterias Halofílicas (Quesada et al., 1982), cuya composición se detalla en la Tabla N°4.

Tabla N° 4. Medio de Aislamiento de Bacterias Halófilas (Quesada et al., 1982)

Medio de Aislamiento de Bacterias Halófilas	
Reactivo	g/L
NaCl	158.9
MgCl ₂	13.8
MgSO ₄	20.9
CaCl ₂	1.5
KCl	4.2
NaHCO ₃	0.2
BrNa	0.5
Extracto de Levadura	10.0
Proteosa Peptona	5.0
Glucosa	1.0
Agar	14.0

Ajustar a pH 7.5 con KOH

Se dejó incubar a 37°C por un periodo de 48 horas (Villota, 2014).

Las colonias obtenidas fueron codificadas con la letra “H” que significa Halófilas, seguida de un número de acuerdo al orden del 1 al 6.

2.2.1. Acondicionamiento de las bacterias halófilas (límite de crecimiento en NaCl)

Se realizó por la técnica de estriado. Se tomaron las cepas aisladas anteriormente y se sembraron directamente con un asa esterilizada en placas con medio de Bacterias Halófilas (Quesada et al., 1982) con concentraciones de 15.89, 20.89 y 25.89 % de NaCl. Se dejaron incubar a una temperatura de 37°C por un periodo de 48 horas (Villota, 2014).

2.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BACTERIAS HALÓFILAS

Para la caracterización morfológica de las bacterias se siguió el protocolo de Benavides y Hermida (2008). Después de establecer el medio para las cepas, estas fueron repicadas e incubadas a 37°C por 48 horas. Cada colonia de bacteria fue sometida a la coloración de Gram. Las muestras fueron observadas al microscopio óptico (Optika B-150) a 100X, ocular 10X con aceite de inmersión.

2.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS HALÓFILAS

La capacidad enzimática y/o producción de algún metabolito por parte de los microorganismos, se evaluó empleando diferentes medios de cultivo. Todos los medios se prepararon según las indicaciones de los fabricantes y se esterilizaron a 121°C / 15psi / 15 minutos (Castro et al., 2011).

Para determinar el metabolismo de las bacterias aisladas se consideraron las siguientes pruebas bioquímicas (Benavides y Hermida, 2008):

- 1) Agar de hierro y triple azúcar (TSI),
- 2) Agar de hierro y lisina (LIA),
- 3) Citrato de Simmons,
- 4) Prueba del indol (SIM),
- 5) Rojo de metilo-Voges Proskauer (MRVP),
- 6) Prueba de Catalasa y
- 7) Prueba de Oxidasa

2.4.1. Prueba TSI

Según Jave (2007) con un asa en punta se coge una colonia de un cultivo y se inoculara en el tubo (12 x 75 mm) de pico de flauta (realizar una punción y una estría). Incubar a 37 °C por 24 horas.

K/K = Microorganismo no fermentador (no hay cambio en el medio).

K/A = Microorganismo no fermentador de lactosa (color rojo en el pico y en el fondo).

A/A = Microorganismo fermentador de lactosa y glucosa (color amarillo en el pico y en el fondo).

2.4.2. Prueba LIA

Jave (2007) indica que con un asa en punta se coge una colonia de un cultivo y se inocula en el tubo (12 x 75 mm) haciendo 3 punciones y 1 una estría, luego incubar a 37 °C por 24 horas.

K/K = Lisina positiva (color azul púrpura en pico y fondo).

R/A = Lisina negativa (color rojo vino en pico y amarillo en fondo).

2.4.3. Prueba Citrato de Simmons

Para esta prueba usamos el protocolo de Jave (2007), en donde indica que con un asa en punta se coge una colonia de un cultivo y se inocula por estría única en un tubo (12 x 75 mm) cuyo medio está en pico y se deja incubar a 37 °C por 24-48 horas.

La Prueba es positiva si se da un color azul intenso y es negativa si no hay cambio en el medio.

2.4.4. Prueba SIM

Éste protocolo es obtenido de Jave (2007). Con una asa en punta se coge una colonia de un cultivo y se inocula en el tubo (12 x 75 mm) haciendo una punción hasta casi el fondo. Incubar a 37 °C por 18-24 horas. Al finalizar este período añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs por la pared del tubo. Es Indol positivo si se pone de color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el medio y es negativo si no hay cambio en el medio.

2.4.5. Prueba MRVP

a) **Prueba de Rojo de Metilo:** Con un asa en punta se coge una colonia de cada cepa y se inocula en un tubo (12 x 75 mm) de caldo MRVP y se incuba a 37 °C por 24 horas. Finalizado este período añadir 5 gotas de Rojo de Metilo. La prueba es positiva si da un color rojo estable en la superficie y es negativa si da color amarillo (Jave, 2007).

- b) **Prueba de Voges Proskauer:** Se toma un asa en punta, se coge una colonia de un cultivo y se inocula el tubo (12 x 75 mm) de caldo MRVP, incubar a 37 °C por 24 horas. Finalizado este período añadir Alfa Naftol e Hidróxido de Potasio al 40%, agitar el tubo para exponerlo al oxígeno y dejarlo reposar por 10 minutos. La prueba es positiva si da un color rojo, y es negativa si el color del medio se mantiene (Jave, 2007).

2.4.6. Prueba Catalasa

Según Jave (2007), en una lámina portaobjetos se coloca una o dos gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30% y sobre ella se agrega una colonia de los microorganismos a estudiar. La reacción es positiva si se observa la producción de pequeñas burbujas.

2.4.7. Prueba Oxidasa

Se coloca un trozo de papel filtro aproximadamente de 3 x 3 cm en una placa de Petri y se agrega 2-3 gotas del reactivo de Oxidasa en el centro del papel. Se extiende con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado. La reacción es positiva si se produce una coloración violeta a los pocos segundos (Jave, 2007).

2.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS HALÓFILAS

2.5.1. Extracción de ADN genómico de bacterias halófilas

Para la extracción del ADN genómico se siguió el protocolo modificado descrito por Antoraz (2013):

- Con un asa de siembra se tomó 3 colonias de la placa Petri y se colocaron en un tubo eppendorf y fueron resuspendidas en 300 uL de tampón de lisis (lisozima 2 mg/mL, sacarosa 0.3 M, EDTA 25 mM, Tris-HCl 25 mM, RNasa 50 ug/mL pH 8.0), se incubó a 37 °C durante 30 minutos (Baño María MLW, WB2).
- Transcurrido el tiempo se añadió 200 uL de SDS al 5 %, se agitó en vortex mixer (Gemmy Industrial Corp., VM-300) por 15 segundos.

- Se añadió 500 uL de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión 20 veces, a continuación se centrifugó (Ultracentrífuga eppendorf 5415C) a 10000 rpm por 5 minutos.
- El sobrenadante se recolectó en un nuevo eppendorf al cual se le añadió 500 uL de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó (Ultracentrífuga eppendorf 5415C) a 10000 rpm por 5 minutos.
- Se recuperó el sobrenadante y se le añadió 1,5 volumen (750 uL) de isopropanol helado para precipitar el ADN y se centrifugó (Ultracentrífuga eppendorf 5415C) a 10000 rpm por 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó (Ultracentrífuga eppendorf 5415C) a 10000 rpm por 5 minutos.
- Finalmente el pellet se dejó secar y se resuspendió en 30 uL de buffer TE 1X.
- Las muestras se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su utilización.

2.5.2. Determinación de la calidad del ADN extraído

2.5.2.1. Integridad del ADN extraído

Para verificar la integridad del ADN se siguió el protocolo modificado descrito por Antoraz (2013). El ADN extraído se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con Hydragreen (0.5 ug/mL) previa electroforesis (Cámara Electroforética Biometra, PS 300 T) a 80 voltios durante 45 minutos en Buffer TAE 1X.

Para una mejor visualización en el transiluminador UV (Biometra, UVstar 312 nm) se utilizó el filtro para SYBR.

El peso molecular de las bandas de ADN se estimó comparándolos con el marcador de peso molecular Ultra Ranger 1Kb DNA ladder.

2.5.2.2. Pureza del ADN extraído

Para la medición de la pureza del ADN extraído se siguió el protocolo modificado descrito por Antoraz (2013). Se tomó 10 uL de ADN y se resuspendió en 1990 uL de Buffer TE.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro (FARLAB, 1200RS) a 260 nm y 280 nm. Para su evaluación se calculó el índice de pureza y concentración del ADN mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice de Pureza ADN} = \frac{\text{Abs 260 nm}}{\text{Abs 280 nm}}$$

$$\text{Concentración ADN} = \text{Abs 260 nm} \times 50 \frac{\text{ug}}{\text{mL}} \times 200$$

2.5.3. Amplificación del segmento genético ARNr 16S

Para la amplificación del gen ARNr 16S se utilizó el protocolo modificado descrito por Franco (2008). Los primers utilizados fueron: primer forward F1- 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y primer reverse R5- 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT3', los cuales fueron adquiridos en laboratorio Biosynthesis.

En la Tabla N° 5 se muestra la mezcla de reacción para la PCR:

Tabla N° 5. Mezcla de Reacción para PCR

Componentes	Concentración
Green or colorless Buffer (Promega).	1X
Desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP)	0.2 mM
Primer forward (Biosynthesis).	0.1 uM
Primer reverse (Biosynthesis)	0.1 uM
Cloruro de Magnesio (Promega)	4 mM
ADN Polimerasa (GoTaqG2 flexi DNA Polymerase, Promega)	1.25 U
ADN molde	0.5 ug

El volumen final del mix fue de 50 uL. Para el control negativo se utilizó la mezcla de reacción reemplazando el ADN por agua ultrapura.

2.5.3.1. Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la realización de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se siguió el protocolo modificado descrito por Franco (2008). Se utilizó un termociclador (Eppendorf, Pro vapo. protect) con las condiciones de amplificación que se muestran en la Tabla N° 6:

Tabla N° 6. Condiciones de PCR

Etapa		Tiempo	Temperatura
Pre calentamiento inicial (activación de la polimerasa)		2 minutos	96 °C
30 ciclos	Desnaturalización	1 minuto	95 °C
	Anilamiento	45 segundos	55.3 °C
	Extensión	5 minutos	72 °C
Terminación		5 minutos	72 °C

2.5.3.2. Visualización de los productos amplificados por la PCR

Los productos amplificados por la PCR se separaron por electroforesis (Cámara Electroforética Biometra, PS 300 T) en un gel de agarosa al 1 % con un voltaje de 80 voltios por 45 minutos, en Buffer TAE 1X. Los geles fueron teñidos con Hydragreen (0,5 ug/mL).

Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador UV (Biometra, UVstar 312 nm).

El peso molecular de las bandas de los amplicones se estimó comparándolos con el marcador de peso molecular Ultra Ranger 1Kb DNA ladder.

2.5.4. Secuenciación de la secuencia ARNr 16S

Los amplicones obtenidos por la técnica de PCR fueron enviados al laboratorio Macrogen Inc. en Corea del Sur para su purificación y secuenciación. Las secuencias de ARNr 16S

establecidas por MacroGen Inc. para cada cepa, fueron corregidas usando el software MEGA 7.0.

2.5.5. Identificación Molecular de las cepas

Con las secuencias corregidas se procedió a obtener las secuencias consenso de las 6 cepas empleando el software MEGA 7.0. Las secuencias consenso de cada cepa fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank, utilizando la herramienta Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De esta manera se identificó a cada cepa y se obtuvo el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura de cada una de ellas con las secuencias de la base de datos.

2.5.6. Alineamiento y construcción del árbol filogenético

Una vez que todas las secuencias fueron identificadas se procedió con el alineamiento de las mismas, con ayuda del software MEGA 7.0.

Alineadas las secuencias se construyeron los árboles filogenéticos empleando el método “Neighbor-joining” y modelo de Kimura 2-parámetro con 1000 bootstrap, en el software MEGA 7.0.

2.6. EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS DE CAPTAR NaCl IN VITRO

2.6.1. Estandarización de la curva de crecimiento, determinación de la fase logarítmica y cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias halófilas

Determinación de la concentración de Triptona:

Para la multiplicación de las bacterias halófilas se usó el medio sugerido por Sanchez y Arguello (2006) para medir el crecimiento y la halotolerancia de las cepas.

Se preparó Caldo Triptona al 0.1%, 1%, 2% y 3% con 0.5% de NaCl para seleccionar la concentración de Triptona a usar.

Selección de longitud de onda del medio caldo Triptona:

Según el protocolo de Sanchez y Arguello (2006) se preparó el Caldo Triptona suplementado con 20.89 % de NaCl.

Previamente se realizó un barrido del medio líquido en el espectrofotómetro (OPTIMA®, SP-300), para obtener la longitud de onda a usar para las posteriores mediciones (Skoog y Leary, 1994).

Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas:

De acuerdo a Sanchez y Arguello (2006) se procedió a inocular cada una de las cepas en matraces con 50 mL del medio líquido (Caldo Triptona suplementado con 20.89 % de NaCl) y se dejó incubar a 37°C durante 75 horas.

En los tiempos programados: 0, 2, 4, 8, 16, 20, 24, 32, 48, 52, 60 y 75 horas se tomaron alícuotas en tubos epperdorf para realizar el recuento bacteriano en cámara Neubauer y medición de la absorbancia en espectrofotómetro (OPTIMA®, SP-300) (Escobar et al., 2010).

Con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración en Microsoft Excel (para la estandarización de la curva de crecimiento) entre la concentración obtenida usando el recuento en cámara Neubauer y la absorbancia obtenida usando el espectrofotómetro. Posteriormente se construyó la curva de crecimiento en Microsoft Excel y se determinó la fase logarítmica para cada una de las bacterias halófilas.

Para terminar se obtuvo la velocidad de crecimiento específica para cada bacteria empleando la siguiente ecuación (Fogler, 2001):

$$dN = \frac{\mu N}{dt}$$

Donde:

N= Concentración bacteriana en células/mL

t= Tiempo, h

μ = velocidad de crecimiento específica, h^{-1}

2.6.2. Evaluación de la capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl in vitro

Curva estándar del medio Caldo Triptona + %NaCl:

Previamente se realizó una curva estándar preparando Caldo Triptona suplementado al 20, 19, 18, 17, 16 y 15 % de NaCl para luego medir la conductividad de las 6 concentraciones. Las lecturas fueron analizadas y graficadas en Microsoft Excel para obtener la ecuación de la recta.

Capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl:

Para determinar el consumo de NaCl por parte de las bacterias halófilas aisladas se sigue el protocolo de Sánchez y Arguello (2006), para ello se inocularon cada una de las 6 cepas en tubos falcón con 50 mL de Caldo Triptona suplementado con 20.89 % de NaCl y se dejó incubar a 37°C por 48 horas.

A la par se prepararon también 6 botellas con 200 mL del medio líquido. Se midió la conductividad del medio en los matraces con el multiparámetro (HANNA, HI 9828). Luego se procedió a inocular con los 50 mL de caldo que contiene la cepa y se dejó en agitación por 48 horas. Durante todo ese período se realizó la medición de conductividad con el multiparámetro (HANNA, HI 9828) y el recuento bacteriano en cámara Newbauer a las 8, 24, 32 y 48 horas.

Posteriormente las lecturas fueron analizadas y graficadas en Microsoft Excel.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. IDENTIFICACIÓN Y OBTENCION DE LA MUESTRA

El Santuario Nacional Lagunas de Mejía es uno de los humedales más importantes de Sudamérica, está constituido por diferentes hábitats como pantanos, fangales salinos, totorales, monte ribereño, gramadales y playas arenosas. De este humedal se obtuvieron las muestras de agua. Se determinaron tres puntos para realizar el muestreo como se aprecia en la Figura N° 9, cuya ubicación satelital es: (Muestra 1) -17.141587,-71.867419; (Muestra 2) -17.146961, -71.865933; (Muestra 3) -17.148901, -71.860680.



Figura N° 9. Ubicación de los puntos de muestreo (Muestra 1) -17.141587,-71.867419;(Muestra 2) - 17.146961, -71.865933; (Muestra 3) -17.148901, -71.860680.

Ventosa y Nieto (1995) indican que los hábitats hipersalinos constituyen un ejemplo típico de ambientes en los que se puede encontrar una diversidad de especies microbianas relativamente baja pero con características extremófilas de gran interés biotecnológico.

Según SERNANP (2015), dentro del área geográfica de Arequipa existen cuerpos de agua que tienen condiciones extremófilas, una de estas áreas son las lagunas de Mejía paralelas al mar y que se mantienen gracias a escorrentías superficiales y al aporte de la napa freática. Además se ven relacionadas por un sistema de drenajes y la influencia directa del río Tambo. Este río es abundante en el período normal de lluvias de diciembre a marzo y un estiaje marcado con déficit durante el período de agosto a diciembre, en este último la calidad del agua empeora, trayendo como consecuencia la salinización y/o degradación de los suelos. De esta manera en ciertas épocas del año pueden variar las condiciones de las lagunas.

3.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALOFILAS

De la muestra compósito de agua se obtuvieron 6 cepas: H1, H2, H3, H4, H5 y H6. La Figura N° 10 muestra las 6 colonias axénicas aisladas en Medio de Aislamiento para Bacterias Halofílicas.

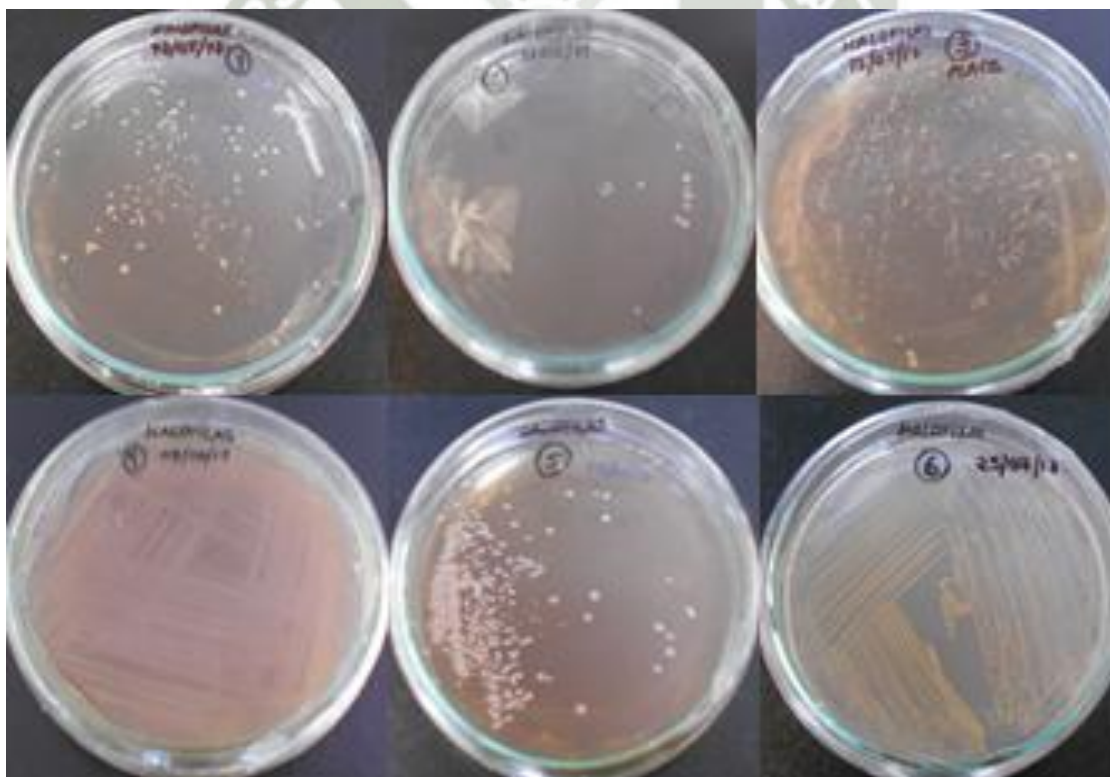


Figura N° 10. Colonias axénicas de bacterias halófilas aisladas en medio de aislamiento para bacterias halofílicas

La Tabla N° 7 muestra los resultados del aislamiento con límite de crecimiento en NaCl., donde se muestra que las 6 cepas crecieron en medio halófilo al 15.89 y 20.89 % de NaCl, mientras que ninguna lo hizo al 25.89 % de NaCl.

Tabla N° 7. Crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de NaCl

Cepas	Concentración NaCl		
	15.89 %	20.89 %	25.89 %
H1	Creció	Creció	No Creció
H2	Creció	Creció	No Creció
H3	Creció	Creció	No Creció
H4	Creció	Creció	No Creció
H5	Creció	Creció	No Creció
H6	Creció	Creció	No Creció

Se demostró que el 100% de las colonias bacterianas obtenidas en el aislamiento son halófilas y crecieron a un rango de 20.89 % de NaCl (Tabla N° 7). Las bacterias halófilas pueden adaptarse en un medio con alta concentración de sales como menciona Oren (1999) gracias a que presentan 8 diferentes mecanismos que generan un balance osmótico con el medio externo, de estos 8 mecanismos no sabemos cuáles de ellos son usados por las cepas aisladas.

Según DasSarma y Arora (2002) (rango de crecimiento de 5 a 20 % NaCl) se les clasificaría como moderadas pero en el caso de Kanekar et al (2011) (rango de crecimiento de 15 a 30 % de NaCl) se les clasificaría como extremas. El poder clasificar estas bacterias se hace tedioso debido a estas dos informaciones. Margesin y Schinner (2001) clasifica a las bacterias como moderadas cuando crecen en un rango óptimo de 3 a 15 % de sal ya que las bacterias halófilas o halotolerantes son caracterizadas por una gran diversidad de procesos metabólicos, porque la concentración de sal intracelular es baja y ellas mantienen un balance osmótico de su citoplasma con el medio externo por la acumulación de altas concentración de diversos solutos orgánicos osmóticos; sus enzimas intracelulares no tienen tolerancia a la sal. Fernández-Jerí et al. (2007) y Ventosa et al. (1998), ellos mencionan que existe una microbiota adaptada a la halofilia y con gran diversidad de bacterias halófilas siendo las

halófilas moderadas las más abundantes. Garzón (2015), indica que es preferible mencionar los mecanismos metabólicos encontrados para explicar la variabilidad de la respuesta frente a las diferentes concentraciones a las que son sometidas las bacterias.

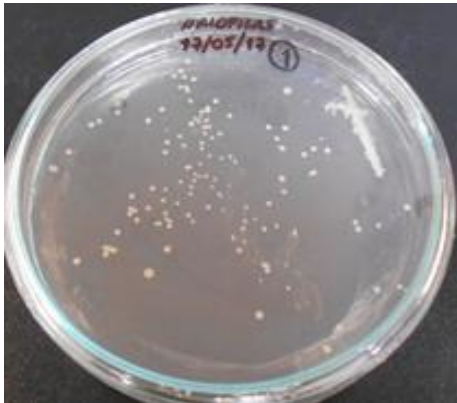
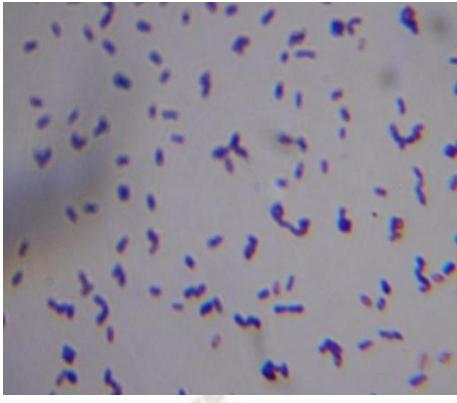

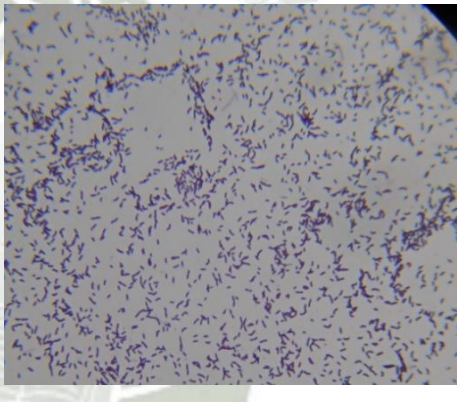
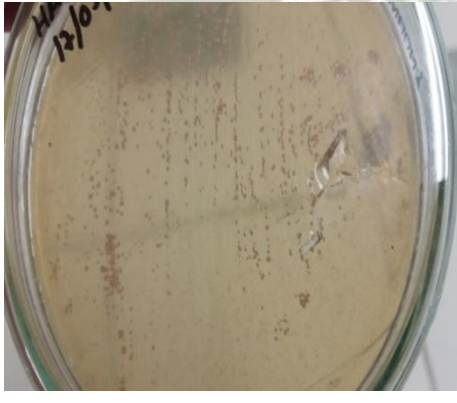
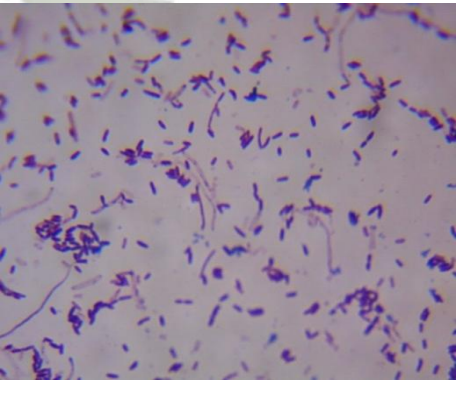
Si bien es cierto las cepas aisladas crecieron a una concentración de 15.89 y 20.89 % de NaCl, hay que mencionar que también fueron sembradas a 25.89 % de NaCl, en la cual no crecieron, tal como dice Lafabvre et al. (2006) a altas concentraciones de sal se reduce la presencia de microorganismos por el estrés osmótico que se genera por el NaCl.

Según Brown et al. (1955) y Villota (2014) el crecimiento de los halófilos se ve influenciado mayormente por el NaCl ya que se encuentra en mayor cantidad en la composición del medio de aislamiento, de igual manera se incorpora el $MgSO_4$ ya que los iones de magnesio sirven para estabilizar las membranas de la célula, reduciendo su permeabilidad.

3.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS

En la Tabla N° 8 se observa la descripción morfológica por cada cepa halófila aislada de las lagunas de Mejía.

Tabla N° 8. Características morfológicas de las cepas halófilas

Cepa	Características Morfológicas	
	Macroscópica	Microscópica (100X)
H1		
	<p>Colonia de color blanco, forma circular, borde entero, elevación convexa, superficie rugosa y brillante, textura mucosa.</p>	<p>Bacilo Gram +</p>
H2		
	<p>Colonia de color crema, forma circular, borde entero, elevación convexa, superficie lisa y brillante, textura mucosa.</p>	<p>Bacilo Gram +</p>
H3		
	<p>Colonia de color rosado, forma puntiforme, borde entero, elevación convexa, superficie lisa, textura cremosa.</p>	<p>Bacilo Gram +</p>


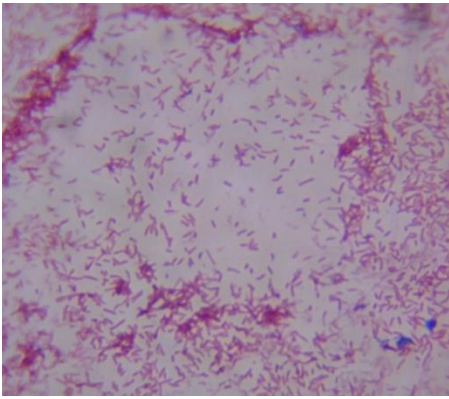
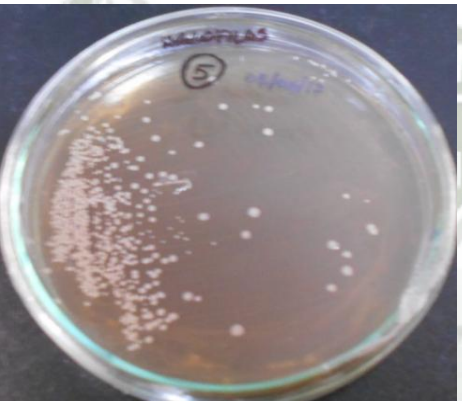


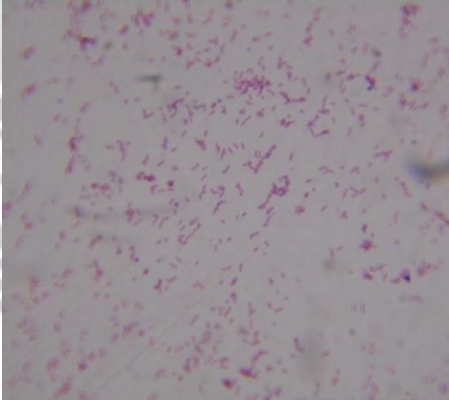
<p>H4</p>		
	<p>Colonia de color rosado, forma circular, borde entero, elevación convexa, superficie rugosa, textura cremosa.</p>	<p>Bacilo Gram -</p>
<p>H5</p>		
	<p>Colonia de color blanco, forma circular, borde entero, elevación convexa, superficie lisa y brillante, textura mucosa.</p>	<p>Bacilo Gram +</p>
<p>H6</p>		
	<p>Colonia de color anaranjado, forma irregular, borde ondeado, elevación convexa, superficie rugosa y brillante, textura mucosa.</p>	<p>Bacilo Gram -</p>

Tabla N° 9. Características morfológicas de las cepas halófilas.

N°	Cepa	Gram	Forma	Color
1	H1	Positivo	Bacilos	Blanco
2	H2	Positivo	Bacilos	Crema
3	H3	Positivo	Bacilos	Rosado
4	H4	Negativo	Bacilos	Rosado
5	H5	Positivo	Bacilos	Blanco
6	H6	Negativo	Bacilos	Anaranjado

Como se puede observar en la Tabla N° 8 y Tabla N° 9 de acuerdo a la caracterización macroscópica, la mayoría de colonias presentan forma circular (H1, H2, H4, H5), borde entero (H1, H2, H3, H4, H5) y textura mucosa (H1, H2, H5, H6), todas las cepas tienen elevación convexa. Sólo 3 cepas presentaron pigmentación, la cepa H3 y H4 presentaron pigmentación rosada y la cepa H6 pigmentación anaranjada. Estas características morfológicas coinciden con Castro et al. (2011), quienes las reportan previamente para las cepas usadas en su investigación.

En el caso de la caracterización microscópica se observó que 4 cepas bacterianas son bacilos Gram positivo (H1, H2, H3, H5) con coloración azul violeta y 2 son bacilos Gram negativo (H4, H6) con coloración rosácea.

En el presente estudio se obtuvieron bacterias que en su mayoría eran bacilos gram positivo y pocas gram negativas. Canales et al. (2014) reportaron bacterias en las salinas de San Blas en Junín, Palomino (2014) en las salinas de Aguada Blanca de Arequipa que en su mayoría eran halófilas gram positivas, sin embargo Sánchez-Porro (2003) menciona que en los ambientes hipersalinos es mucho más común encontrar bacterias de tipo gram negativo. Ventosa et al. (1998) propone que los gram positivos pueden pertenecer al género *Bacillus* y los gram negativos al género *Halomona*, *Deleya*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* o *Chromobacterium*.

3.4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS

En la Tabla N° 10 se observan las características bioquímicas de las cepas aisladas:

Tabla N° 10. Características bioquímicas de las cepas halófilas nativas

Cepa	TSI	LIA	Citrato Simmons	SIM	MR	VP	Catalasa	Oxidasa
H1	K/K -- Lactosa - Glucosa - CO ₂ - H ₂ S -	K/K - Glucosa - Descarboxilación + Desaminación - H ₂ S -	-	H ₂ S - Movilidad - Indol -	-	-	+	+
H2	K/K -- Lactosa - Glucosa - CO ₂ - H ₂ S -	K/K - Glucosa - Descarboxilación + Desaminación - H ₂ S -	-	H ₂ S - Movilidad - Indol -	-	-	-	+
H3	K/K -- Lactosa - Glucosa - CO ₂ - H ₂ S -	K/K - Glucosa - Descarboxilación + Desaminación - H ₂ S -	-	H ₂ S - Movilidad - Indol -	-	-	-	+
H4	K/K -- Lactosa - Glucosa - CO ₂ - H ₂ S -	K/K - Glucosa - Descarboxilación + Desaminación - H ₂ S -	-	H ₂ S - Movilidad - Indol -	-	-	+	+
H5	K/K -- Lactosa - Glucosa - CO ₂ - H ₂ S -	K/K - Glucosa - Descarboxilación + Desaminación - H ₂ S -	-	H ₂ S - Movilidad + Indol -	-	-	-	+
H6	A/A ++ Lactosa + Glucosa + CO ₂ + H ₂ S -	K/K - Glucosa - Descarboxilación + Desaminación - H ₂ S -	-	H ₂ S - Movilidad + Indol -	+	+	+	+

En la Tabla N° 10 se observa lo siguiente:

En la prueba TSI la cepa H6 es la única que tiene la capacidad de fermentar lactosa y glucosa para formar ácidos, además produce CO₂, mientras que ninguna cepa produce ácido sulfhídrico (H₂S).

La enzima Lisina descarboxilasa está presente en todas las cepas, ya que consumieron la lisina en la prueba LIA. Ninguna fermentó la glucosa ni produjo ácido sulfhídrico (H₂S).

Se puede observar que todas las cepas dieron un resultado negativo a la Prueba Citrato de Simmons, esto indica que no tienen la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Las cepas H5 y H6 presentan motilidad en la prueba SIM pero ninguna cepa produce ácido sulfhídrico (H₂S) ni indol.

El resultado en la prueba MRVP muestra que solo la cepa H6 tuvo reacción positiva, siendo la única que presenta la habilidad de producir ácidos estables y acetoína por fermentación de la glucosa.

Las cepas H1, H4 y H6 presentaron una reacción positiva para la prueba de catalasa. Al adicionárseles el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) produjeron una rápida y sostenida producción de burbujas lo que indica la presencia de la enzima Catalasa.

Se observa que todas las cepas presentan la enzima Citocromooxidasa, siendo positivas para la prueba de oxidasa.

Los resultados de las pruebas bioquímicas según la Tabla N° 10 coinciden con las pruebas bioquímicas realizadas por Orsod y MaHF (2012) y Kalimutho et al. (2011) en las cepas halófilas aisladas para su investigación. Así también coinciden casi totalmente con las pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de las salinas de Pilluana San Martín, en donde Flores-Fernández et al. (2010) reportan que podrían tratarse del género *Bacillus*, ya que son los géneros más representativos de gram positivos en ambientes salinos.

Sánchez-Porro (2003) indica que gran cantidad de microorganismos halófilos moderados aislados de ambientes salinos corresponden a bacterias con metabolismos preferentemente

oxidativo, con el fin de hacer más eficiente la generación de energía bajo condiciones extremas y al realizar las pruebas bioquímicas los resultados lo confirmaron, que todas las cepas producen enzimas citocromo c-oxidasa (a través de la prueba de oxidasa, Tabla N° 10).

3.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS

3.5.1. Extracción de ADN de bacterias halófilas

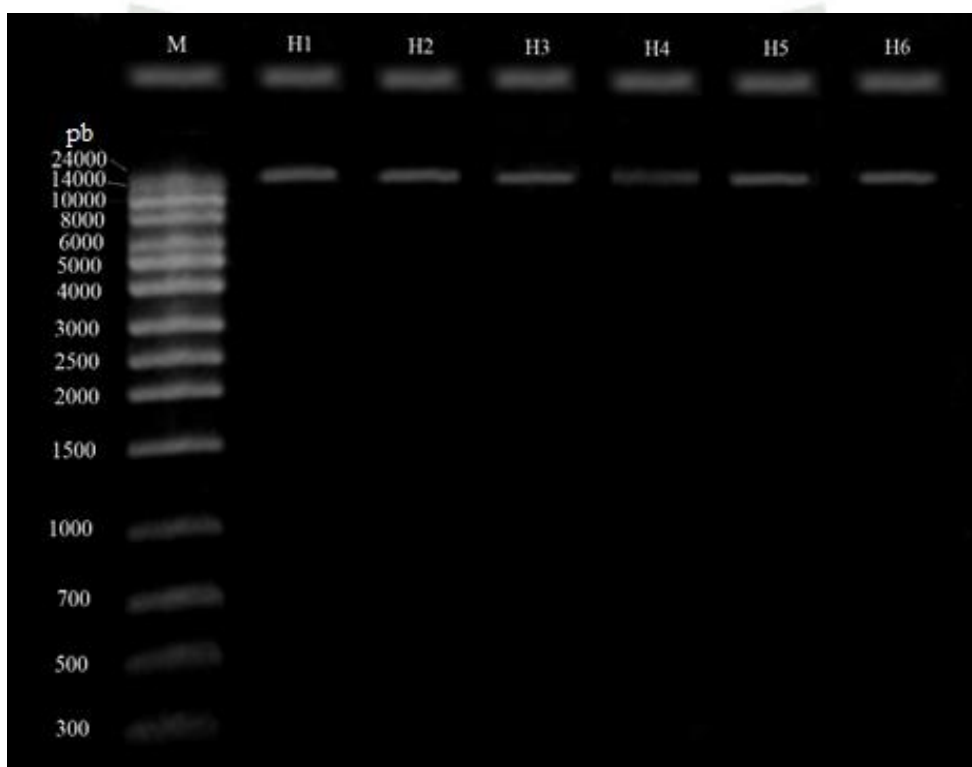


Figura N° 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico extraído de las cepas halófilas.

En la Figura N° 11 se observa una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, en donde se evidenció la presencia del ADN genómico extraído, el cual se encuentra íntegro y de buena calidad, pues no presenta smears de bandas secundarias que indiquen la fractura del ADN durante el proceso de extracción. Se puede observar que el ADN presenta un tamaño mayor a 24000 pb.

3.5.2. Determinación de la calidad del ADN extraído

Tabla N° 11. Medición de la pureza y concentración de ADN genómico de cepas halófilas.

Cepas	Absorbancia		Pureza del ADN 260/280	Concentración ADN ug/mL
	260 nm	280nm		
H1	0.037	0.020	1.850	370
H2	0.025	0.014	1.786	250
H3	0.028	0.015	1.867	280
H4	0.031	0.017	1.824	310
H5	0.036	0.019	1.895	360
H6	0.030	0.016	1.875	300

En la Tabla N° 11 se observa que la pureza del ADN se encuentra dentro del rango óptimo (1.8 – 2) y la concentración obtenida es superior a los 200 ug.

El método de extracción de ADN según Antoraz (2013) fue modificado al suprimir el uso de Acetato de Sodio. Matthew (2018) indica que el Acetato de Sodio se usa para separar el ADN plasmídico del ADN genómico, sin embargo debido a que el objetivo no era la extracción de ADN plasmídico sino el genómico, el método es muy eficiente, ya que permitió extraer ADN puro y en la concentración necesaria (Tabla N° 11) para poder continuar con la PCR.

3.5.3. Amplificación del segmento genético ARNr 16S

Luego de realizar la extracción de ADN se procedió a amplificar el gen ARNr 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la Figura N° 12 se observó los fragmentos obtenidos después de realizar la PCR con los primers forward y reverse cuyo tamaño aproximado es de 1400 pb, para las 6 cepas aisladas.

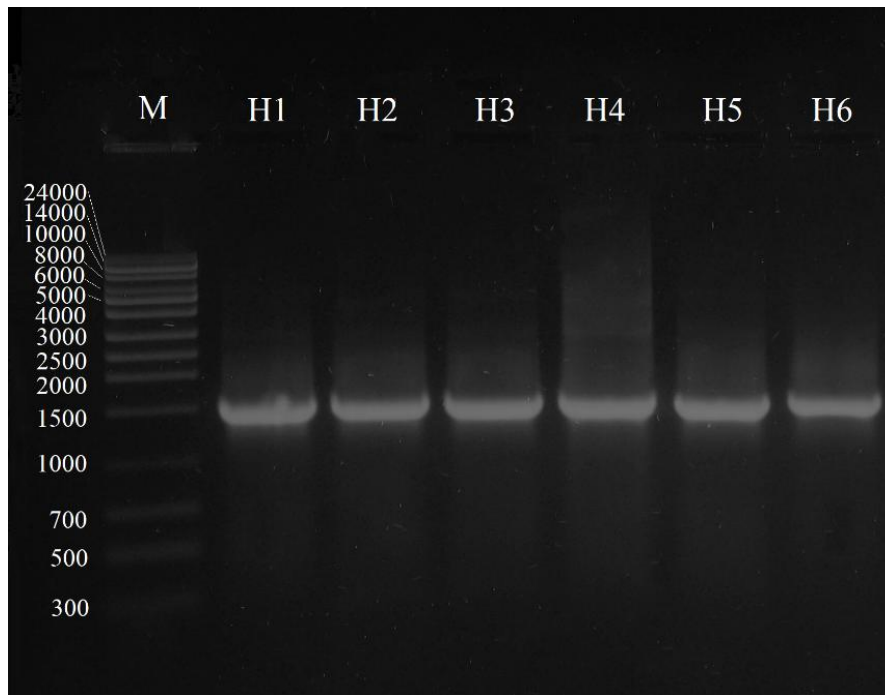


Figura N° 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S de las cepas halófilas.

En el análisis para determinar el género y la especie se usó la secuencia ARNr 16S que contiene aproximadamente 1550 pb y que se aplica mucho en estudios taxonómicos ya que la secuencia ARNr 5S es muy pequeña (75-120 pb) y no permitiría lograr la determinación de la especie (Weisburg et al., 1991).

3.5.4. Secuenciación del segmento genético ARNr 16S

Se obtuvieron las siguientes secuencias por cada cepa:

H1

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H1 empleando el primer forward:

```
GCATGGCGGGCTCTATACATGCAGTCGAGCGCGGGAGCAAGCGGAAGCCTTCGGGTGGATGCTTGTGGAACGAGCGGGC
GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGAAGC
GCGTCATCGCATGATGACGTGATGAAAGGCGGGCTTTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGTTAGTTGG
TGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCATCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGTGCAACGCCGCTGAGTGATG
AAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAAGGCGGTACCGTGACGGTACCTGA
CCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGCGCTCGCAGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGCGCTTAACCGCAATGGTCATTGAAACTGGAGGAC
TTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
```

GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGTTGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAG
CAACCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGCCAGCGCTGGAGACAGCGTGTCCCTTCGGGGACAGAGTGACA
GGTGGTGATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCTTAATCTTAGT
TGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAACCCGAAGAAAAGGGGGGAAAGAATTCAAATAATC
AAGGCCCTTATAACCGGGGTACACACCTGGTTCCAATGGAGGGAGACAAAAGGGGGCGAAACGCCCCCGGGGTGG
GAAATCCCCTAAAAACATTCTCCTCG

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H1 empleando el primer reverse:

ACTTTGGCACTTCGGCGGCTGGCTCCAAAGGTTACCTCACGACTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGT
TGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAATGGTTTTATGGGATTTGCTACACCTTGGCGCTTCGCTGCCCTCTGTTCATCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCAGGTATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAG
TCACCTTAGAGTGCCCAACTCAATGCTGGCAACTAAGATTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC
GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTGTCCCGAAGGGAACACGCTGTCTCCAGCGCTGGCAGAGG
ATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCCTGTGCGGGCCCCGTCATTC
TTTTGAGTTTACGCTTTCGGGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTGCAGCTAAGGGGCGGAAACCC
CCTAACACCTAGCACTCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACTCTGTTCCGTCGCCACGCTTTCGCTCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGAAT
TCCACTCTCCTCTCTGTACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCATTCGCGGTTAAGCCGCGAGATTTACATCAGACTT
AAAAGACCGCCTGCGAGCGCTTACGCCAATAATTCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGTGGCAC
GTAGTTAGCCGGGCTTCTGGTACAGGTACCGTACCGTACCCTTATCAAACGGTACTGTTCTTCCCTGACAACAGA
GTTTTACGATCCGAAAACCTTCACTCAAGCGGCGTTGCACCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGATGATTCCTACTGC
TGCCTCCCGTAAGAATCTGGGCCGTGTCTCAATCCAGTGTTCGATCACCTTCTCAAGTCGGCTACCCACCGTCCGCTT
GGTAGGGTCTTACCCACCAACTAAATAAAGGGCCGCGGGCCCTCTTAATTGACACGG

H2

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H2 empleando el primer forward:

GCAGTGGGGGGTCTATACATGCAGTCGAGCGCAGGAGCAGGACAGATCCCCCTTCGGGGGTGATGCCTGTGGAATGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACTGCCTGTAAGATCGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAAT
CCTTTATCTCGCATGAGAGAGAGGTGAAAGATGGCCTTTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAATAGCTACCAAGGGCAGCATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCCGCGTGAACGA
TGAAGGCTTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCT
AACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG
AACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGGCACTCTGGTCTGTTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGA
AGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGGACCGCCCTAGAGATAGGGTCTTCCCTTCGGGGACCAAGTGA
CAGGTGGTGATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCACAACGAGGGCAACCCCTAATCTTA
GTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGACAACCCGAGGAAAGGGCGGGGATAAAGTTCAAATC
ATCATGGCCCTTATGAACTGGGGGTACCACCTGTTCCAATGGAAGGGTACACAAGAGG

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H2 empleando el primer reverse:

CATTTGGACACTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGTGTGACGGG
CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGGC
AGTTGCAGCTGCAATCCGAACGAGAATGGTTTTATGGGATTTGCTACACCTTGGCGCTTCGCTGCCCTTTGTACCATCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGGTTTTGTACCGGC
AGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATTAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTGGTCCCGAAGGGAAGACCCATCTCTAGGGCGGTCCAA
GGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTGGTGCGGGCCCCGTCAA
TTCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGTGGAAG
CCCCCTAACACCTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACGCTTTCGCACC
TCAGCGTCAGAAACAGACCAGAGAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATATCTACGCATTCACCGCTACACGTG
GAATCCACTCTCCTTCTGTCTCAAGTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAG
ACTTAAGAAACCGCTGCGCGCGCTTTACGCCAAATAATTCGGACAACGCTTGGCCCTACGTATTACCGGGGTGCTG
GCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTCGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCTCTATTTCGCACGGTACTTGTCTTCCCTAACAA
CAGAACTTACGATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCCTA
CTGCTGCCCTCCCGTAAGAACTCTGGGCCGTGTCTCAATCCCCCTGTGGGCGAAAACCCCTCTCAGGGGGGGTACG

H3

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H3 empleando el primer forward:

GCATGGCGCAGCTATAACATGCAGTCGAGCGCAGGAGCAGGCAGATCCCCCTTCGGGGGTGATGCCTGTGGAATGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAATC
CTTTTCTCGCATGAGAGGAAGGTAAGATGGCCTTTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAATAGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATCTTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGAT
GAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCAACAGAGCGGTGCCTTGACGGTACCT
AACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGAAATTATTGGGC
GTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGG
AACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATTTGTGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGTTAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCTTAGTGTGAAGTTAACGATTAAGCACTCCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTTGACATCCTTGACCGCCCTAGAGATAGGGTCTTCCCTTCGGGACCAAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCAGCAGGCGCAACCCCTAATCTTAG
TTGCCAGATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACGGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGGGGGGATGAAGTCAAATAAAC
AAGGCCCTTATAACTGGGGGAAACACTGGTTCCAATGGAGGGGTCAAAGGGCGCGACAACCG

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H3 empleando el primer reverse:

AACTTGACACTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGTGTGACGGGC
GGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGGCA
GTTGCAGCTGCAATCCGAACGAGAATGGTTTTATGGGATTTGCTACACCTTGGCGCTTCGCTGCCCTTTGTACCATCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCGCCTTCCTCCGGTTTTGTACCGGCA
GTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATTAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA
CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTGGTCCCGAAGGGAAGACCCATCTCTAGGGCGGTCCAAAG
GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAGGGGTGGAAGCC
CCCTAACACCTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTACCCACGCTTTCGCACCTC

AGCGTCAGAAACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATATCTACGCATTTACCCGCTACACGTGGA
ATTCCACTCTCCTTTCTGTCTCAAGTTCCCAAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACT
TAAGAAACCGCCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGTAGTTAGCCGGGGCTTCCTCGTTAGGTACCGTCAAGGCACCGCTCTGTTTCGCACGGTACTTGTTCCTCCCTAACAAACAG
AACTTTACGATCCGAAGACCTTCATCGTTACGCGGGCTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATCCCTACTGC
TGCCCCCGTAAGAATCTGGGCCGTGTCTCAATCCCCCTGTGGGCCAAAACCCCCCTCAGGTGGGCGACCCACCGCCCC
CTGGTGAAGCTATAAATTACCAACTAATTAAGGGCGCCGGGGCGCTCC

H4

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H4 empleando el primer forward:

GCGTTGGCGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGTCCCTGGTGGCGAGCGCGGACGGGTGAGT
AATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACGTGGGGAAACCCACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAA
GCGGAGGATCTTCGGACTTCGCGCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGC
GACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCA
CTTTCAGCGAGGAAGAAAGCCTGGTGGTTAATACCCATCAGGAAGGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGG
CACGCCGTTGTGAAAGCCCCGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGGCCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGG
TAGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTTCTGGCCTGACAC
TGACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAG
CCGTTGGGACCTTTAAGGACTTAGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTA
CCCTTGACATCCTGCGAATTTGGTAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAGCGCATTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTGCCCAGCACGTAATGGTGGGAA
CTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAAGGGGGGACGACCTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGGGAGGG
GGTACACACCTGCTACAATGGCCGTACAAAAGGGTTGCGAAAACCCCCAGGGGGAGCGAATCCCCAAAAGCCGGCCT
CATTCCCAGAACCGAGATTTTCGCATCCG

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H4 empleando el primer reverse:

ACAATAACACACCGTGGTGATCGCTCTCCGAAGGTTAAGCTAACCCTTCTGGTGCAGTCCACTCCCATGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGACTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTC
GAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTGAGGCCGGCTTTCTGGGATTCGCTCCACCTCGCGGTCTCGCAACCCCTTTGTACCGG
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCACCTTCTCCGTTTGTACCGG
GCAGTCTCCTTAGAGTTCACCACTTACGCTGGCAAATAAGGACAAGGGTTGCGTCTGTTACGGGACTTAACCCAACA
TTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGCTACTGCGCTCCCGAAGGCACTAAGGTATCTTACCAAATTC
GCAGGATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGACTCCCCAGGCGGTGACTTATCGCGTAACTGCGCCACTAAGTCCCTAA
AGGTCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCTGTTTGTACCCACGCTTTCGCAC
CTCAGTGTGAGTGCAGGCCAGAAAGCCGCTTCGCCACTGGTATTCCTCCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGG
GAATTCTACCTTCTCTCTGACTCTAGCCTGGCCGTTCCGGATGCCGTTCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTCACAACCG
GCGTGCCAAGCCACTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTCGCACCTCCGTATTACCGCGGTGCTG
GCACGGAGTTAGCCGGTCTTCTTCTGCGAGTGATGCTCTTCTGATGGGTATTAACCACAGGCTTTCCTCTCGCTGAA
AGTGCTTTACAACCCGAAAGCCTTCTTACACACGCGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCCAC
TGCTGCCTCCCGTAAGAATCTGGGGCGGTGTCAATCCCAATGGTGTGATCATCTCTCAAACAACTACGGAACGTCC
CCTTGGTAAGCCGTTACCTTTCCAATAAGTTAATCCGACATAAGGGCCATCCAATAACACCAG

H5

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H5 empleando el primer forward:

GGAAGGCGGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGGGAGCGAGCTGAAGCCCTTCGGGGTGGACGCTCGTGGAACGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTGTAAGACCGGAATAACCCCGGAAAACGGGGCTAATGCCGGGTAAC
CGATCGGTTCTCCTGAACCGATTGTAAGGATGGCTTCTTGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGGCTTCGGGTCGTAAGTTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGGACCGCGCAATAGAACGGTCCCTTGACGGTAC
CTCACGAGGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGTGGCTCAACCACGGAGGGCCATTGGAAAACGG
GGAACCTTGAGAACTGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTCTCGGTCGGTTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGGCTACTTCTAGAGATAGAAGTTCCCTTCGGGGACCAAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAATCT
TAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGATTGCCGGTGACAAACCCGAAGAAAGCGGGGATAAAGTCAAATC
ATCATGGCCCTTATAACCGGGGGGAACAACCTGGTTAAAATGGAATGGGGACAAAACGGAACCAACCCCCCAG

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H5 empleando el primer reverse:

TCAATTGGTCACTTCGACGGCTGGCTCCTGTAAGGTTACCTACCGGCTTCGGGTGTTGCCAACTCTCGTGGTGTGACGGG
CGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCG
AGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAATGGGTTTCTCGGATTGGCTACCCCTCGCGGGTTCGCTTCCGTTTGTCCCATCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCATCCCCGCTTCTCCGGTTTGTACCCGGC
AGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATTAGGGGTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTGGTCCCCGAAAGGGAACCTTCTATCTCTAGAAGTAGCCAAG
GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTACGACTAAGGGGTGGAAGCC
CCCTAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACTCTGTTTGTACCCACGCTTTCGCACCTC
AGCGTCAGAAACCGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCACATATCTACGCATTTACCGCTACACGTGGA
ATTCCACTCTCCTTTCAGTTCTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGGCCCTCCGTGGTTGAGCCACGGGCTTTCACATCAGAC
TTAAGGAACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAATAATCCGGACAACGCTGGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTCGTGAGGTACCGTCAAGGGACCGTTCTATTGCGCGGGTCTTGTTCCTCCCTCACAACA
GAACTTTACGACCCGAAAGCCTTACGTTACGCGGGCGTTCCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACT
GGTGCTCCCTAAGAATCTGGGGCGGGTCAATCCAGTGTGGGCGAACACCCCTTCAGGGCGGGGACCCACCTCC
CCCTTGGTAG

H6

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H6 empleando el primer forward:

GCATTGGGCGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGCAGCGGGTCTTCGGGATGCCGGCGAGCGGGCAGGGGTGAGTAAT
ACATGGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACTCGGGGAAACCCGAGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCA
GGGGATCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAGCCATGTCGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC
GATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTT

TCAGTGGGGAAGAAGGCATGACGATTAATACCCGTCATGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGCTTGCCAA
GCCGGATGTGAAAAGCCCGGGCTCAACCCGGGAACGGCATTGGAAGTGGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTGG
AATCCCGGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGCGCGCCTTCTGGACTGACACTGA
CGCTGAGGCGGAAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACCAGCCG
TTGGACCCCTTGGAGGTTTGGTGGGCGCAGTTAACGCAATAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACT
CAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGCTC
TTGACATCTGCGAATCTCCAGAGATGGGAGAGTGCCTTCGGGAACGCAAAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGT
CGTGTGTGAAAATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTATCCCTTTTGGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTC
AGGGAGACTGCCGGTGACAACCGGAAGAAAGTGGGGGACAACATCAAGTCATCATGGGCCCTTACAAGCAGGGGTACA
CACTTGCTACAATGGCCGGTACAAAAGGGTTGCGAAACGGGAGACTTGGAGCCCATCCCTTAAATCG

Secuenciamiento Macrogen Inc. de la cepa H6 empleando el primer reverse:

ACACAGACACACCGTGGTGATCGCTCTCCCGAAGGTTAAGCTAACCCTTCTGGTGCAGTCCACTCCCATGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTC
GAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTGAGGCGGGCTTTATGGGATTGGCTTACGTCGCCGCTTCGCAACCCCTTGTACCGG
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGCTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCACCCACCTTCTCCGGTTTGTACCG
GCAGTCTCCCTGAAGTTCGGCCGACCGCTGGCAAAAAGGGATAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACA
TTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCTGCGTTCCCGAAGGCACTTCCCATCTCTGGGAGATTC
GCAGGATGTCAAGAGCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGT
CAATTCATTTGAGTTTACGCTTGGCGCCGACTCCCGAGGCGGTGACTTATTGCGTAACTGCGCCACCAACCCCTCAA
GGGGTCCAACGGCTGGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGCG
CCTCAGCGTCAGTGTGATCCAGAAAGGCCGCTTCGCCACTGGTATTCCTCCCGATCTCTACGCATTCACCGCTACACCG
GGAATCCACCTTCTCTCTGCACTCTAGCCTGCCAGTTCGGAATGCCGTTCCCGGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCC
GGCTTGCAAGCCGCTACGCGCCCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCTCGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGTGGGTGATGTCTTCATGACGGGTATTAATCGTCATGCCTTCTTCCCACTGAA
AGTGCTTACAACCTAAGGCTTCTTACACACGCGCATGGCTGGGATCAGGGTTTCCCAATTGTCCAATATCCCA
CTGCTGCCTCCCGTAAGAATCCGGGCCGTGTCTCATCCCGGTGTGGGTGAACATCCCTCTCAAACAACCTCCGGAACG
TTTGCCCTGTGTGAGCCGTTCTTCCCAACCAAGCTTAA

3.5.5. Identificación Molecular de las cepas

A continuación se muestran las secuencias consenso obtenidas por cada cepa:

Secuencia consenso de la cepa H1

TGCAGTCGAGCGCGGGAGCAAGCGGAAGCCTTCGGGTGGATGCTTGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGCAACCTGCCTGTAAGATGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGAAGCGCGTCATCGCATGATGAC
GTGATGAAAGCGGCTTTTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCATCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGTGAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAA
AACTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAAGGCGGTACCGTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGG
TCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGCGCTTAACCGCAATGGTCAATTGGAACCTGGAGGACTTGAGTACAGAAGAGGA
GAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGAGTGC

TAGGTGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGCAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
GAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTCTGCCAGCGCTGGAGACAGCGTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGG
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGATGGAACAGAGGGCAGCGAAGCCGCAAGGTGTAGCAAATCCCATAAAACCATTCAGTT
CGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCGGGCCCTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTTAA

Secuencia consenso de la cepa H2

CAGTCGAGCGCAGGAGCAGGCAGATCCCCTTCGGGGGTGATGCCTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAACCGTG
GGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAATCCTTTATCTCGCATGAGAGAG
AGGTGAAAGATGGCCTTTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATAGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTCCGCAATGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAA
GTTCTGTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCATAAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTGAGGACAGAAGAGGA
GAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGGCAGCTCTCTGGTCTGT
TTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTTGGACCGCCCTAGAGATAGGGTCTTCCCTTCGGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCAAGGTGTAGCAAATCCCATAAAACCATTCAGTTC
GGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTTAA

Secuencia consenso de la cepa H3

AGCAGGCAGATCCCCTTCGGGGGTGATGCCTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAACACGTGGGCAACCTGCCTGT
AAGATCGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAATCCTTTTCTCGCATGAGAGGAAGGTAAGGATGGC
CTTTGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATAGCTCACCAAGCGCAGCATGCGTA
GCCCACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTACCGTGCGAACAGAGCGGTGCCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCCGGTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGAATTCAC
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGT
GCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTAGGGGGC
TTCCACCCCTTAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TTGGACCGCCCTAGAGATAGGGTCTTCCCTTCGGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAA

TGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCAAGGTGTAGCAAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCA
ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACA
CCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGA

Secuencia consenso de la cepa H4

AGTCGAGCGGCAGCACGGGGAGCTTGCTCCCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGT
AGTGGGGGATAACGTGGGGAAACCCACGCTAATACCGCATACTGCTTACGGGAGAAAGCGGAGGATCTTCGGACTTCGC
GCTATCGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACAATGG
GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAAAGCC
TGGTGGTTAATACCCATCAGGAAGGACATCACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGGCACGCCGGTTGTGAAAGCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGGCCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCGCCGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCACTGGCGAAGGCGGCCCTTCTGGCCTGACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCG
TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGACCTTAAAGGACTT
AGTGGCGCAGTTAACGCGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACCCTTGACATCTGCGAATTTGG
TAGAGATACCTTAGTGCCTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGT
TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTA
CAAAGGGTTGCGAGACCGCGAGGTGGAGCGAATCCAGAAAGCCGGCCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTC
CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGTTAGCT

Secuencia consenso de la cepa H5

CGCGGGAGCGAGCTGAAGCCCTTCGGGGTGACGCTCGTGGAAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACC
TACCTGTAAGACCGGAATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAACCGATCGGTTCTCCTGAACCGATTGTA
AGGATGGCTTCTTGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGAC
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGGTGAACGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAGTTCTG
TTGTGAGGGAAGAACAAGGACCGCGGAATAGAACGGTCCCTTGACGGTACCTACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCGTGGCTCAACCACGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGAAGTGAAGAGGAGAGTG
GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCCGTTTCTG
ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGT
GTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGT
CTTGACATCCTTGGCTACTTCTAGAGATAGAAGTTCCCTTCGGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGATGGGACAAACGGAAAGCGAACC CGGAGGGGTAGCCAATCCGAGAAACCCATTCTCAGTTCGGATT
GCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGCCGGTGAGGTAACCTTA

Secuencia consenso de la cepa H6

CAGTCGAGCGGCAGCGGGTCCCTTCGGGATGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACATGGGAATCTGCCCGGTAGT
GGGGGATAACTCGGGGAAACCCGAGCTAATACCGCATACTCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCT
ATCGGATGAGCCCATGTCGGATTAGCTTGTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGG
GAAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGGGGAAAGAAGGCATG
ACGATTAATACCCGTCATGAAGGACATCACCCACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGCGCGTAGGGCGGCTTGCCAAGCCGGATGTGAAAGCCCCGG
GCTCAACCCGGAACGGCATTTCGGAAGTGGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTGGAATTCGCCGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAAGTGGCGAAGGCGGCCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACCAGCCGTTGGACCCCTTGAGGGTTTTGG
TGGCGCAGTTAACGCAATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGCTCTTGACATCTTGCGAATCTCCA
GAGATGGGAGAGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTT
AAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTATCCCTTTTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTTCAGGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGCAGGGCTACACAGTGTACAATGGCCGGTACA
AAGGGTTGCGAAGCGGCGACGTGAAGCCAATCCATAAAGCCGGCCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCG
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTAC
ACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCTT

Una vez que se obtuvieron las secuencias consenso, éstas fueron analizadas en la herramienta Blast del NCBI. De esta manera se obtuvo el porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura de cada una de ellas con las secuencias de la base de datos.

Tabla N° 12. Microorganismos que presentaron homología con la secuencia del gen ARNr 16S

Cepa	N° Acceso	Descripción	Puntaje Total	Pares de bases (pb)	Cobertura de búsqueda	Ident
H1	LT671586.1	<i>Virgibacillus siamensis</i>	2593	1527	100%	99%
H2	DQ448764.1	<i>Halobacillus sp.</i>	2588	1470	99%	99%
H3	LT714153.1	<i>Halobacillus hunanensis</i>	2564	1489	99%	99%
H4	KX389578.1	<i>Salinicola zeshunii</i>	2556	1445	100%	100%
H5	EF517968.1	<i>Bacillus halophilus</i>	2564	1488	99%	99%
H6	KP172204.1	<i>Kushneria sp.</i>	2538	1458	99%	99%

En la Tabla N° 12 se observan los nombres de los microorganismos que presentaron alta homología con la secuencia del gen ARNr 16S de cada una de las 6 cepas halófilas.

Las 6 cepas coinciden dentro de las familias: Bacillaceae (*Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis* y *Bacillus halophilus*) y Halomonadaceae (*Salinicola zeshunii* y *Kushneria sp.*).

Las secuencias obtenidas de los amplicones (página 62-67) de ADN de las diferentes cepas enviadas a MacroGen, al ser corregidas y comparadas (página 67-70) coincidieron con bacterias de la familia Bacillaceae (*Virgibacillus siamensis* (H1), *Halobacillus sp.* (H2), *Halobacillus hunanensis* (H3) y *Bacillus halophilus* (H5)) y otras coincidieron con la familia Halomonadaceae (*Salinicola zeshunii* (H4) y *Kushneria sp.* (H6)), este resultado coincide con una investigación realizada por Canales et al. (2014) en las Salinas de San Blas en Junín donde obtuvieron 03 cepas del género *Halomona* y 11 del género *Bacillus*.

De las homologías encontradas que presentan un 99% de identidad se observa que la bacteria *Virgibacillus siamensis* reportada y nombrada como tal por Tanasupawat et al. (2010) fue aislada por primera vez en Tailandia.

La bacteria *Halobacillus sp.* fué estudiada originalmente por Spring et al. (1996) para nombrar dos nuevas especies *Halobacillus litoralis* y *Halobacillus trueperi* y renombrar la especie obtenida por Claus et al. (1983) de *Sporosarcina halophila* a *Halobacillus halophilus*.

Mediante el análisis filogenético se identificó también a la bacteria *Halobacillus hunanensis*, esta bacteria halófila gram positiva fue aislada por primera vez en China por Peng et al. (2009) y a la bacteria *Bacillus halophilus* previamente descrita por Ventosa et al. (1989) y Li et al. (2007).

De igual forma las homologías que presentan un 100% y 99% de identidad con las secuencias de la familia halomonadaceae son la bacteria *Salinicola zeshunii*, la cual es una bacteria halófila gram negativa identificada por primera vez en el año 2012 por Cao et al. y la bacteria *Kushneria sp.* reportada por Bae et al. en el 2014.

De las 6 cepas, 2 cepas no se han podido identificar hasta especie: *Halobacillus sp.* y *Kushneria sp.*, las cuales al ser confrontadas con diferentes bases de datos no se ha encontrado alta similitud. Por lo que pueden ser consideradas como especies nuevas. Posteriormente se procederá con la denominación de estas nuevas especies de acuerdo a la normativa vigente.

3.5.6. Alineamiento y construcción del árbol filogenético

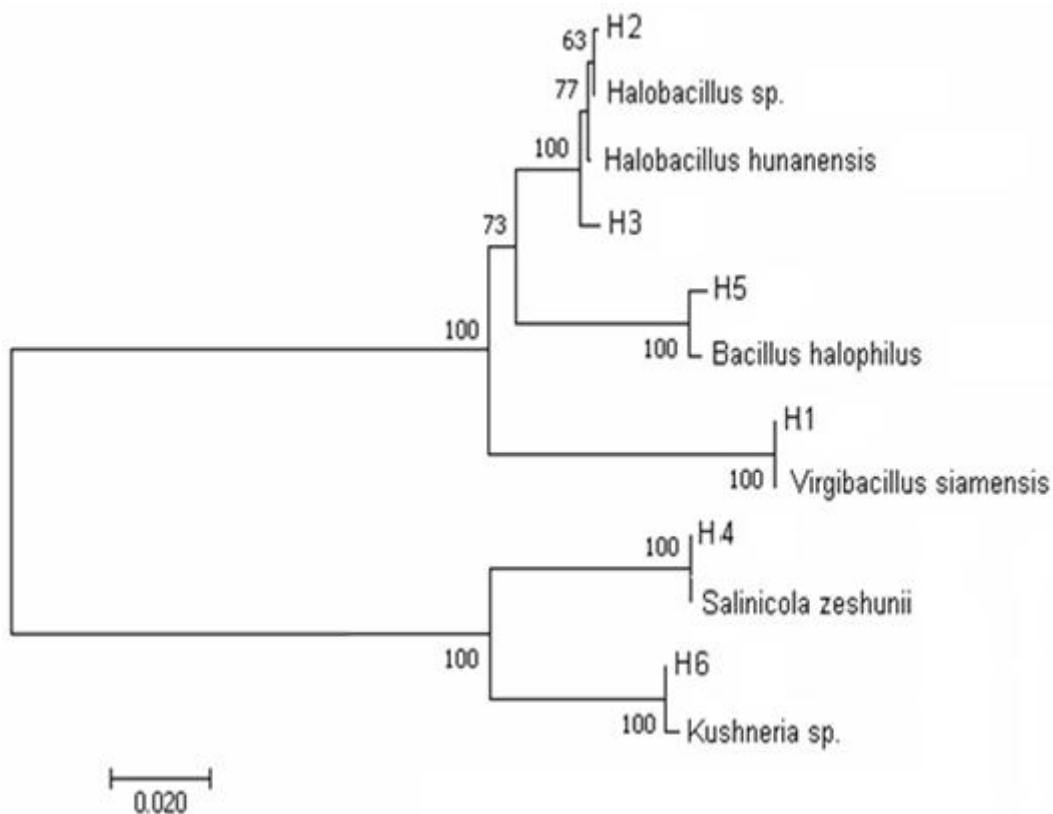


Figura N° 13. Árbol filogenético construido en base a las secuencias del gen ARNr 16S

En la Figura N° 13 se observa el árbol filogenético obtenido de acuerdo al método del vecino más cercano (Neighbor-joining) y el modelo de Kimura 2-parámetro.

En el árbol filogenético se puede apreciar dos grupos que coinciden con la caracterización morfológica de gram positivas y gram negativas: las gram positivas (bacterias *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis* y *Bacillus halophilus*) y las gram negativas (bacteria *Salinicola zeshunii* y *Kushneria sp.*).

De igual manera las bacterias *Virgibacillus siamensis* (H1), *Halobacillus sp.* (H2), *Halobacillus hunanensis* (H3) y *Bacillus halophilus* (H5) se agruparon de acuerdo a la familia Bacillaceae y en el caso de las bacterias *Salinicola zeshunii* (H4) y *Kushneria sp.* (H6) a la familia Halomonadaceae.

3.6. EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS DE CAPTAR NaCl IN VITRO

3.6.1. Estandarización de la curva de crecimiento, determinación de la fase logarítmica y cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias halófilas

Determinación de la concentración de Triptona:

Tabla N° 13. Multiplicación de bacterias halófilas en diferentes concentraciones de Triptona

Triptona (X %) + NaCl (0.5%)	Crecimiento celular (cel/mL)
0.1%	1 000 000
1%	5 450 000
2%	111 500 000
3%	175 150 000

En la Tabla N° 13 se muestra el uso de diferentes concentraciones de triptona. Se observa que a mayor concentración de triptona mayor el número de bacterias obtenidas.

Selección de longitud de onda del medio caldo Triptona:

Al realizar el barrido del medio (caldo Triptona, suplementado con NaCl al 20.89 %) en el espectrofotómetro, se determinó la longitud de onda, dando como resultado 976 nm y con ella se procedió a hacer las lecturas de las posteriores muestras.

Según Skoog y Leary (1994) es importante elegir una longitud de onda óptima de trabajo en la cual la sustancia tenga un máximo de absorbancia debido a que confiere mayor sensibilidad en las lecturas, brinda un límite de detección más bajo y un menor error en las mediciones.

Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas:

En las Figuras N° 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se muestra las curvas de crecimiento de las bacterias *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis*, *Salinicola zeshunii*, *Bacillus halophilus* y *Kushneria sp.* respectivamente.

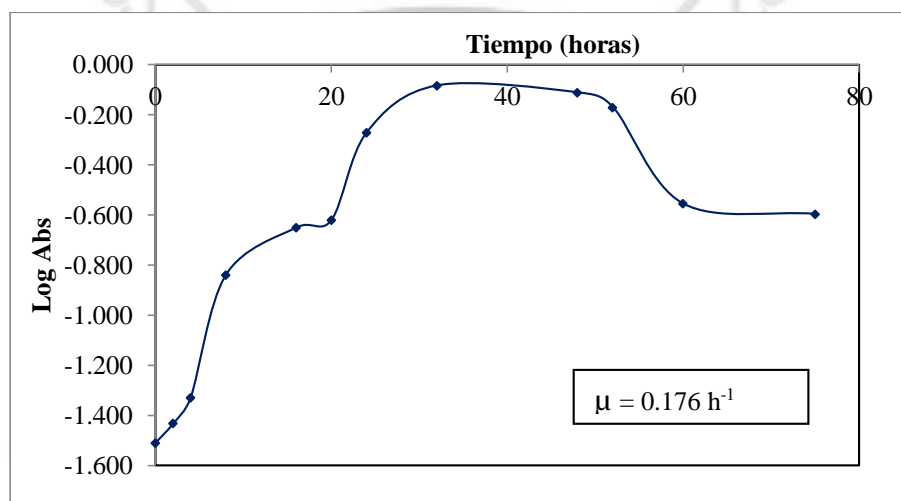


Figura N° 14. Curva de crecimiento de la bacteria *Virgibacillus siamensis* a las 75 horas

En la Figura N° 14 se muestra que la fase logarítmica de la bacteria *Virgibacillus siamensis* inicia a las 4 horas y termina a las 24 horas, requiriendo de 20 horas para su crecimiento, cuya velocidad específica de crecimiento es 0.176 h^{-1} .

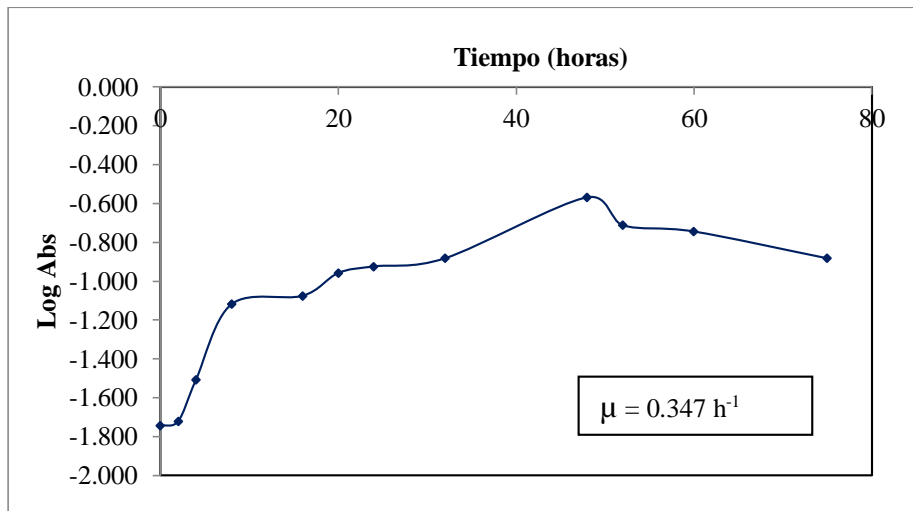


Figura N° 15. Curva de crecimiento de la bacteria *Halobacillus sp.* a las 75 horas

Según la Figura N° 15, la fase logarítmica de la bacteria *Halobacillus sp.* inicia a las 2 horas y termina a las 8 horas, requiriendo de 6 horas para su crecimiento. La velocidad específica del crecimiento es 0.347 h^{-1} .

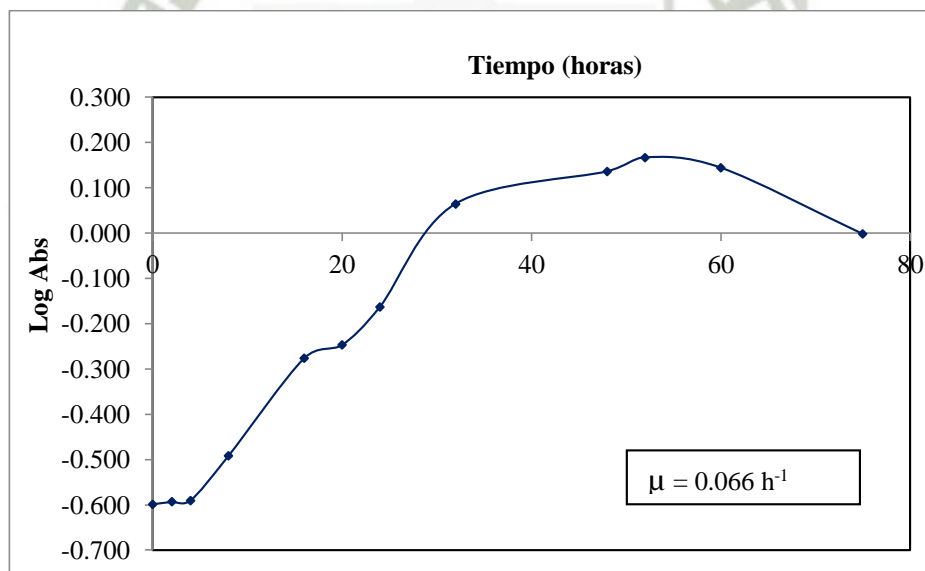


Figura N° 16. Curva de crecimiento de la bacteria *Halobacillus hunanensis* a las 75 horas

Según la Figura N° 16 se muestra que la fase logarítmica de la bacteria *Halobacillus hunanensis* inicia a las 4 horas y termina a las 32 horas, requiriendo de 28 horas para su crecimiento. Su velocidad específica de crecimiento es 0.066 h^{-1} .

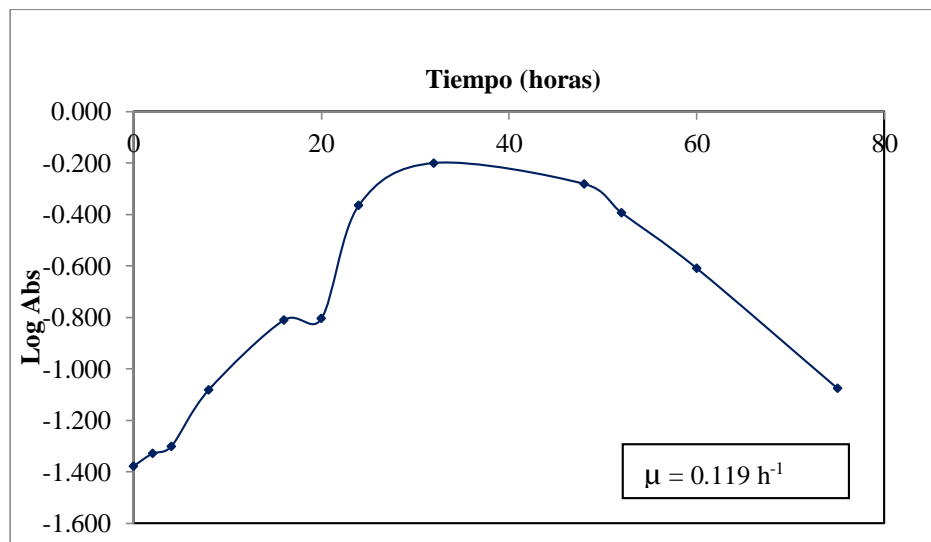


Figura N° 17. Curva de crecimiento de la bacteria *Salinicola zeshunii* a las 75 horas

En la Figura N° 17 se muestra que la fase logarítmica de la bacteria *Salinicola zeshunii* inicia a las 4 horas y termina a las 24 horas, requiriendo 20 horas para su crecimiento. La velocidad específica de crecimiento de la sepa es 0.119 h^{-1} .

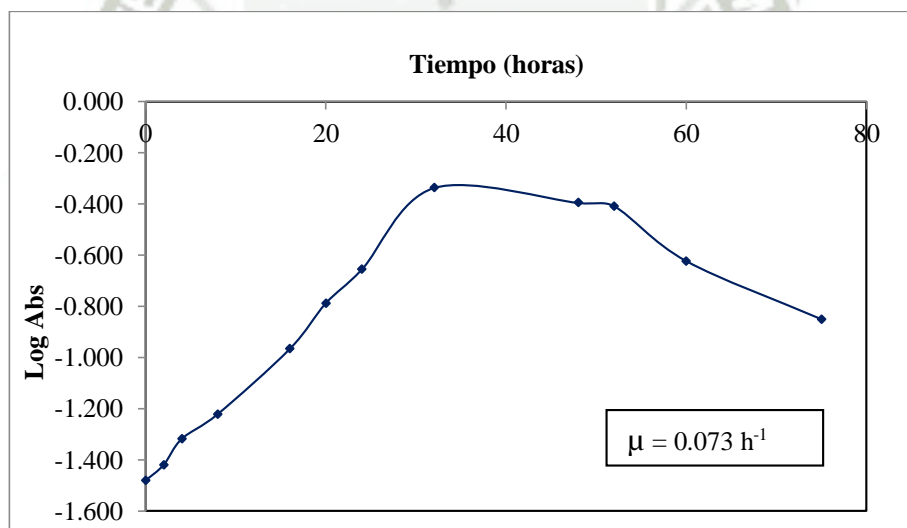


Figura N° 18. Curva de crecimiento de la bacteria *Bacillus halophilus* a las 75 horas

La Figura N° 18 muestra que la fase logarítmica de la bacteria *Bacillus halophilus* inicia a las 2 horas y termina a las 32 horas, requiriendo 30 horas para su crecimiento. La velocidad específica de crecimiento es 0.073 h^{-1} .

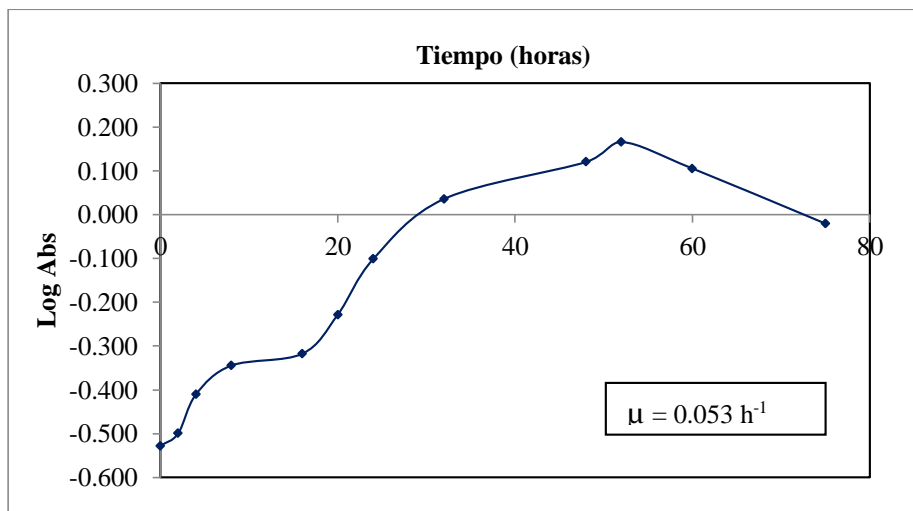


Figura N° 19. Curva de crecimiento de la bacteria *Kushneria sp* a las 75 horas

La Figura N° 19 muestra que la fase logarítmica de la bacteria *Kushneria sp* inicia a las 2 horas y termina a las 32 horas, requiriendo de 30 horas para su crecimiento. Su velocidad específica de crecimiento es 0.053 h^{-1} .

Evaluando las curvas de crecimiento de cada bacteria se puede apreciar que la fase logarítmica en las Figuras N° 14, 16, 17 y 19 muestran un declive a determinada hora debido a la activación metabólica de genes que necesariamente se expresan en el crecimiento bacteriano usando los diferentes sustratos colocados para este fin, pues unos se irán agotando y cada bacteria se verá en la necesidad de usar otros sustratos para completar su crecimiento, al agotarse la fuente orgánica usada para su crecimiento empieza a funcionar el metabolismo secundario (Idiofase) o la fase estacionaria.

Tabla N° 14. Determinación de la Velocidad Específica de Crecimiento

Bacteria	Inicio Fase Logarítmica (horas)	Término Fase Logarítmica (horas)	Inicio Fase Estacionaria (horas)	Término Fase Estacionaria (horas)	Velocidad Específica de Crecimiento (h^{-1})
<i>Virgibacillus siamensis</i>	4	24	24	48	0.176
<i>Halobacillus sp.</i>	2	8	8	48	0.347
<i>Halobacillus hunanensis</i>	4	32	32	52	0.066
<i>Salinicola zeshunii</i>	4	24	24	48	0.119
<i>Bacillus halophilus</i>	2	32	32	52	0.073
<i>Kushneria sp.</i>	4	32	32	52	0.053

La Tabla N° 14 muestra que la bacteria *Halobacillus sp.* tiene la mayor velocidad específica de crecimiento ($0.347 h^{-1}$), mientras que la bacteria *Kushneria sp.* tiene la menor velocidad específica de crecimiento ($0.053 h^{-1}$).

3.6.2. Determinación de la capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl

Curva estándar del medio Caldo Triptona + NaCl:

Tabla N° 15. Medida de la conductividad en diferentes concentraciones de Triptona + NaCl

Conductividad mS/cm	Triptona (2.0 %) + NaCl (X %)
199.40	20
191.30	19
188.60	18
181.60	17
174.50	16
169.00	15

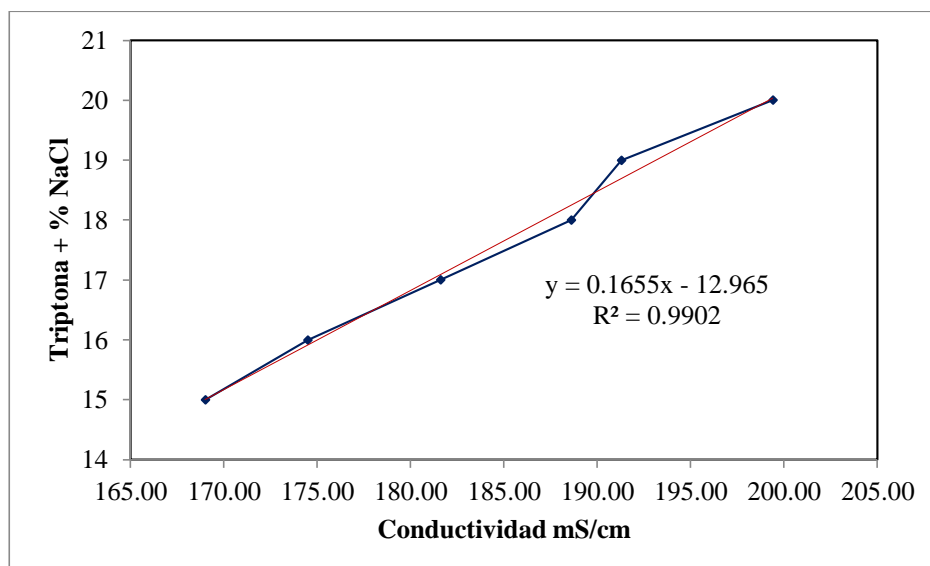


Figura N° 20. Curva estándar de Tryptona+ % NaCl

La elaboración de la curva estándar (Figura N° 20) permite cuantificar el % NaCl consumido por las bacterias halófilas aisladas, aplicando la fórmula hallada para la curva. Se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2=0.9902$ con la siguiente ecuación:

$$y = 0.1655x - 12.965$$

Donde y viene a ser el % NaCl residual en el medio y está en función a x que es la conductividad del medio conteniendo NaCl.

Capacidad de las bacterias halófilas de captar NaCl in vitro:

Tabla N° 16. Conductividad para cada cepa en determinado tiempo y su conversión a % NaCl

Tiempo (horas)	<i>Virgibacillus siamensis</i>			<i>Halobacillus sp.</i>			<i>Halobacillus hunanensis</i>			<i>Salinicola zeshunii</i>			<i>Bacillus halophilus</i>			<i>Kushneria sp.</i>		
	Bact/ml	Conductividad (mS/cm)	% NaCl	Bact/ml	Conductividad (mS/cm)	% NaCl	Bact/ml	Conductividad (mS/cm)	% NaCl	Bact/ml	Conductividad (mS/cm)	% NaCl	Bact/ml	Conductividad (mS/cm)	% NaCl	Bact/ml	Conductividad (mS/cm)	% NaCl
0	24610000	202.60	20.57	3666667	202.60	20.57	9871429	202.60	20.57	30720000	202.60	20.57	23111111	202.60	20.57	56600000	202.60	20.57
8	36010000	190.50	18.56	23000000	182.80	17.29	19871429	191.50	18.73	32770000	185.50	17.74	26111111	177.70	16.44	108600000	178.70	16.61
24	75110000	195.40	19.37	37333333	190.80	18.61	72014286	192.40	18.88	50270000	190.10	18.50	44000000	187.10	18.00	221933333	185.10	17.67
32	104110000	191.20	18.68	41333333	182.90	17.30	139728571	191.23	18.68	60220000	184.30	17.54	70555556	178.60	16.59	320266667	177.40	16.39
48	99010000	191.75	18.77	87666667	191.00	18.65	169442857	192.10	18.83	54820000	185.80	17.78	64111111	184.00	17.49	397933333	180.90	16.97

Se observa en la Tabla N° 16 que la bacteria *Kushneria sp.* tiene mayor capacidad de captar iones NaCl y la *Halobacillus hunanensis* es la bacteria con menor capacidad de captar iones NaCl.

A continuación se presenta la relación de crecimiento bacteriano versus el consumo de sal en % NaCl a través del tiempo:

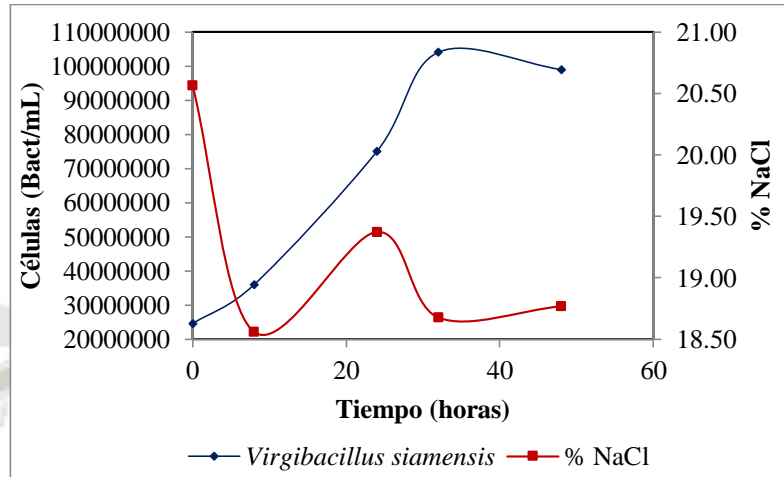


Figura N° 21. Relación crecimiento bacteriano *Virgibacillus siamensis* vs % NaCl en el tiempo

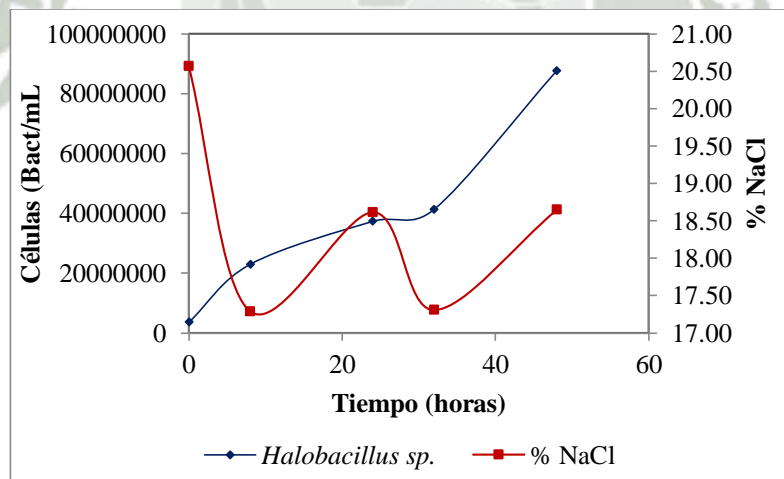


Figura N° 22. Relación crecimiento bacteriano *Halobacillus sp.* vs % NaCl en el tiempo

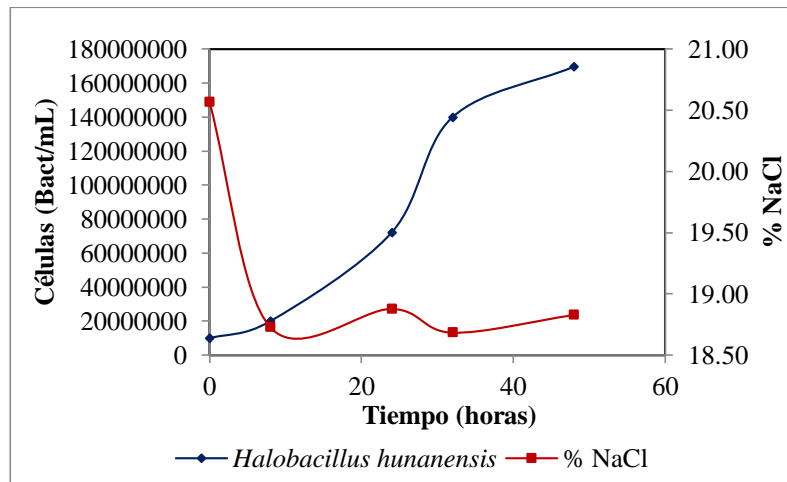


Figura N° 23. Relación crecimiento bacteriano *Halobacillus hunanensis* vs % NaCl en el tiempo

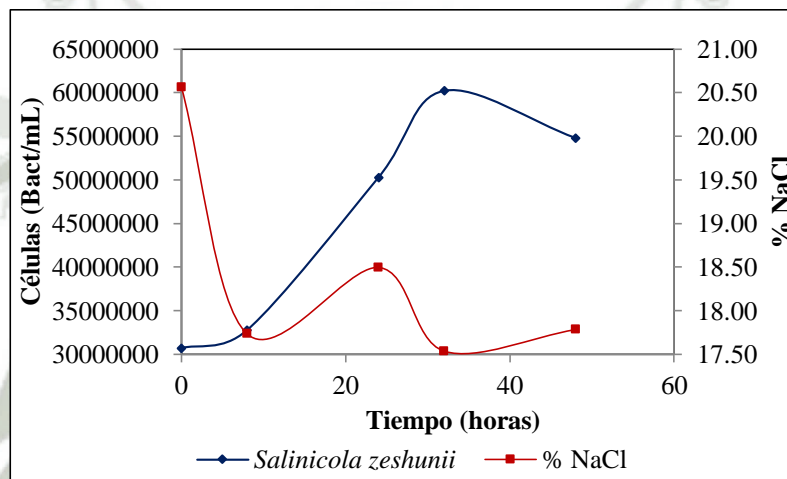


Figura N° 24. Relación crecimiento bacteriano *Salinicola zeshunii* vs % NaCl en el tiempo

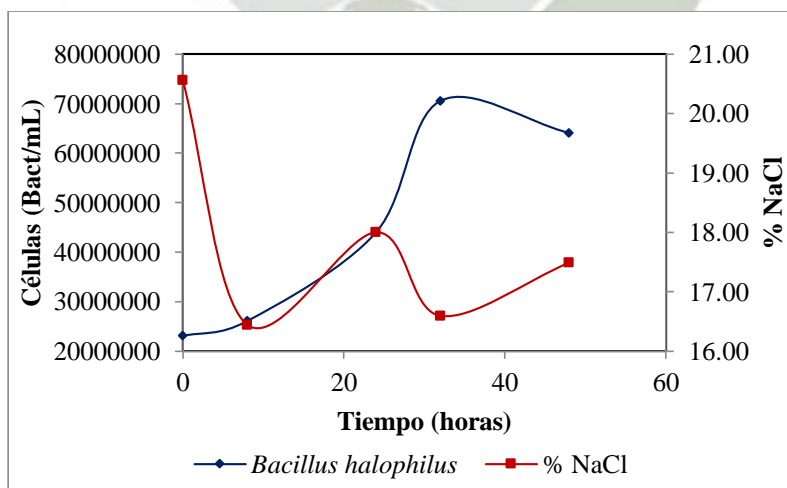


Figura N° 25. Relación crecimiento bacteriano *Bacillus halophilus* vs % NaCl en el tiempo

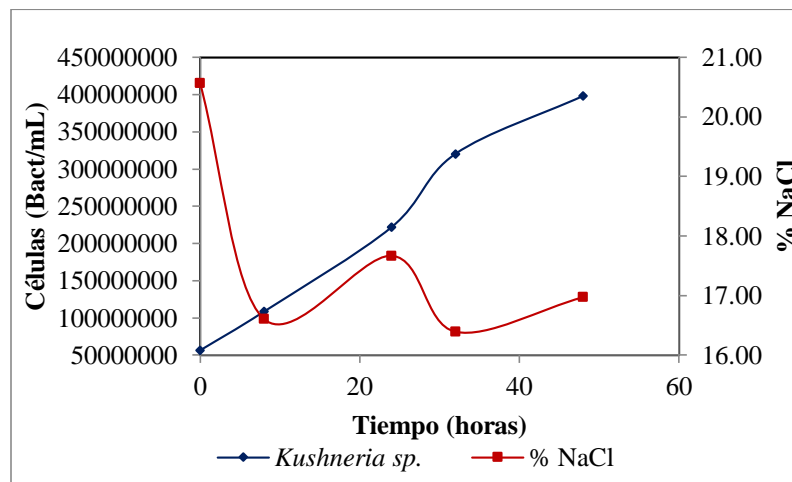


Figura N° 26. Relación crecimiento bacteriano *Kushneria sp.* vs % NaCl en el tiempo

En las Figuras N° 21, 22, 23, 24, 25 y 26 se observa que las bacterias *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis*, *Salinicola zeshunii*, *Bacillus halophilus* y *Kushneria sp.* tienen capacidad de captar NaCl *in vitro* en el transcurso del tiempo, en un medio de cultivo con una concentración inicial de 20.57 % NaCl (202.6 mS/cm), siendo la bacteria *Kushneria sp.* la que presentó mayor capacidad de captar NaCl hasta 16.97 % NaCl (180.9 mS/cm), mientras que *Halobacillus hunanensis* presentó menor capacidad de hasta 18.83 % NaCl (192.1 mS/cm).

Las bacterias aisladas son halófilas no sólo porque crecieron en un medio sólido a una concentración de 20.89 % de NaCl sino como lo comenta Sanchez et al. (2006) son halófilas por su actividad bioquímica donde usa los iones Na^+ y Cl^- en sus diferentes procesos. Garzón (2015), indica que existen 8 mecanismos que pueden realizar las bacterias halófilas para generar un balance osmótico con el medio externo, en 3 de los cuales interviene el ion Na^+ y en 2 el ion Cl^- para que se lleven a cabo.

Se puede apreciar en las Figuras N° 21, 22, 23, 24, 25 y 26 un comportamiento variable con el pasar del tiempo, es decir, disminuye el NaCl en el medio y luego aumenta ligeramente, este proceso se debe al uso de más de un mecanismo en el proceso de balancear las sales en el interior de las células. Por ejemplo si la bacteria emplea el mecanismo 5, 7 u 8 de la Figura N° 2 en donde ingresan los iones Na^+ y Cl^- a la célula entonces la conductividad del medio disminuirá, caso contrario

sucedería con el mecanismo 4 si los iones Na^+ salen de la célula pues la conductividad aumentaría en el medio externo.

El tiempo de la fase estacionaria, no influye en el consumo, también si comparamos el tiempo de la fase estacionaria de todas las bacterias con la capacidad de captar NaCl se observa que guarda una relación inversamente proporcional ya que la bacteria *Halobacillus sp.* que presenta mayor tiempo de fase estacionaria se encuentra dentro de las bacterias que captan menor cantidad de NaCl y del mismo modo la bacteria *Kushneria sp.* que capta mayor cantidad de NaCl se encuentra dentro de las bacterias con menor tiempo de fase estacionaria.



CAPITULO IV. CONCLUSIONES

1. El presente estudio ha demostrado que en la zona de las lagunas de Mejía existen bacterias halófilas. Se aisló 6 diferentes cepas de bacterias halófilas a partir de muestras de agua extraída. Todas presentaron las características según referencia: colonias mucosas, cremosas y morfología bacilar, cuatro fueron gram positivas y dos gram negativas.
2. Bioquímicamente no se ha logrado caracterizar a las cepas aisladas, ya que no se tiene una clasificación establecida que permita comparar con los resultados obtenidos, pero si se ha podido determinar las actividades metabólicas y enzimáticas de las cepas aisladas. Se determinó que todas las cepas aisladas presentan la enzima Lisina descarboxilasa, Oxidasa y solo tres de ellas H1, H4 y H6 la enzima Catalasa. Las cepas H5 y H6 presentan motilidad, siendo esta última la única que fermenta glucosa y lactosa con productos finales ácidos y neutros.
3. Se realizó la caracterización molecular de las bacterias halófilas aisladas con el gen RNAr 16S, las cuales fueron reportadas como *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis* y *Bacillus halophilus* en el caso de las bacterias gram positivas H1, H2, H3 y H5 respectivamente; y como *Salinicola zeshunii* y *Kushneria sp.* en el caso de la bacterias gram negativas H4 y H6 respectivamente.
4. Todas las cepas aisladas presentaron la capacidad de captar NaCl *in vitro*, en un medio de cultivo con una concentración de 20.57 % NaCl (202.6 mS/cm), siendo la bacteria *Kushneria sp.* la que presentó mayor capacidad de captar NaCl hasta 16.97 % NaCl (180.9 mS/cm), mientras que *Halobacillus hunanensis* presentó menor capacidad de hasta 18.83 % NaCl (192.1 mS/cm).

CAPITULO V. RECOMENDACIONES

1. Se debe continuar con estudios enfocados en el aislamiento y caracterización de bacterias halófilas de diferentes zonas de la región Arequipa, ya que servirían para tratar suelos salinos que impiden el crecimiento de plantas.
2. Realizar estudios para aislar bacterias halófilas extremas.
3. Elaborar tablas de pruebas bioquímicas que permitan identificar bacterias halófilas.
4. Realizar pruebas de desalinización de suelos con pruebas en invernadero y campo con el consorcio de bacteria obtenido.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramirez, P. (2016). Condiciones de salinidad y recuperación de los suelos de la cancha pública de golf – San Bartolo, Lima.
2. Garcia, A. (2015). Manejo de suelos con acumulación de sales. VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Colombia.
3. Oliart, R.; Manresa, A. y Sanchez, M. (2016). Utilización de microorganismo de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. Ciencia UAT, Vol. 1, N° 1.
4. Benavides, G. y Hermida, A. (2008). Aislamiento e identificación de la flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde y Guasca, Cundimarca. Colombia.
5. Madigan, M.T. and Mairs, B.L. (1997). Extremophiles. Scientific American, (276): 82-87.
6. Rothschild, L.J. and Manicinielli, R.L. (2001). Life in extreme environments. Nature, (409): 1092-1101.
7. DasSarma, S. and Arora, P. (2002). Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group, 458-466.
8. Kanekar, P.; Kanekar, S.; Kelkar, A. and Dhakephalkar, P. (2011). Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. Microorganisms in Environmental Management, 1-34
9. Russell, N.J. (1993). Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. En: R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds). The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press. USA, 163-210.
10. Audesirk, T.; Audesirk, G. y Byers, B. (2008). Biología: la vida en la tierra. 8va edición.
11. Woese, C.; Kandler, O. and Wheelis, L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya.
12. Sadava, D. and Purves, W. (2009). Life: The Science of Biology.
13. González-Hernández, J. y Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii*.
14. Galinski, A. and Truper, G. (1994). Microbial behaviour in salts stresses ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. 15, 95-108

15. Garzón, V. (2015). Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá. Colombia.
16. Kushner, D. J. and Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In *Halophilic Bacteria*, vol. I, Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press. 109–138.
17. Vreeland, R. H. and Hochstein, L. I. (1992). *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press, 8-23.
18. Dennis, P.P. and Shimmin, L.C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 90-104.
19. Ramirez, N.; Sandoval, A. y Serrano, J. (2004). Las Bacterias Halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v 24 n 1-2.
20. Varela, G. y Grotiuz, G. (2006). *Temas de bacteriología y virología médica*.
21. Parés, R. y Juárez, A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos*.
22. Salmerón, I.; Medina, M. y Sosme, T. (2015). *Medición de metabolitos microbianos. Microbiología de Alimentos*.
23. Ventosa, A.; Nieto, J. and Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2): 504-44.
24. Ventosa, A. and Nieto, J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Micro Biotechnol*, 85-94.
25. Delgado, M.; Valdivia, B.; Aguilar, C.N.; Contreras, J.C. and Rodríguez, R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13): 2575- 2580.
26. Flores, M.; Zavaleta, A.; Zambrano, Y.; Cervantes, L. e Izaguirre, V. (2010). Bacterias Halófilas Moderadas productoras de Hidrolasas de interés biotecnológico, 13(1): 42-46.
27. Canales, P.; Chávez, E. y Zavaleta, A. (2014). Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín.
28. Castillo, L. y Barragán, B. (2011). Aplicaciones Biotecnológicas de microorganismos Halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, Vol. 4 N°2, 45-54.
29. Mata, J.A. (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España.

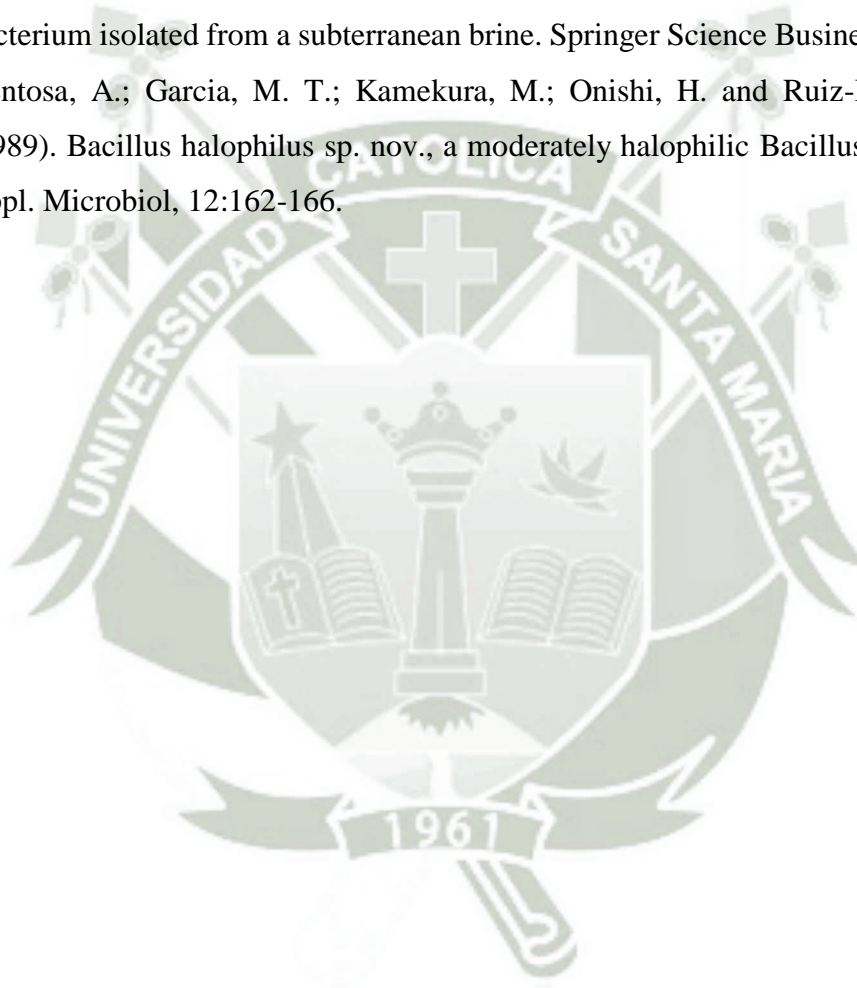
30. Meseguer, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicativo en biotecnología. *Ciencia e Investigación VII*, 2.
31. Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2): 73-83.
32. Ramírez, N.; Serrano, J. A. y Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos Halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(003): 56-71
33. Louis, P. and Galinski, E. (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*.
34. Oren, A.; Guverich, P.; Azachi, M. and Henis, Y. (1993). Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations.
35. Sánchez, L. y Arguello, H. (2006). Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in Vitro y su posible aplicación en bioremediación en suelos salinos-sódicos. *Nova-Publicación científica*, 4(6): 1-114.
36. Betancur, L.; Alvarez, D.; Ramos, A. and Dendooven, L. (2006). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated saline alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, 62:1749-1760.
37. Röling, W. and Van Verseveld, H. (1996). Characterization of *Tetragenococcus halophilus* populations in Indonesian soy mash (kecap) fermentation. *Appl Environ Microbiol*.
38. Spear, J.; Ley, R.; Berger, A. and Pace, N. (2003). Complexity in natural microbial ecosystems: The Guerrero Negro experience. *Biol. Bull*.
39. Narváez, V. (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.
40. Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado SERNANP (2015). Plan Maestro del santuario Nacional Lagunas de Mejía (2015-2019).
41. Forbes, B.; Sahm, D., Weissfeld, A. y Trevino, E. (2009). *Diagnostico Microbiológico*. Edición. 12, 110-233.
42. Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger P. y Woods, G. (2008). *Diagnostico Microbiológico*. Edición 6, 1385-1386.
43. Rodríguez, E.; Gamboa, M.; Hernández, F. y García, J. (2009). *Bacteriología General, Principios y prácticas de laboratorio*. Edición 2, 217-267.

44. Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17.
45. Muyzer G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.
46. Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica, 22:238-45
47. Fernández, A.; García de la Fuente, C.; Saénz, J. y Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
48. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study".
49. Herrera, C. (2002). Use of the 16S RNAr for identification of bacterial isolates in the routine clinical microbiology service. *Journal of Microbiology*.
50. Meneses, C.; Rozo, L. and Franco, J. (2011). Bioinformatics Technologies for the Analysis of DNA sequences. *Scientia et Technica Año XVI, No 49, Diciembre*. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.
51. Kumar, S. and Filipski, A. (2001). *Molecular Phylogeny Reconstruction*.
52. Cañedo, R.; Rodríguez, R. y Vásquez, Y. (2009). Artículos, ACIMED - Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos: un palacio de la información para la medicina molecular. Versión impresa v.19 n.4 Ciudad de La Habana.
53. Altschul, S.; Madden, T.; Schaffer, A.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D. (1997). «Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs». *Nucleic Acids Research*, 25: 389-402.
54. Thompson, J.; Gibson, T.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. and Higgins, D. (1997). The ClustalW windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
55. Jermann, T.; Opitz, J.; Stackhouse, J. and Benner, S. (1995). Reconstructing the evolutionary history of the artiodactyl ribonuclease superfamily. *Nature*, 374: 57-59.
56. Peña, C. (2011). Métodos de inferencia Filogenética. *Rev. Perú. biol.* 18(2): 265-267.
57. Placy, W.; Lanyi, J. and Morris, K. (1974). "Lipid interactions in membranes of extremely halophilic bacteria. 1. Electron Spin resonance and dilatometric studies of bilayer structure". Departamento de química. USA: Universidad de San Francisco, California, 89 - 122.

58. Castillo, L. y Carvajal, B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. México: Laboratorio de Residuos peligrosos. Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, 69 - 102.
59. Engel, T. y Reid, P. (2007). Introducción a la fisicoquímica: Termodinámica, 432-436.
60. Pernasetti, O. (2010). Cátedra de salinidad y sodicidad de los suelos. Catamarca Argentina: Universidad Nacional de Catamarca, 56 – 67.
61. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1992).
62. Holmes-Farley, Randy (2002). Advanced Aquarist. Chemistry and the Aquarium: Specific Gravity: Oh How Complicated!. Volumen I, Enero.
63. Hemdal, J. F. (2006). Advanced Marine Aquarium Techniques. T.F.H. Publications. Neptune City, NJ. 352.
64. Tipler, P. (2004). Physics for Scientists and Engineers: Electricity, Magnetism, Light, and Elementary Modern Physics (5th edición). W. H. Freeman. ISBN 0-7167-0810-8.
65. Villota, T. (2014). Biorremediación de aguas residuales con alta salinidad mediante bacterias halófilas aisladas de perfiles costeros de Ecuador.
66. Castro, L.; Flores, C.; Rodriguez, A.; Aguilar, M.; Aguilar, C. y Rodríguez R. (2011). Aislamiento y Caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, Volumen 3, N°5.
67. Quesada, E.; Ventosa, A.; Rodriguez, F. and Ramos, A. (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soil.
68. Jave, M. (2007). Guía de prácticas de Microbiología.
69. Antoraz, S. (2013). Importancia del sistema de dos componentes AbrA1/A2 de *Streptomyces coelicolor* en la producción de antibióticos y diferenciación mediante el estudio de los mutantes carentes de sus genes. Tesis de biología. Instituto de Biología Funcional y Genómica – Universidad de Salamanca.
70. Franco, M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
71. Skoog, D. A. y Leary, J. J. (1944). Análisis instrumental. Cuarta Edición. Editorial Mcgraw Hill.

72. Escobar, L. F.; Rojas, C. A.; Giraldo, G. A. y Padilla, L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de Ácido Láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Rev. Invest. Univ. Quindío. Armenia – Colombia*, (20): 42 – 49.
73. Fogler, H. S. (2001). *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*. Pearson Education. Estados Unidos.
74. Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado - SERNANP (2015). *Plan Maestro del Santuario Nacional Lagunas de Mejía – Período 2015-2019*.
75. Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of Halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 334 – 348.
76. Fernandez-Jerí, Y.; Zavaleta, A. I. y Arahall, D. R. (2007). Bacterias Halófilas Moderadas aisladas de las Minas Salinas de Atacocha – Ayacucho. *Ciencia e Investigación*, 10 (2) 59-63.
77. Palomino, C. (2014). Obtención de Exopolisacáridos (EPS) con actividad emulsificante de bacterias halófilas de la Laguna de Salinas Aguada Blanca, Arequipa.
78. Sanchez-Porro, C. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* Volume 94, Issue 2, 94(2):295-300.
79. Ventosa, A.; Márquez, M.; Garabito, M. and Arahall, D. (1998). Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, 2: 297-304.
80. Orsod, M. and MaHF, J. (2012). Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. Isolated from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(3): 170-174.
81. Kalimutho, M.; Ramanathan, T.; Ahmad, A. and Ahmad, A. S. (2011). Taxonomical Identity and Polysaccharide Produced by *Bacillus* Species Isolated from Old Aged Medicinal Decoctions. *Journal of Sustainability Science and Management*, 6(1): 2-9.
82. Flores-Fernández, M.; Zavaleta, A. y Chávez-Hidalgo, E. (2010). Bacterias Halotolerantes con Actividad Lipolítica Aisladas de las Salinas de Pilluana San Martín. *Ciencia e Investigación*, 13(2): 87-91.
83. Tanasupawat, S.; Chamroensaksri, N.; Kudo, T. and Itoh, T. (2010). Identification of moderately halophilic bacteria from Thai fermented fish (pla-ra) and proposal of *Virgibacillus siamensis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 56, 369-379.

84. Spring, S.; Ludwig, W.; Marquez, M. C.; Ventosa, A. and Schleifer, K. H. (1996). *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov., and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 46, 492–496.
85. Claus, D.; Fahmy, F.; Rolf, H. J. and Tosunoglu, N. (1983). *Sporosarcina halophila* sp. nov., an obligate, slightly Halophilic bacterium from salt marsh soils. *Syst Appl Microbiol*. 1983, 4, 496–506.
86. Peng, Q. Z.; Peng, Q. J.; Zhang, Y. Q.; Liu, Z. X.; Wang, Y. X.; Li, W. J.; Cui, X. L. and Chen, Y. G. (2009). *Halobacillus hunanensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. Springer Science Business Media B.V.
87. Ventosa, A.; Garcia, M. T.; Kamekura, M.; Onishi, H. and Ruiz-Berraquero, F. (1989). *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Syst. Appl. Microbiol*, 12:162-166.



ANEXOS

ANEXO 1. Toma de muestra



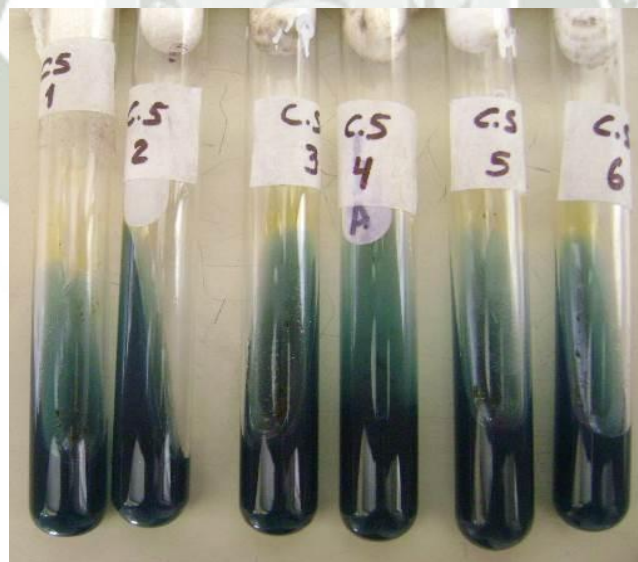
ANEXO 2. Pruebas Bioquímicas



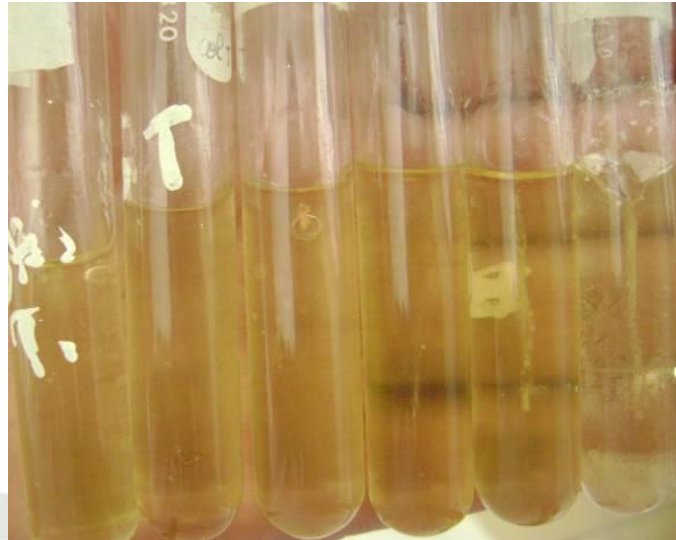
Prueba en Agar TSI



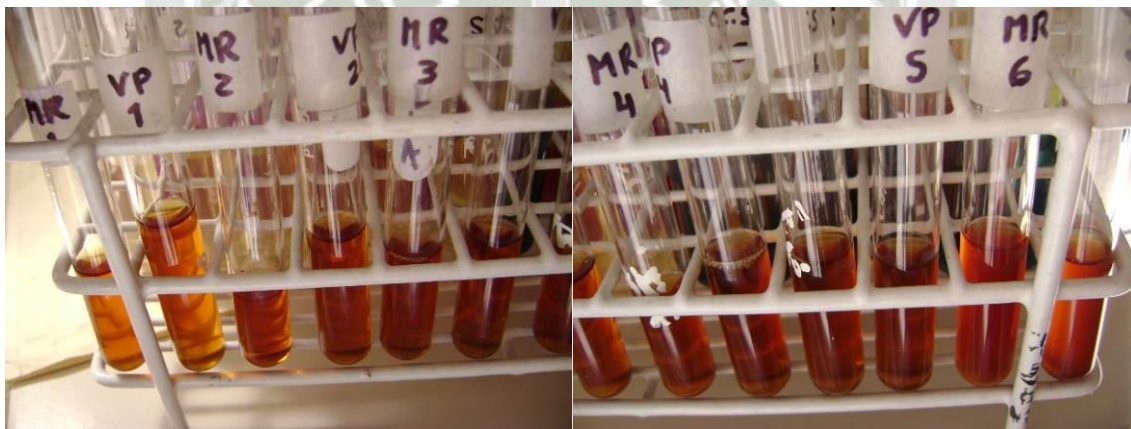
Prueba en Agar LIA



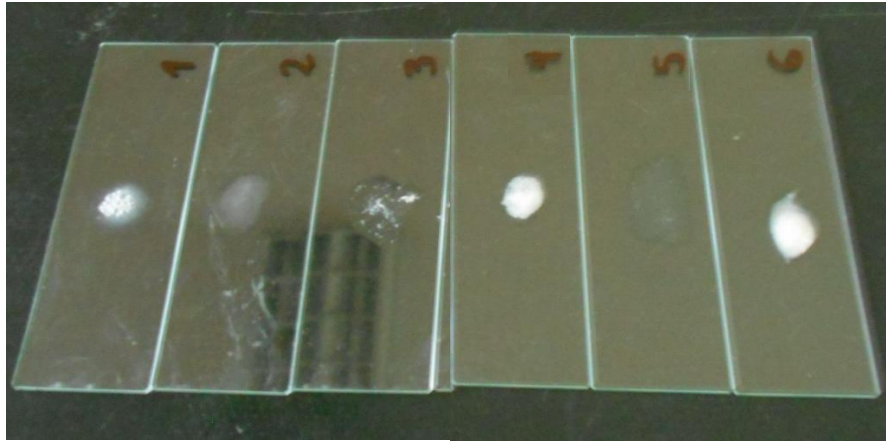
Prueba Citrato de Simmons



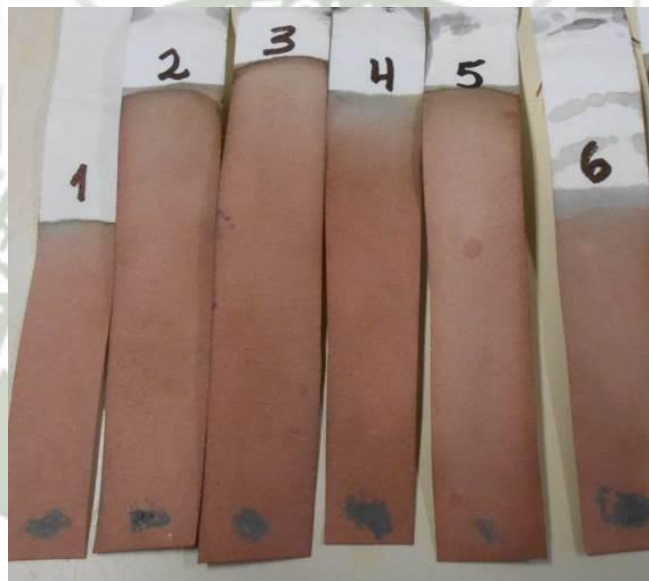
Prueba SIM



Prueba MRVP



Prueba Catalasa

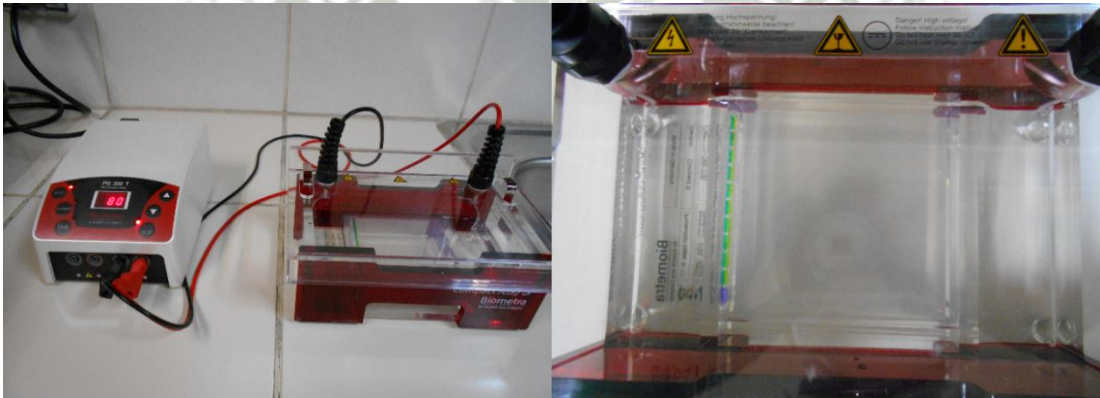
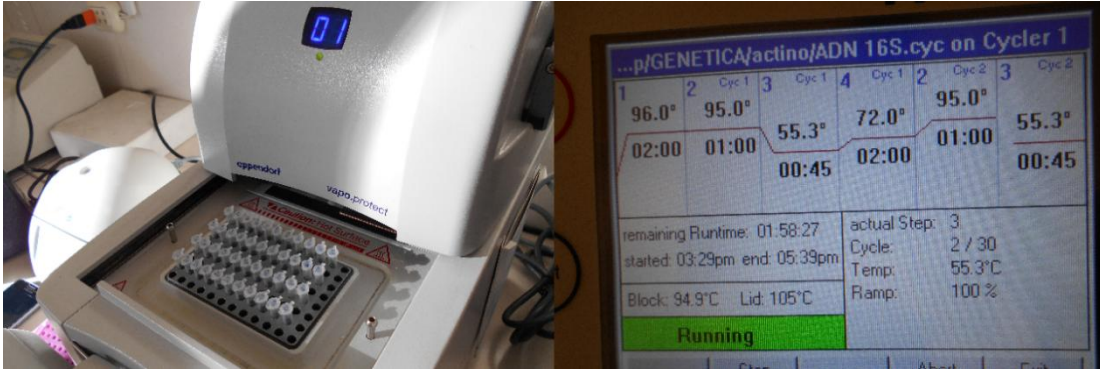


Prueba Oxidasa

ANEXO 3. Extracción de ADN



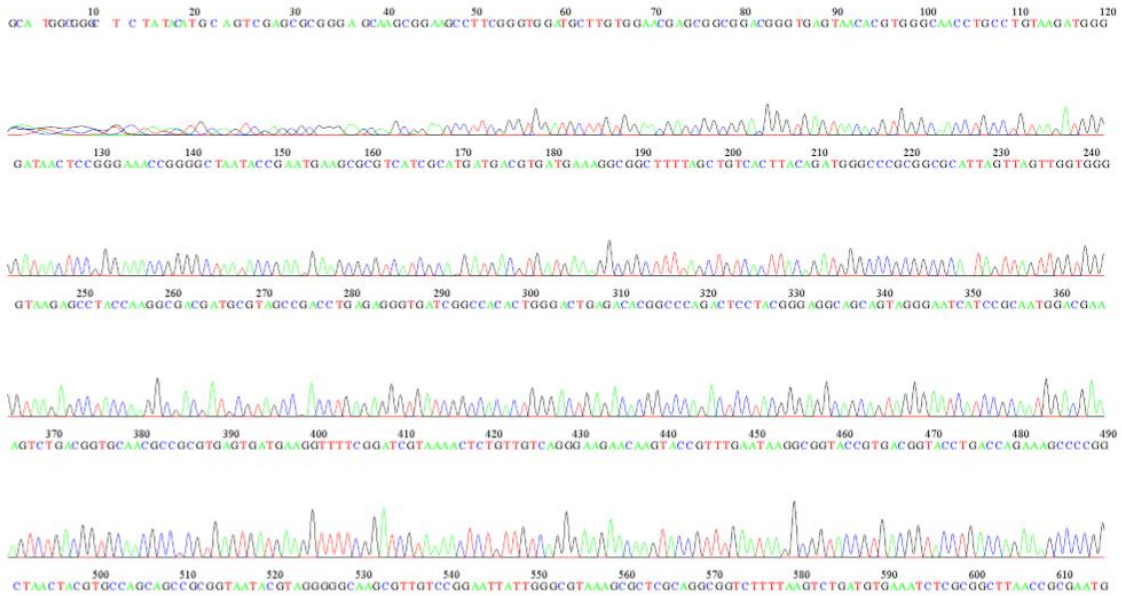
ANEXO 4. PCR



ANEXO 5. Electroferogramas de las cepas

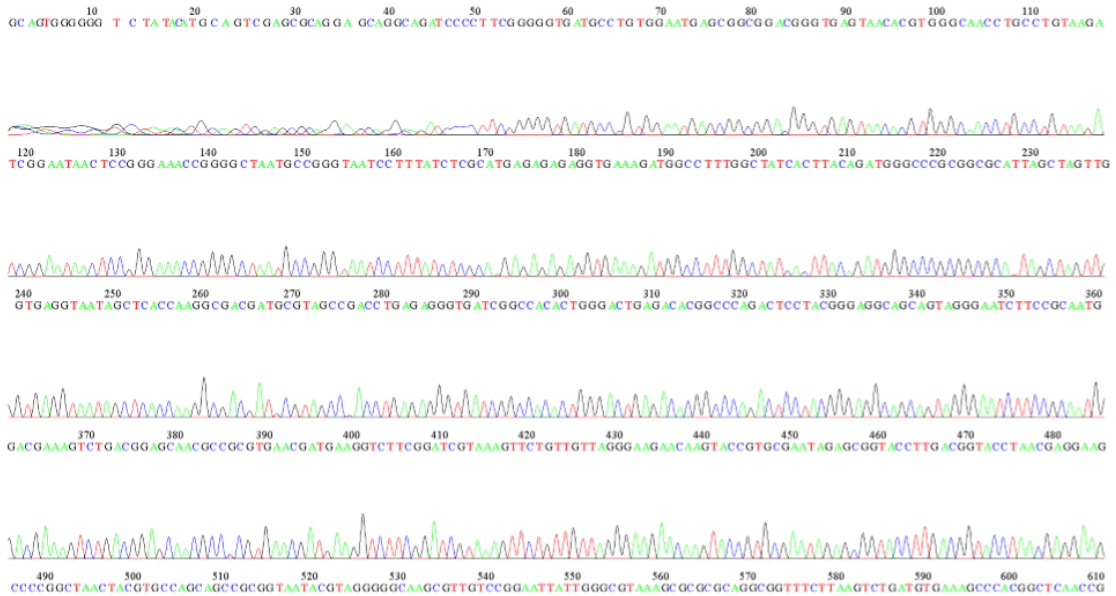
Electroferograma de la cepa H1

File: H1_fD1.ab1 Run Ended: 2017/8/15 6:40:53 Signal G:2238 A:3543 C:4606 T:3547
Sample: H1_fD1 Lane: 24 Base spacing: 15.440254 1294 bases in 15674 scans Page 1 of 2



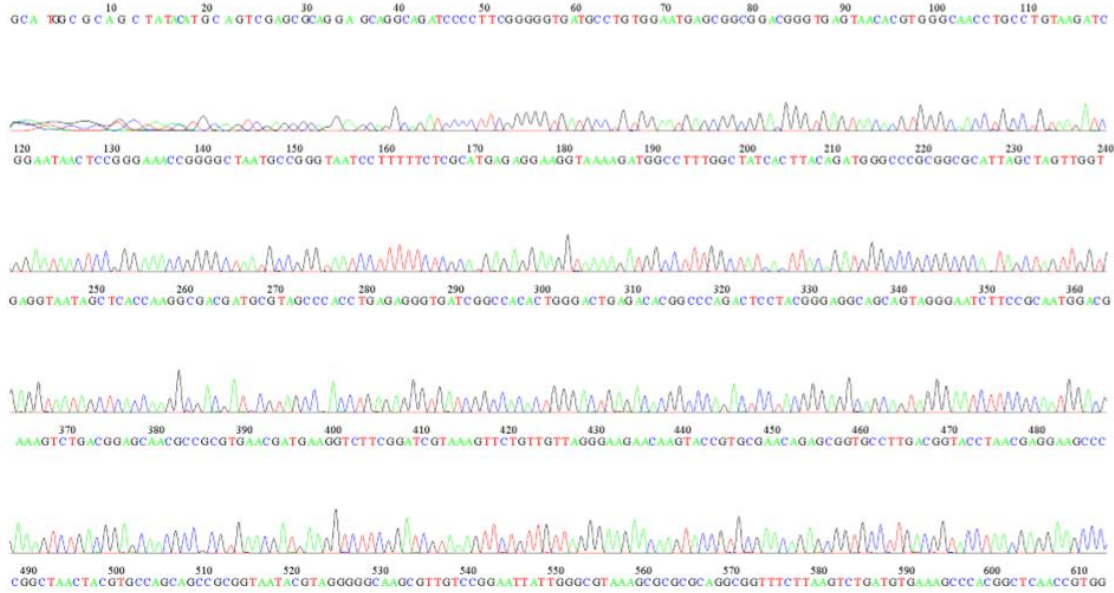
Electroferograma de la cepa H2

File: H2_fD1.ab1 Run Ended: 2017/8/15 6:40:53 Signal G:2407 A:4142 C:5243 T:4133
Sample: H2_fD1 Lane: 20 Base spacing: 15.682416 1251 bases in 15288 scans Page 1 of 2



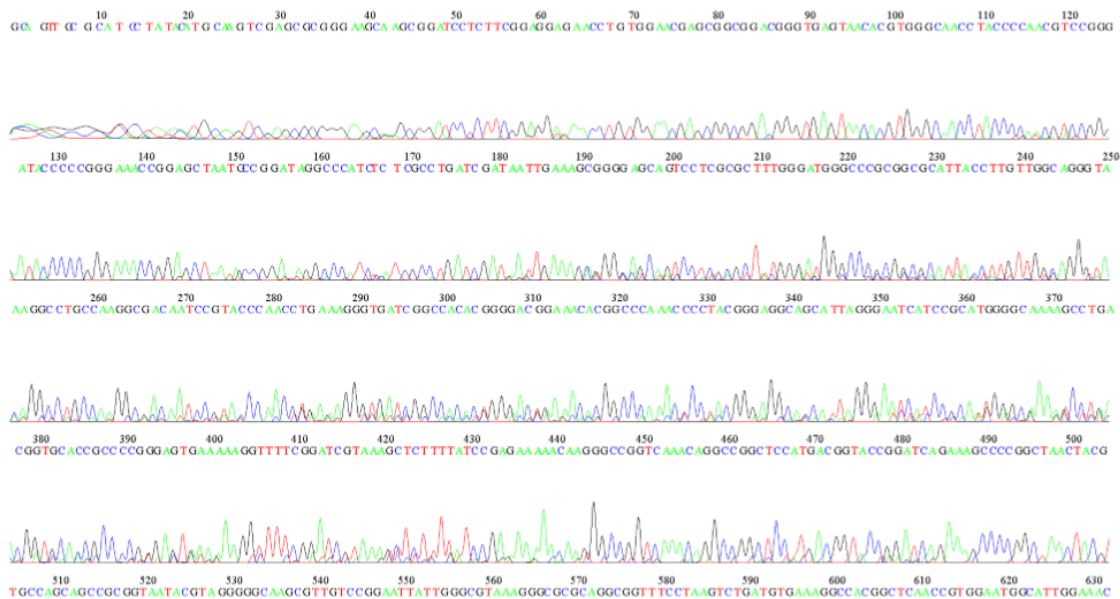
Electroferograma de la cepa H3

File: H3_fD1.ab1 Run Ended: 2017/8/15 6:40:53 Signal G:1922 A:3099 C:4128 T:3168
Sample: H3_fD1 Lane: 47 Base spacing: 15.654493 1255 bases in 15156 scans Page 1 of 2



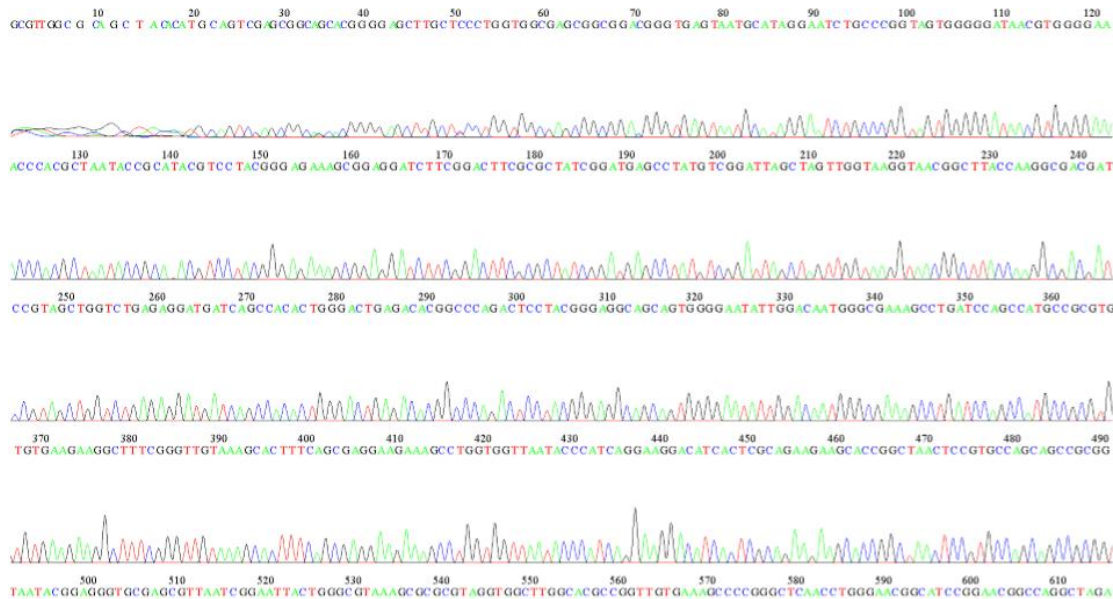
Electroferograma de la cepa H4

File: H4_fD1.ab1 Run Ended: 2017/8/15 6:40:53 Signal G:1693 A:3261 C:4838 T:3051
Sample: H4_fD1 Lane: 43 Base spacing: 15.494369 1283 bases in 15233 scans Page 1 of 2



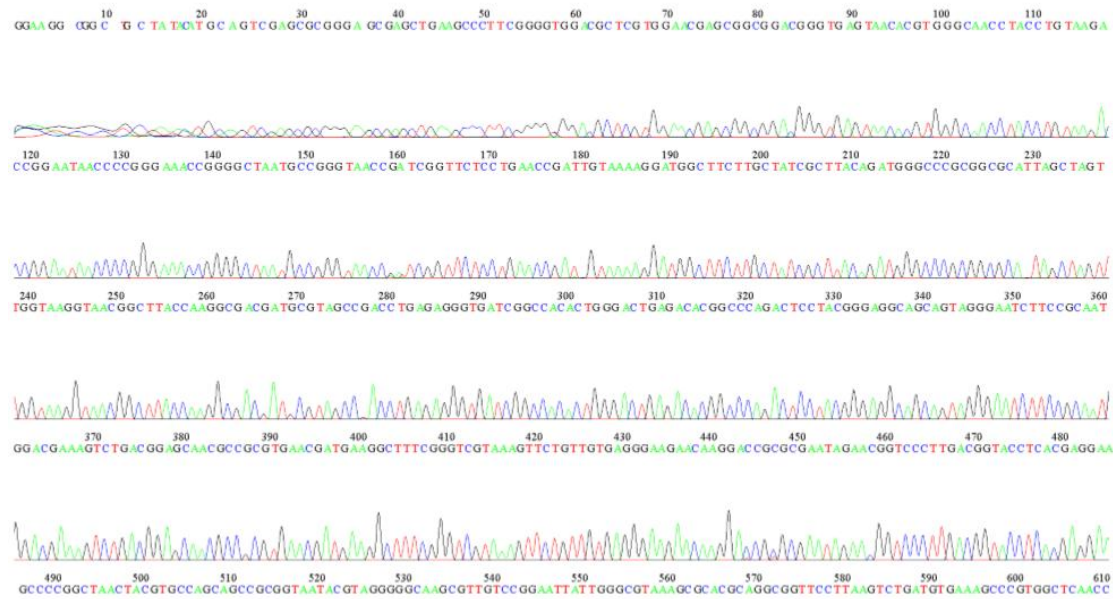
Electroferograma de la cepa H5

File: H5_fD1.ab1 Run Ended: 2017/8/15 6:40:53 Signal G:2474 A:3892 C:5021 T:3713
Sample: H5_fD1 Lane: 39 Base spacing: 15.418792 1293 bases in 15584 scans Page 1 of 2



Electroferograma de la cepa H6

File: H6_fD1.ab1 Run Ended: 2017/8/15 6:40:53 Signal G:2737 A:3830 C:4880 T:3492
Sample: H6_fD1 Lane: 35 Base spacing: 15.566471 1263 bases in 15303 scans Page 1 of 2



ANEXO 6. Determinación del consumo del sal

