

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



# Universidad de La Sabana

**Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia.**

**Vivian Marcela Garzón Rubiano**

Universidad de La Sabana  
Facultad de Ingeniería, Maestría en diseño y gestión de procesos  
Chía, Colombia  
2015



**Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia.**

**Vivian Marcela Garzón Rubiano**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Diseño y Gestión de Procesos con énfasis en Bioprocesos**

Director

Ph.D., Edison Tello Camacho

Asesores:

Ph.D., Zulma Suarez Moreno

Ph.D., Alejandro Acosta

Línea de Investigación:

Bioprospección de microorganismos de ambientes extremos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Bioprospección

Universidad de La Sabana

Facultad de Ingeniería, Maestría en diseño y gestión de procesos

Chía, Colombia

2015

## **Agradecimientos**

A Dios, por haberme dado sabiduría y fortaleza para poder cumplir esta meta, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante mis estudios de maestría.

A mis padres, por creer en mí y ser mi ejemplo a seguir, siendo un apoyo en cada uno de mis sueños, inculcándome diariamente el deseo de superación.

A mi hermano por ser mi amigo incondicional, por apoyarme, motivarme y ayudarme a ser mejor persona y profesional.

A mis tías Carmen y Blanca, por su ánimo y apoyo incondicional.

A mi Director, el profesor Edison Tello, por sus enseñanzas, la orientación, el seguimiento, la supervisión continua del trabajo además del apoyo recibido a lo largo de estos años.

A mis asesores la profesora Zulma Suarez, por ser un apoyo en el desarrollo de mi trabajo y a Alejandro Acosta por la asesoría en la escritura del documento.

A todas las personas, quienes de una u otra forma me ayudaron y acompañaron durante este proceso en especial a Pili y Jorgito, por sus enseñanzas y su apoyo incondicional.

## Tabla de contenido

Resumen.....	XI
Abstract .....	XII
Introducción .....	1
<b>1 MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
1.1 MICROORGANISMOS EN AMBIENTES EXTREMOS.....	1
1.1.1 Ambiente extremo.....	1
1.1.2 Comunidades microbianas en ambientes extremos.....	2
1.2 ECOLOGÍA DE LOS PROCARIOTAS EN AMBIENTES SALINOS.....	3
1.2.1 Arqueas halófilas extremas.....	3
1.2.2 Bacterias halófilas .....	4
1.2.3 Bacterias halófilas presentes en ambientes salinos de acuerdo a la clasificación de halotolerancia. ....	4
1.3 ADAPTACIÓN DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS A AMBIENTES SALINOS .....	6
1.3.1 Acumulación de sales.....	7
1.3.2 Acumulación de compuestos orgánicos .....	7
1.3.3 Modificación de la morfología celular .....	8
1.4 MÉTODOS REPORTADOS EN LA LITERATURA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	9
1.4.1 Características fenotípicas .....	9
1.4.2 Secuencias del gen 16S ARNr .....	10
1.5 FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO .....	11
1.5.1 Composición del medio de cultivo .....	11
1.5.2 Condiciones ambientales .....	11
1.6 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS HALÓFILAS.....	12
1.6.1 Producción de enzimas .....	13
1.6.2 Producción de biopolímeros .....	13
1.6.3 Producción de compuestos antibióticos.....	14
1.6.4 Producción de Biosurfactantes .....	15
1.6.5 Quorum sensing.....	15
1.7 ESTADO DEL ARTE .....	16
1.7.1 Bacterias halófilas y ecosistemas salinos.....	17
1.7.2 Producción de biosurfactantes, haloenzimas, antibióticos e inhibidores de quorum sensing en bacterias halófilas .....	17
1.7.3 Biodiversidad en Colombia .....	21
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE MUESTREO .....	23

3.1.1	Descripción de las zonas de muestreo .....	23
3.1.2	Recolección de las muestras .....	25
3.1.3	Inoculación de las muestras .....	26
3.2	AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....	27
3.2.1	Incubación de las muestras en los medios de cultivo .....	27
3.2.2	Aislamiento de las cepas microbianas.....	27
3.2.3	Conservación de las cepas aisladas .....	27
3.3	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA .....	27
3.3.1	Morfología de las células bacterianas aisladas .....	27
3.3.2	Motilidad de las células bacterianas .....	28
3.4	CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA .....	28
3.5	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO.....	29
3.5.1	Determinación del medio de cultivo óptimo .....	29
3.5.2	Determinación de los parámetros óptimos de crecimiento .....	30
➤	Temperatura, Salinidad y pH óptimo .....	30
➤	Metabolismo de respiración microbiano .....	30
3.6	DETERMINACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS Y SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	31
3.6.1	Utilización de sustratos orgánicos.....	31
3.6.2	Determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos .....	31
3.7	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS .....	32
3.7.1	Actividad antibiótica.....	32
3.7.2	Detección de la producción de enzimas hidrolíticas .....	32
3.7.3	Métodos para la determinación de biosurfactantes en las muestras provenientes de las bacterias halófilas aisladas .....	33
➤	Actividad biológica de los biosurfactantes.....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
4.1	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LAS ZONAS DE MUESTREO .....	36
4.1.1	Características físico-químicas del agua de las zonas I y IV.....	36
4.2	AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALÓFILAS.....	38
4.2.1	Características morfológicas de los aislados bacterianos .....	38
4.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO.....	40
4.3.1	Crecimiento en distintos medios de cultivo para bacterias halófilas .....	40
4.3.2	Temperatura, pH y metabolismo de respiración .....	41
4.3.3	Concentración de NaCl.....	41
4.4	DIVERSIDAD DE LAS BACTERIAS AISLADAS .....	41
4.4.1	Clasificación taxonómica .....	41
➤	Filo y-Proteobacteria.....	45
➤	Filo Firmicutes.....	51
4.4.2	Diversidad de las bacterias halófilas por zonas de aislamiento .....	61
4.5	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CEPAS AISLADAS Y LOS EXTRACTOS.....	62
4.5.1	Actividad antibiótica de las cepas .....	62
4.5.2	Detección de la producción de enzimas hidrolíticas .....	63
4.5.3	Obtención de extractos de las bacterias halófilas .....	65
4.6	DISCUSIÓN GENERAL .....	70

<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO 1: FOTOGRAFÍAS DE LAS CEPAS HALÓFILAS AISLADAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS HALÓFILAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO 3. PRIMERS USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S RNAR .....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO 4: EQUIPOS, REACTIVOS Y SOFTWARE.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS HALÓFILAS AISLADAS.....</b>	<b>86</b>

## Lista de figuras

	PÁG.
Figura 1. Clasificación extremófilos tomada de Mata, 2006. <sup>12</sup> .....	2
Figura 2. Distribución de los microorganismos halófilos en el árbol de la vida. Tomada de Oren, 2002. <sup>5</sup> .....	3
Figura 3. Movimiento de iones en microorganismos halófilos <sup>32</sup> .....	7
Figura 4. Método cualitativo de microplatos <sup>55</sup> .....	15
Figura 5. Mecanismo de señalización de <i>quorum sensing</i> .....	16
<b>Figura 6.</b> Ubicación geográfica de Zipaquirá en Colombia. ....	23
Figura 7. Zona I – Pozo Reja.....	24
Figura 8. Zona II - Pared Marmaja .....	24
Figura 9. Zona III - infiltración de agua. A. Roca presente en el suelo de la zona III. B. Parte superior del socavón zona III. ....	25
Figura 10. Zona IV - Camerino .....	25
Figura 11. Coloración de Gram. A. Bacilos Gram positivos de la cepa 432. B. Bacilos Gram negativos cepa 3S31 .....	39
Figura 12. Tinción negativa con tinta china de la cepa 137.....	40
Figura 13. Prueba de motilidad de la cepa 1S32 en agar TSA + NaCl semisólido.....	40
Figura 14. Árbol filogenético generado para las familias <i>Halomonadaceae</i> , <i>Rhodobacteraceae</i> y <i>Micrococcaceae</i> . ....	43
Figura 15. Árbol filogenético generado para las familias <i>Staphylococcaceae</i> y <i>Bacillaceae</i> . ....	50
Figura 16. Prueba <i>T-streak</i> en agar TSA + NaCl de la cepa 415 contra las cepas patógenas evaluadas y <i>C. violaceum</i> ATCC 31592. ....	63
Figura 17. Halo de hidrólisis de la cepa 1S31 en agar TSA + NaCl suplementado con almidón y revelado con lugol. ....	64
Figura 18. A. Distorsión de la cuadrícula, generada por el sobrenadante proveniente de la cepa 444T mediante el método de microplatos. B. Matriz gelatinosa sintetizada por la cepa 444.....	68
Figura 19. Halo de Inhibición generado por el extracto de la cepa 444 frente a <i>K. pneumoniae</i> ..	69
Figura 20. Perfil de infrarrojo del extracto proveniente de la cepa 444 perteneciente al género <i>Oceanobacillus</i> .....	69

## Lista de tablas

	PÁG.
Tabla 1. Enzimas producidas por microorganismos halófilos <sup>12</sup> .....	13
Tabla 2. Estudios recientes enfocados en el aislamiento de bacterias halófilas. ....	20
Tabla 3. Procesamiento de las muestras <i>In situ</i> y en <i>Ex situ</i> .....	26
Tabla 4. Condiciones óptimas de crecimiento de las cepas aisladas. ....	30
Tabla 5. Condiciones físicas de cada sitio de muestreo .....	36
Tabla 6. Características fisicoquímicas del agua de las zonas I y IV .....	37
Tabla 7. Número de cepas halófilas aisladas de cada zona de muestreo.....	38
Tabla 8. Morfología microscópica de las cepas aisladas en distintas concentración de NaCl.....	39
Tabla 9. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Chromohalobacter</i> . ....	45
Tabla 10. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Chromohalobacter</i> . ....	46
Tabla 11. Sensibilidad a antibióticos de los géneros aislados.....	47
Tabla 12. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Halomonas</i> .....	48
Tabla 13. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Halomonas</i> . ....	49
Tabla 14. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Oceanobacillus</i> .....	51
Tabla 15. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Oceanobacillus</i> . ....	53
Tabla 16. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Bacillus</i> . ....	54
Tabla 17. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Bacillus</i> . ....	55
Tabla 18. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Staphylococcus</i> .....	56
Tabla 19. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Staphylococcus</i> . ....	57
Tabla 20. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Paracoccus</i> . ....	58
Tabla 21. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Paracoccus</i> .....	59
Tabla 22. Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género <i>Kocuria</i> . ....	60
Tabla 23. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género <i>Kocuria</i> . ....	61
Tabla 24. Pruebas cualitativas y presencia de matriz gelatinosa generada por el biosurfactante de las bacterias halófilas. ....	66
Tabla 25. Actividad biológica de las cepas aisladas contra cepas patógenas ATCC e inhibición de <i>quorum sensing</i> .....	67

**Nota:** La universidad no se hace responsable por las opiniones contenidas en el presente documento que son exclusiva responsabilidad del autor.

## Resumen

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, reconocido por su amplia variedad de especies vegetales y animales, situación que permite intuir un perfil megadiverso en las poblaciones de microorganismos, el cual se ha evidenciado en un sin número de estudios funcionales dirigidos a la identificación de bacterias. Entre las distintas adaptaciones de los procariotas se encuentran, los microorganismos halófilos, que se destacan por vivir en altas concentraciones de NaCl en lugares inhóspitos como las salinas (terrestres y marinas), y que, a su vez, han demostrado poseer un gran potencial biotecnológico, encontrándose involucrados en la producción de enzimas, polímeros y solutos compatibles de gran uso en distintas industrias como la farmacéutica, la alimentaria, la cosmética y la petrolera, entre otras.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio busca contribuir a los estudios de biodiversidad bacteriana en ambientes extremos, mediante el aislamiento e identificación de las bacterias halófilas provenientes de la mina de sal de Zipaquirá, Colombia. Para ello, los sitios de recolección se escogieron de acuerdo a la disponibilidad de agua presente en los socavones, las muestras fueron inoculadas en medios nutritivos a diferentes concentraciones de NaCl 1%-30% (w/v), incubadas a 25-37 °C (óptimo 30°C), con diferentes rangos de pH (óptimo pH 7) y bajo condiciones aerobias y anaerobias. A continuación se realizaron análisis comparativos basados en secuenciación del gen 16S ARNr, mediante la extracción de DNA y su posterior amplificación. Así mismo, se incluyeron estudios morfológicos, bioquímicos, perfil de resistencia a antibióticos y evaluación de distintas actividades biológicas.

De los estudios anteriores se aislaron 41 cepas, siendo 13 nuevas especies, ya que presentaron un bajo porcentaje de similitud (<98,7), dentro de los géneros aislados se encuentran, *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Paracoccus*, *Kocuria* y *Staphylococcus*; con un amplio perfil bioquímico, producción de enzimas hidrolíticas, biosurfactantes, antibióticos e inhibidores de los sistemas de *quorum sensing*, lo anterior permite concluir que la mina de sal de Zipaquirá, es una reserva de diversidad bacteriana con un gran potencial bioactivo de gran uso en diferentes industrias.

**Palabras clave:** Árbol filogenético, Biosurfactante, Halófilo, Halotolerante, Gen 16S rARN, Microorganismo extremo.

## **Abstract**

Colombia is one of the most biodiverse countries in the world, known by its wide variety of fauna and flora that suggests a megadiverse profile of microorganisms, which has been evidenced in a significant number of studies aimed to the identification of bacteria. Among several adaptations of prokaryotes, there are halophilic microorganisms, that live in high concentrations of NaCl in inhospitable places like salt (terrestrial and marine), and additionally exhibit high biotechnological potential being involved in the production of enzymes, polymers, and compatible solutes used in several industries, such as pharmaceutical, food, cosmetics, and oils, among others.

For that reason, the aim of this study is to isolate halophilic bacteria, in order to contribute to the studies of bacterial biodiversity in the country, by means of the isolation and identification of the bacteria from salt sediments located in Zipaquira salt mine. Harvesting areas were chosen according to the availability of water in the tunnels. Samples were inoculated into nutrient media at different concentrations of sodium chloride 1%-30% (w/v), incubated at 25-37 °C (optimal 30°C), in a range of pH (optimum pH 7), and under aerobic and anaerobic conditions separately. Single colonies were identified based on comparative analysis of 16S rRNA gene. Then, morphological studies (macroscopic and microscopic), biochemical, antibiotic resistance profiles and evaluation of different biological activities were also established.

In conclusion, 41 strains were isolated, being 13 new species that showed low percentage of similarity (<98.7). Some of the genus isolated include *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Paracoccus*, *Kocuria* and *Staphylococcus*. Additionally, they exhibited a large biochemical profile, high production of hydrolytic enzymes, biosurfactants, antibiotics, and they are also inhibitors of quorum sensing systems. The above results let us to conclude that, Zipaquira's salt mine is a reservoir of bacterial diversity with bioactive potential for further uses in different industries.

**Keywords:** Phylogenetic tree, Biosurfactant, Halophilic, Halotolerant, Gen ARNr 16S, Extreme microorganism.

## Introducción

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, reconocido por su amplia variedad de biota, distribuida en diferentes ambientes que van desde los áridos desiertos de la Guajira, pasando por salinas, bosques de niebla, fértiles valles interandinos, sabanas inundables y páramos, hasta las selvas húmedas de la Amazonia.<sup>1</sup> Dentro de estos ambientes se encuentran los ecosistemas extremos como el Desierto de la Tatacoa (Huila) y el Desierto de la Guajira (Guajira), cavernas como la del Edén (Tolima), fuentes termales, tanto magmáticas y telúricas, como el Galeras (Nariño), fumarolas (Huila), nevados (Caldas), además salinas tanto terrestres como acuáticas.<sup>2</sup>

Las salinas se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de sal;<sup>3</sup> que las convierten en ambientes poco favorables para la mayoría de bacterias<sup>4</sup>, y que les confieren características particulares<sup>5,6</sup> como la producción de metabolitos halotolerantes de gran importancia para la industria entre los que se encuentran enzimas,<sup>7</sup> biosurfactantes y exopolisacáridos<sup>8</sup> sin embargo, la mayoría de estudios se enfocan en la producción de metabolitos por cepas aisladas del mar

---

<sup>1</sup> Diaz, J. **2012**. *Ambientes extremos de Colombia*. Cali-Colombia: IM Editores.

<sup>2</sup> Rangel, O. **2011**. Colombia Diversidad Biótica I. Publicación institucional del Instituto de ciencias naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Bogotá.

<sup>3</sup> Posada, Y.; Pachon, L.; Agudelo, A.; Álvarez, E.; Diaz, C.; Fardeau, M.; Joulain, C.; Olliber, B.; Baena, S. **2004**. Cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyaca. *Revista Colombiana de Biotecnología*, VI (2), 90-100.

<sup>4</sup> Yanine, H. *Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los rios Otún y la Vieja*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. **2010**.

<sup>5</sup> Newman, D.; Cragg, G. **2007**. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461–77

<sup>6</sup> Oren, A. **2002**. Diversity of halophilic microorganism: Environments phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 56–63.

<sup>7</sup> Gesheva, V.; Vasileva, E. **2012**. Production of enzymes and antimicrobial compounds by halophilic Antarctic *Nocardioideus* sp. grown on different carbon sources. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(5), 2069–76.

<sup>8</sup> Jadhav, V.; Yadav, A.; Shouche, Y.; Aphale, S.; Moghe, A.; Pillai, S.; Bhadekar, R. **2013**. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination*, 318, 64–71.

Muerto en Israel, el Gran lago salado en EEUU, salinas en India, suelos salados en México y minas de sal en Pakistán y China,<sup>9,10</sup> entre otros.

Uno de los lugares del país donde se presenta este tipo de ecosistemas es la mina de sal de Zipaquirá, la cual es un yacimiento subterráneo de sal que tiene como propósito la explotación de roca salina desde tiempos previos a la llegada de los españoles hasta nuestros días. Aunque existen gran variedad de reportes sobre la extracción de sal, no se evidencian estudios en la literatura que describan la distribución de las comunidades bacteriana y el papel que desempeñan en este ecosistema; caracterizado según sus condiciones de salinidad, por ser un hábitat ideal para el desarrollo de bacterias halófilas.<sup>5,10</sup>

Debido a lo anterior este trabajo se enfoca en el estudio de las cepas bacterianas, provenientes de ambientes salinos de la mina de sal de Zipaquirá-Colombia, considerando su potencial biotecnológico en cuanto a producción de enzimas, biosurfactantes, antibióticos e inhibidores de *quorum sensing*.

Para ello se seleccionaron 4 zonas ubicadas dentro de la mina de sal, tomando muestras aleatorias las cuales fueron inoculadas en diferentes medios enriquecidos suplementados con NaCl. La composición de las comunidades bacterianas fue estudiada mediante el aislamiento e identificación fenotípica y genotípica, utilizando como marcador molecular la subunidad pequeña del gen 16S ARNr. Por otra parte para establecer el potencial bioactivo se utilizaron diferentes técnicas como *Kirby Bauer*, medición de la tensión superficial, pruebas cualitativas para identificar la presencia de biosurfactantes y ensayos en distintos medios de cultivo para evidenciar la producción de enzimas.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que las 4 zonas muestreadas presentan una biodiversidad microbiana asociada a bacterias halófilas con potencial bioactivo y una amplia diversidad taxonómica, evidenciada en la posible presencia de 13 especies nuevas teniendo en

---

<sup>9</sup> Castillo, L.; Barragán, B. **2011**. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45-54.

<sup>10</sup> Ramírez, N.; Sandoval, A.; Serrano, J. **2004**. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 12-23.

cuenta la similitud de algunas secuencias del ARNr 16S de los aislados que presentaron menos del 98,7% de similitud con secuencias de microorganismos halófilos cultivables.<sup>11</sup>

El conocimiento aquí generado aporta una contribución significativa de la composición, características fenotípicas – genotípicas y distribución de las cepas bacterianas aisladas de la mina de sal de Zipaquirá además de su gran potencial a nivel industria, siendo de gran utilidad en el desarrollo de nuevas investigaciones desde el punto de vista bioprospectivo.

---

<sup>11</sup> Yarza, O.; Yilmaz, P.; Priesse, E.; Glöckner, F.; Ludwig, W.; Schleifer, K.; Whitman, W.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rosselló, R. **2014**. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature reviews*, 12, 635-645



# 1 MARCO TEÓRICO

En este capítulo se abordará el fundamento teórico sobre el cual se basa esta investigación, resaltando las publicaciones sobre bacterias halófilas presentes en ambientes hipersalinos y su potencial bioactivo a nivel internacional y nacional.

## 1.1 Microorganismos en Ambientes extremos

Los ecosistemas colombianos son de gran interés para investigadores debido a que, combinan condiciones meteorológicas y físico-químicas, que permiten el desarrollo y proliferación de microorganismos con un gran potencial bioactivo.<sup>2</sup> Dentro de estos ecosistemas se encuentran zonas con ambientes hostiles denominados “Ambientes Extremos”.<sup>5</sup>

### 1.1.1 Ambiente extremo

Ambiente extremo es aquel donde se presentan valores extremos de determinados parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH, presión hidrostática, potencial redox, salinidad, irradiación solar, concentración de nutrientes o metales tóxicos; condiciones inusuales que son poco favorables o letales para la mayoría de organismos.<sup>5,9</sup>

Dentro de los ambientes extremos se encuentran los **ambientes hipersalinos**, caracterizados por contener salinidades superiores al 30% (p/v); además de características ambientales específicas tales como elevadas o bajas temperaturas, elevados niveles de pH, una baja actividad de agua ( $a_w$ ) y bajas concentraciones de oxígeno, factores que le atribuyen la característica de ser un ambiente inhóspito.<sup>9</sup>

Los ambientes salinos se clasifican en **talasosalinos** y **atalosalinos**.<sup>5</sup> Los primeros son aguas marinas distribuidas en zonas cálidas, que por evaporación solar se genera una concentración de sales semejante a la del mar.<sup>10</sup> Este es el caso del gran lago salado (EEUU) y las salinas de Manaure ubicadas en La Guajira-Colombia, mientras que las aguas atalosalinas están formadas por disoluciones de depósitos minerales de origen continental, en donde predominan cationes de Calcio y Magnesio por lo que, la concentración de sales es diferente a la del mar,<sup>12,13</sup> como es el caso del Mar Muerto (Israel, Jordania), algunos lagos hipersalinos de la Antártida y la mina de sal de Zipaquirá.

---

<sup>12</sup> Mata, J. *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. España. 2006.

<sup>13</sup> Ruiz, A. *Las Salinas de Malaha*. Tesis Doctoral. Línea de Investigación en cultura material /etnoarqueología. Universidad de Granada. España. 2010

### 1.1.2 Comunidades microbianas en ambientes extremos

Los microorganismos que requieren para su desarrollo condiciones extremas se denominan **microorganismos extremófilos**.<sup>5</sup> En las últimas décadas, los estudios basados en estos microorganismos han puesto de manifiesto que la diversidad taxonómica presente en los ambientes extremos no es tan reducida como se pensó inicialmente<sup>5</sup> (Figura 1).

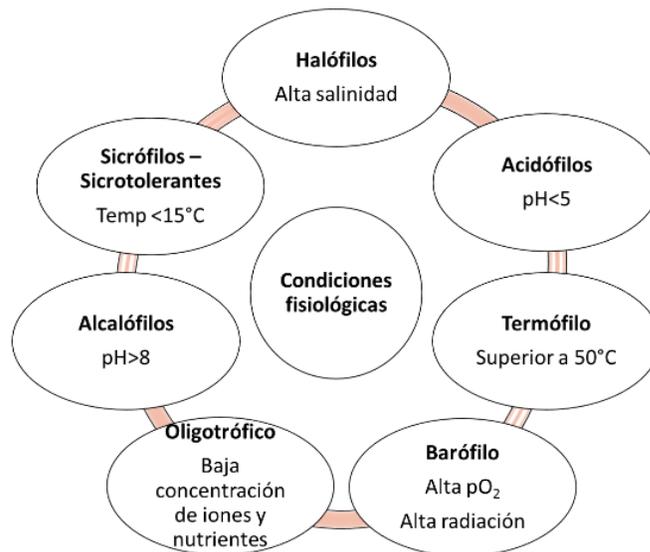


Figura 1. Clasificación extremófilos tomada de Mata, 2006.<sup>12</sup>

#### Microorganismos halófilos

Los microorganismos que viven en ambientes hipersalinos son denominados halófilos y están especializados para vivir en ambientes salinos; el término halófilo se origina del griego *hals* (sal) y *phil* (afín) por lo que etimológicamente halófilo significa “amigo, amante de la sal”. Los microorganismos halófilos se clasifican en cuatro categorías teniendo en cuenta los requerimientos de NaCl, como se muestra a continuación:<sup>14</sup>

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

<sup>14</sup> Kanekar, P.; Kanekar, S.; Kelkar, A.; Dhakephalkar, P. **2011**. Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. *Microorganisms in Environmental Management*. 1-34

Los microorganismos halófilos requieren de una concentración salina específica para poder crecer y son dependientes de la concentración de nutrientes que se encuentren en el medio,<sup>14</sup> dentro de los microorganismos procariontes halófilos se encuentran bacterias y arqueas, los cuales han sido objeto de varios estudios taxonómicos y bioprospectivos.

## 1.2 Ecología de los procariontes en ambientes salinos

Los microorganismos halófilos se encuentran distribuidos en el árbol de la vida en los tres reinos, conformados por un amplio número de individuos como se muestra en la Figura 2, con características y actividades, que son usadas en diferentes industrias. En este documento se tiene en cuenta los microorganismos procariontes en especial al dominio *Bacteria*.<sup>5</sup>

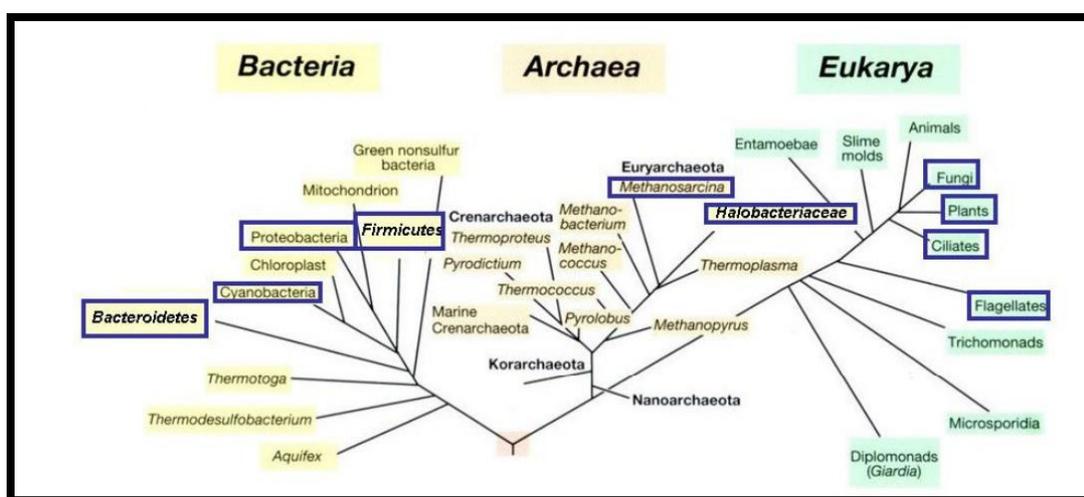


Figura 2. Distribución de los microorganismos halófilos en el árbol de la vida. Tomada de Oren, 2002.<sup>5</sup>

### 1.2.1 Arqueas halófilas extremas

Las arqueas halófilas se encuentran agrupadas en el orden *Halobacteriales*, con la familia *Halobacteriaceae*, incluyendo los géneros *Halostagnum*, *Halovivax*, *Halobacterium* y *Halococcus*, entre otros.<sup>12</sup> Morfológicamente este grupo se encuentra conformado por cocos, bacilos y diferentes formas pleomórficas como triangulares y cuadradas; la mayoría de las cepas presentan coloraciones rojizas debido a la presencia de carotenoides C<sub>50</sub> (bacterioruberina), esenciales en procesos de movimiento de iones a través de la membrana por la acción de la luz.<sup>13</sup>

Por lo general las haloarqueas requieren una concentración de 3,5 a 4,5 M de NaCl y altas concentraciones de KCl, además, se caracterizan por crecer en medios complejos bajo condiciones

de aerobiosis. Se han reportado la capacidad de las arqueas de sintetizar compuestos de interés industrial como enzimas hidrolíticas, exopolisacáridos, polihidroxialcanoatos y halocinas.<sup>15</sup>

### 1.2.2 Bacterias halófilas

Para este estudio se tienen en cuenta las comunidades bacterianas de los ambientes hipersalinos, las cuales se caracterizan por un amplio grupo de microorganismos conformado por cocos y bacilos, capaces de crecer a diferentes concentraciones de sal y producir diferentes metabolitos de interés industrial,<sup>12,12</sup> lo cual se evidencia en distintas investigaciones que han permitido el aislamiento y caracterización taxonómica de un gran número de bacterias halófilas, entre las que se encuentran halófilas moderadas anaerobias del género *Halanaerobium* aisladas de salinas en Tunisia<sup>16</sup> y géneros aerobios como *Desulfohalobium* y *Desulfovibrio* provenientes de ambientes atalosalinos,<sup>17</sup> además de los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Orenia*, *Flavimonas*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Nesterenkonia*, *Oceanobacillus* y *Chromohalobacter*, entre otras, aisladas principalmente de salinas de China, Marruecos, Estados Unidos y Ecuador.<sup>12,18,19</sup>

Finalmente, en Colombia se han aislado arqueas halófilas de la mina de sal de Zipaquirá<sup>15</sup> y bacterias de diferentes ecosistemas salinos entre los que se encuentran los manantiales salinos ubicados en Boyacá, encontrando principalmente bacterias halófilas como *Dethiosulfovibrio*, *Aurantimonas*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio metschnikovii*, *Flavimonas oryzihabitans* y *Agrobacterium tumefaciens*.<sup>20</sup>

### 1.2.3 Bacterias halófilas presentes en ambientes salinos de acuerdo a la clasificación de halotolerancia.

Las bacterias halófilas poseen diferentes características de acuerdo a la concentración de NaCl que son capaces de tolerar,<sup>6</sup> por lo cual se han clasificado en extremas, moderadas y débiles.

---

<sup>15</sup> Becerra, D.; Cortés, D.; Giraldo, J. **2003**. Identificación de microorganismos pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae* en las minas de sal de sal del municipio de Zipaquirá, Cundinamarca, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 9, 1, 2004 - 77

<sup>16</sup> Abdeljabbar, H.; Cayol, J.; Hania, W.; Sadfi, N.; Fardeau, M. **2013**. *Halanaerobium sehlinense* sp. nov., an extremely halophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium from sediments of the hypersaline lake Sehlina Sebkh. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 2069-74

<sup>17</sup> Jakobsen, T.; Kjeldsen, K.; Ingvorsen, K. **2006**. *Desulfohalobium utahense* sp. nov., a moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Great Salt Lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 2063-9.

<sup>18</sup> Ventosa, A.; Nieto, J.; Oren, A. **1998**. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(2), 504-544.

<sup>19</sup> Chen, L.; Zhang, Y.; Schumann, P.; Stackebrandt, E.; Xu, L.; Jiang, C. **2004**. *Nesterenkonia halotolerans* sp. nov. and *Nesterenkonia xinjiangensis* sp. nov., actinobacteria from saline soils in the west of China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 837-41.

<sup>20</sup> Díaz, C. *Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2011.

### Bacterias halófilas extremas

La mayoría de bacterias halófilas se clasifican como moderadas o débiles y es difícil encontrar verdaderas bacterias halófilas extremas cultivables,<sup>12</sup> debido a los requerimientos tanto ambientales como nutricionales que permiten su crecimiento. Sin embargo, distintas investigaciones han reportado el aislamiento de especies como *Halomonas elongata*, aislada de un ambiente talasosalino como las salinas en Holanda, la cual es capaz de crecer a una concentración entre 5 -25% (p/v) de NaCl,<sup>21</sup> así mismo, la especie *Halobacterium salinarum*, aislada de las salinas de El-Malahat, en Egipto (ambiente talasosalino), es capaz de crecer a una concentración de sal de 23% (p/v),<sup>22</sup> además bacterias del género *Acetohalobium*<sup>23</sup> y *Halorhodospira*<sup>24</sup> aisladas de ambientes atalosalinos como las cavernas salinas en Canadá que crecen a una concentración de sal de 25% (p/v) y la especie *Salinibacter ruber*, aislada de salinas de España la cual necesita al menos un 15% de sal para su crecimiento.<sup>25</sup>

### Bacterias halófilas moderadas

Las bacterias halófilas moderadas se caracterizan por ser las más reportadas en la literatura, debido a la habilidad que poseen de tolerar un amplio rango de concentraciones de sal, encontrando bacterias tanto aerobias como anaerobias,<sup>26</sup> siendo las más comunes las bacterias aerobias Gram-negativas de la familia *Halomonadacea* y en menor cantidad Gram-positivas aerobias de los géneros *Marinococcus*, *Halobacillus*, *Salinicoccus*, *Tetragenococcus* y *Salibacillus*.<sup>5,12</sup> Dentro de las bacterias halófilas anaerobias moderadas existe gran diversidad, entre las cuales sobresalen los géneros *Halobacteroides*, *Acetohalobium*, *Haloanaerobacter*, *Sporohalobacter*, *Orenia*, *Clostridium*, *Desulfhalobium* y *Desulfovibrio*.<sup>27</sup>

Así mismo, reportes en la literatura evidencian que bacterias del género *Marteella* sp., aislada del lago Martel en España (Ambiente atalosalino), crecen a una concentración de sal de 3%,<sup>28</sup> mientras

<sup>21</sup> Vreeland, R.; Litchfield, C.; Martin, E.; Elliot, E. **1980**. *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *IJSEM*. 485-495

<sup>22</sup> Oren, A.; Litchfield, C. **1999**. A procedure for the enrichment and isolation of *Halobacterium*. *FEMS Microbiology Letters*, **17**, 353-358

<sup>23</sup> Bordenave, S.; Chatterjee, I.; Voordouw, G. **2013**. Microbial community structure and microbial activities related to CO<sub>2</sub> storage capacities of a salt cavern. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **81**, 82–87.

<sup>24</sup> Schoepp, B.; Bauzan, M.; Ducluzeau, L.; Pierrel, F.; Nitschke, W. **2014**. Study of the respiratory arsenate reductase from *Halorhodospira halophila* definitively clarifies the evolutionary history of this versatile enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1837**, 90–91.

<sup>25</sup> Antón, J.; Oren, A.; Benlloch, S.; Rodríguez, F.; Amann, R.; Rosselló-Mora, R. **2002**. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 485 -91.

<sup>26</sup> Ventosa, A.; Nieto, J. J.; Oren, A. **1998**. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504-544.

<sup>27</sup> Fendrich, C.; Hippe, H.; Gottschalk, G. **1990**. *Clostridium halophilum* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. *Arch. Microbiol.* **154**(2), 127-132.

<sup>28</sup> Rivas, R.; Sánchez, S.; Mateos, P.; Martínez, E.; Velázquez, E. **2005**. *Marteella mediterranea* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium isolated from a subterranean saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**, 955-9.

que bacterias de la especie *Chromohalobacter salexigens*, aisladas de salinas de España crecen a una concentración de sal entre 5%-15% (p/v).<sup>29</sup>

### **Bacterias halófilas débiles**

Las halófilas débiles se denominan generalmente “bacterias marinas” y se caracterizan por crecer a bajas concentraciones de sal,<sup>12,14</sup> dentro de este grupo se encuentran cepas de microorganismos halófilos y halotolerantes como *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*,<sup>30</sup> entre otras aisladas principalmente de salinas marinas y suelos salinos ubicados en España e India, capaces de crecer a una concentración de sal entre 1 y 5% (p/v).<sup>12</sup>

A pesar, de que son los géneros de bacterias más estudiados, se continúan investigaciones sobre estas bacterias ya que son muy útiles en la industria alimenticia, en alimentos que requieren concentraciones de sal hasta de 5% (p/v).<sup>5</sup>

### **1.3 Adaptación de las bacterias halófilas a ambientes salinos**

Las bacterias adaptadas a vivir en ambientes hipersalinos se enfrentan a un medio con una fuerza iónica elevada,<sup>31</sup> 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.<sup>5</sup> 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 (Figura 2).<sup>32</sup>

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, pero requiere una mayor adaptación de la maquinaria celular.<sup>12</sup>

---

<sup>29</sup> Arahal, D.; García, MT.; Vargas, C.; Cánovas, D.; Nieto, J.; Ventosa, A. **2001**. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1457-62.

<sup>30</sup> Oren, A. **2002**. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 1–7.

<sup>31</sup> Galinski, A.; Truper, G. **1994**. Microbial behaviour in salts stresses ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 95-108.

<sup>32</sup> Oren, A. **1999**. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(2), 334–48.

### 1.3.1 Acumulación de sales

Al acumularse sales en el citoplasma, las enzimas y componentes estructurales de la célula están adaptados a una elevada salinidad, por lo que presentan modificaciones que incluyen un exceso de aminoácidos y menores concentraciones de aminoácidos hidrofóbicos.<sup>12, 26</sup>

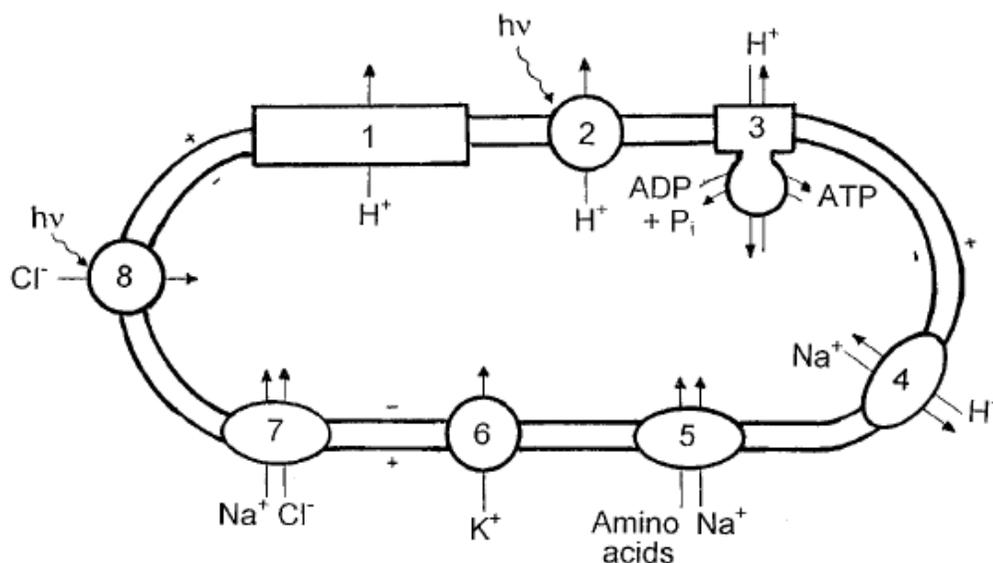


Figura 3. Movimiento de iones en microorganismos halófilos<sup>32</sup>

Las bacterias halófilas, presentan diferentes mecanismos para generar un balance osmótico con el medio externo (Figura 2), 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 bacteriorodopsina 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.<sup>26,32</sup>

### 1.3.2 Acumulación de compuestos orgánicos

Las bacterias halófilas son capaces de sintetizar o acumular compuestos polares con alta solubilidad y que no presentan carga a pH fisiológico,<sup>12,32</sup> los cuales se acumulan en gran cantidad en la célula ( $>1$  mol/Kg de agua) permitiendo equilibrar la presión osmótica interna de la célula con la externa del medio.<sup>31</sup>

El mecanismo de acción de los compuestos polares se fundamenta en la estabilización de la capa de hidratación de las proteínas, al localizarse alejadas de la superficie celular, permitiendo una unión más fuerte con el agua y aumentando la fuerza iónica intracelular, por lo que la acumulación de estos compuestos depende de la fuerza osmótica, la fase de crecimiento, la fuente de carbono y la presencia de osmolitos en el medio de cultivo.<sup>12,33</sup>

Los solutos osmóticos más característicos de las bacterias para adaptarse son: polioles (glicerol, arabitol), azúcares y derivados (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol), aminoácidos (prolina, glutamina), derivados de aminoácidos (N-acetilisina, N-acetilornitina) y aminos cuaternarios (glicina, betaina).<sup>31,33</sup> Según, estudios realizados por Regev en 1990, algunas bacterias halófilas acumulan diferentes solutos dependiendo la concentración de NaCl a la cual se encuentren expuestas;<sup>34</sup> como en el caso de solutos osmóticos como la sacarosa y la trehalosa que se sintetiza cuando las bacterias halófilas se encuentran a altas concentraciones de sal; así mismo, compuestos como la glicina betaína, es sintetizada por cianobacterias halófilas<sup>35</sup> mientras que la ectonía un aminoácido cíclico encontrado en varios géneros de bacterias halófilas, es sintetizado de *novo*, por especies del género *Halomonas* especialmente *H. elongata*.<sup>36</sup>

### 1.3.3 Modificación de la morfología 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.<sup>37</sup> 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 composición de lípidos en la membrana.<sup>38</sup>

---

<sup>33</sup> Kushner, D. J. **1985**. The *Halobacteriaceae*. En: The Bacteria. Vol. VIII: *Archaeobacteria*. New York: Woese, C. R. y Wolfe, R. S. Academic press. 297-342.

<sup>34</sup> Regev, R.; Peri, I. Gilboa, H.; Avi-Dor, Y. **1990**. <sup>13</sup>C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria. *Arch. Biochem. Biophys*, 278, 106–112

<sup>35</sup> Nicolaus, B.; Lanzotti, V.; Trincone, A.; De Rosa, M.; Grant, W.; Gambacorta, A. **1989**. Glycine betaine and polar lipid composition in halophilic archaeobacteria in response to growth in different salt concentrations. *FEMS Microbiology Letters*, 59(1), 157–160

<sup>36</sup> Sauer, T.; Galinski, E. **1998**. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(3), 306–13.

<sup>37</sup> Lattanzio, T.; Baronio, M.; Oren, A.; Russell, N.; Corcelli, A. **2009**. Characterization of polar membrane lipids of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber* and possible role of cardiolipin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791(1), 25–31.

<sup>38</sup> Haddadi, A.; Shavandi, M. **2013**. Biodegradation of phenol in hypersaline conditions by *Halomonas* sp. strain PH2-2 isolated from saline soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 29–34.

## 1.4 Métodos reportados en la literatura para la identificación de las bacterias

### 1.4.1 Características fenotípicas

La identificación fenotípica bacteriana, se fundamenta en describir las características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas, teniendo en cuenta los medios de cultivo y las características morfológicas.<sup>39</sup>

#### Características morfológicas

El **estudio microscópico** en fresco y las tinciones revelan la forma, la manera de agruparse, la estructura y el tamaño de las células, las tinciones más utilizadas para la identificación son:

**La tinción de Gram** basada en la coloración de los constituyentes químicos de la pared,<sup>39</sup> determinando diferentes características microbianas como:

- *Forma*: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.
- *Tamaño*: cortos, largos, etc.
- *Disposición*: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.<sup>39</sup>

La **tinción con verde de malaquita** se fundamenta en la tinción de la endoespora formada por queratina estas presentan formas ovales o esféricas y se pueden ubicar en la célula de manera terminal, subterminal y central.<sup>39</sup>

La **tinción con tinta china**, permite evidenciar la presencia de cápsulas, la cual se compone en su mayoría de polisacáridos y le confiere protección ante situaciones adversas, por lo general la tinta china (suspensión de partículas de carbono coloidal) no tiene afinidad por los constituyentes celulares por lo que rodea las células, basándose en la tinción alrededor de la célula, generando un halo.<sup>39</sup>

En el **estudio macroscópico** la observación morfológica se hace a partir de cultivos frescos y puros en medios no selectivos, determinando el tamaño, forma, consistencia y color generalmente uniforme entre una misma especie.<sup>20</sup>

La identificación de la colonia está determinada por el borde (liso, rugoso o irregular), forma (puntiforme o plano), la consistencia (seca, mucosa o viscosa) y la elevación (convexa o cóncava).<sup>39</sup>

#### Pruebas bioquímicas

Las pruebas de identificación bioquímica se basan en diferentes test químicos, que permiten identificar microorganismos de acuerdo a la actividad de un compuesto sintetizado por una vía

---

<sup>39</sup> Leboffe, M.; Pierce, B. **2011**. A photographic Atlas for the Microbiology Laboratory EEUU. *Morton*, 4, 1-256.

metabólica específica sobre un sustrato que se incorpora al medio.<sup>39</sup> Una de las formas más fáciles y rápidas de realizar las pruebas bioquímicas es mediante sistemas comerciales, los cuales consisten en celdas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan por el cambio de color conforme al inserto del fabricante.<sup>40</sup> Las pruebas bioquímicas permiten identificar bacterias cuyos perfiles se encuentran establecidos. Dentro de las galerías más usadas se encuentran:

- **API 20E® y API 50CH®**

Permiten la identificación en 48 horas de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias (microorganismos Gram negativos) y del género *Bacillus* y/o *Lactobacillus*. Las galerías constan de pruebas miniaturizadas encontrando 21 pruebas en API 20E® y 50 pruebas en API 50CH®, además, de una base de datos, que permiten obtener un perfil numérico que aproxima con la ayuda de un software el género y la especie del microorganismo evaluado.<sup>12</sup>

Para llevar a cabo pruebas bioquímicas a bacterias halófilas en API 20E® los inóculos deben ser suplementados con NaCl.<sup>40</sup>

#### 1.4.2 Secuencias del gen 16S ARNr

Una de las metodologías más utilizadas y reportadas para obtener e identificar microorganismos es la secuenciación del gen que codifica para la subunidad pequeña del 16S ARNr, para ello se utiliza una técnica muy reconocida denominada PCR (Por sus siglas en inglés *Polymerase chain reaction*), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias a partir de un fragmento de ADN, con el fin de obtener la secuencia amplificada, la cual, una vez secuenciada, se compara contra bases de datos de microorganismos reportados, lo que permite encontrar similitud, dando una evidencia de género y especie seguido, de la construcción de árboles filogenéticos.<sup>41</sup>

Según Yarza y colaboradores en 2014, si dos cepas comparten menos del 98,7% de similitud en la secuencia del 16S ARNr con su vecino más cercano, se puede sugerir que no pertenecen a la misma especie y por el contrario, si tienen más del 98,7% se deben usar métodos alternativos, para determinar su clasificación taxonómica con mayor resolución.<sup>42,43</sup> Sin embargo, en bacterias halófilas este concepto puede variar dependiendo de los géneros, por ejemplo, una nueva especie

<sup>40</sup> Lee, D.; Kang, H.; Weerawongwiwat, V.; Kim, B.; Choi, W.; Kim, W. **2013**. *Oceanobacillus chungangensis* sp. nov., isolated from a sand dune. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3666–71.

<sup>41</sup> Hayley, C.; Kownles, C. **2014**. Applying species-tree analyses to Deep phylogenetic histories: Challenges and potential suggested from a survey of empirical phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*- Article in press.

<sup>42</sup> Behera, B.; Das, P.; Maharana, J.; Meena, D.; Sahu, K.; Rao, A, Chatterjee, S.; Mohanty, B.; Prakash, A. **2014**. Functional Screening and Molecular Characterization of Halophilic and Halotolerant Bacteria by 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Section B: Biological Sciences.

<sup>43</sup> Rosselló-Mora, R.; Amann, R.; **2001**. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39-67.

de bacteria halófila perteneciente al género *Kushneria*, presentó un porcentaje de similitud con el vecino más cercano de 98,9%,<sup>44</sup> y la nueva especie *Aquisalimonas halophila*, presentó un porcentaje de similaridad de 96,6% con su vecino más cercano.<sup>45</sup> Lo anterior permite concluir que para confirmar el aislamiento de una nueva especie de bacteria halófila, es necesario tener en cuenta las características fenotípicas, quimiotaxómicas y filogenéticas que permitan esclarecer la similitud que existe entre cepas.

## 1.5 Factores que afectan el crecimiento

Para el aislamiento y crecimiento de bacterias halófilas se requiere una serie de condiciones que proveen el ambiente óptimo para el desarrollo, las cuales se describen a continuación:

### 1.5.1 Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo es indispensable para el buen crecimiento y producción de metabolitos por parte de los microorganismos, ya que le debe proporcionar los nutrientes en cantidades adecuadas que favorezcan el desarrollo microbiano. La mayoría de estudios realizados con bacterias halófilas se llevan a cabo mediante técnicas dependientes de cultivos, por lo que se reporta variedad de medios con sustratos específicos.<sup>46</sup>

Es importante destacar que dentro de los componentes del medio de cultivo, el NaCl es una de las sales en mayor proporción,<sup>5</sup> mientras que, el magnesio es requerido a concentraciones menores a 2,5 M y es adicionado al medio en sales con cloruro, sulfato y nitrato; el potasio, debe estar en el medio en concentraciones por encima de 2% (p/v), principalmente en forma de KCl, ya que es fundamental para mantener el equilibrio osmótico en medio salados;<sup>46</sup> los sulfuros, fosfatos y nitrógeno se suplementan en forma de aminoácidos o como NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub> o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y las sales traza en forma de CaCl<sub>2</sub>, NaBr o NaHCO<sub>3</sub>.<sup>18</sup>

### 1.5.2 Condiciones ambientales

#### Condiciones de Temperatura

La temperatura es una condición importante para el crecimiento de microorganismos halófilos ya que de esta depende el desarrollo y la producción de metabolitos.<sup>1414</sup> Generalmente, las bacterias

---

<sup>44</sup>Bangash, A.; Ahmed, I.; Abbas, S.; Kudo, T.; Shahzad, A.; Fujiwara, T.; Ohkuma, M. **2015**. *Kushneria pakistanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from rhizosphere of a plant (*Saccharum spontaneum*) growing in salt mines of the Karak area in Pakistan. *Spinger*, 107 (4), 991-1000

<sup>45</sup>Zhang, Y.; Jia, M.; Ma, Y.; Lu, K.; Tian, F.; Klenk, H.; Zhou, Y.; Tang, S. **2014**. *Aquisalimonas halophila* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a hypersaline mine. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 2210-2216.

<sup>46</sup>Schneegurt, M. **2012**. *Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea*. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Holanda: Springer, 35-58

halófilas y halotolerantes crecen a una temperatura de 30°C, pero esta puede variar en un rango entre 27°C a 40°C, dependiendo de cada especie.<sup>46</sup>

### Condiciones de pH

Las bacterias halófilas y halotolerantes son por lo general, neutrófilas, y crecen en medios con pH de 6,8 a 7. Sin embargo, algunas anaerobias han reportado rangos entre 8-10.<sup>46,46</sup>

El establecimiento de un pH óptimo es fundamental para la producción de metabolitos secundarios con potencial aplicación a nivel industrial.<sup>32,47</sup>

### Condiciones de oxígeno

La mayoría de halófilos estudiados son aerobios, sin embargo, es indispensable destacar que la solubilidad del oxígeno decrece cuando aumenta la salinidad,<sup>48</sup> lo anterior se ve reflejado en reportes de bacterias halófilas marinas capaces de remover materia orgánica de aguas residuales cuando se encuentran expuestas a altas concentraciones de oxígeno.<sup>46</sup>

Así mismo, es posible encontrar tanto bacterias aerobias como anaerobias en un mismo hábitat, como se reporta en un estudio realizado en la tesis doctoral “Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá”, en donde se evaluaron las condiciones de crecimiento aerobias y anaerobias, encontrando que la cantidad de bacterias anaerobias fue menor, debido a las condiciones de la zona de aislamiento,<sup>20</sup> por otra parte, Kivisto, en 2011, realizó fermentaciones con bacterias halófilas en condiciones anaerobias encontrando producción de hidrógeno y aminos. Lo anterior, confirma que la presencia o ausencia de oxígeno en el medio es un factor limitante para el aislamiento de diferentes géneros de bacterias halófilas y la síntesis de metabolitos.<sup>49</sup>

## 1.6 Actividades biológicas de las halófilas

Las bacterias halófilas son capaces de sintetizar diferentes compuestos entre los que se encuentran biosurfactantes, antibióticos, enzimas y exopolisacáridos,<sup>12</sup> así mismo han sido de gran utilidad en la bioremediación de suelos contaminados, debido a que algunas especies son capaces de capturar sodio lo que permite la recuperación de suelos salinos-sódicos,<sup>50</sup> por lo anterior, estos

<sup>47</sup> Lorantfy, B.; Ruschitzka, P.; Herwig, C. **2014**. Investigation of physiological limits and conditions for robust bioprocessing of an extreme halophilic archaeon using external cell retention system. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 140–148.

<sup>48</sup> Meseguer, I. **2004**. Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. DTP de producción vegetal y microbiología. UNMSM. España.

<sup>49</sup> Kivistö, A.; Karp, T. **2011**. Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *Journal of Biotechnology*, 152(4), 114–24.

<sup>50</sup> Sánchez, L.; Arguello, H. Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in Vitro y su posible aplicación en bioremediación en suelos salinos-sódicos. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*, 4, 19-21.

microorganismos son de gran utilidad en diversas áreas de la biotecnología y con potencial aplicación a nivel industrial.

### 1.6.1 Producción de enzimas

Las enzimas sintetizadas por microorganismos halófilos son conocidas como haloenzimas, entre las que se encuentran hidrolasas del tipo amilasas, proteasas, pululanastas, nucleasas y 5-nucleotidasas, estas hidrolasas se encuentran ligadas a las condiciones de crecimiento de la bacteria como lo son temperatura, concentración de NaCl y pH. Las enzimas cumplen un papel fundamental en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica principalmente como espesantes, conservantes, principios activos o excipientes (Tabla 1).<sup>12,24</sup>

**Tabla 1.** Enzimas producidas por microorganismos halófilos<sup>12</sup>

Enzima	Microorganismos	NaCl (% p/v)
Amilasa	<i>Nesterenkonia halobia</i>	3-11
Nucleasa H	<i>Micrococcus varians</i>	16
Proteasa	<i>Bacillus</i> sp.	3
Amilasa H	<i>Halomonas meridiana</i>	10
Proteasa	<i>Pseudomonas</i> sp.	18
5'-nucleotidasa	<i>Micrococcus varians</i>	4,5-6

De acuerdo a trabajos realizados por Ayala en el 2010, fue posible establecer que 71 cepas de bacterias halófilas fueron capaces de producir enzimas como amilasas, celulasas, lipasas y proteasas a concentraciones de NaCl de 1% hasta 20%.<sup>51</sup> Al mismo tiempo, Mevarech en el 2000 aisló la enzima malato deshidrogenasa (hMDH) de *Haloarcula marismortui*, la cual crece a temperaturas entre 40-45 °C.<sup>52</sup>

### 1.6.2 Producción de biopolímeros

Las bacterias halófilas son capaces de producir biopolímeros, entre los que se destacan exopolisacáridos, biosurfactantes, liposomas, lectinas y bioplásticos.<sup>51,2</sup> Dentro de los exopolisacáridos, los sulfatados han sido de gran estudio, ya que poseen actividad moduladora de la proliferación de distintos tipos celulares, como las tumorales, hipertróficas, anticancerígenas y

<sup>51</sup> Ayala, P. **2010**. Aislamiento, caracterización parcial y perfil de producción Enzimática de bacterias halófilas y halotolerantes de la Laguna Chairkota, Potosí – Bolivia. Centro de biotecnología. Universidad Mayor de San Simón. Bolivia.

<sup>52</sup> Mevarech, M.; Frolow, F.; Gloss, L. **2000**. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry*, 86(2-3), 155–64.

antivirales. Por otro lado, los exopolisacáridos le dan la capacidad a las células bacterianas de formar biofilms, permitiéndoles la adhesión a diferentes superficies.<sup>30,32</sup>

### Exopolisacáridos microbianos (EPS)

El término exopolisacárido, es usado para determinar los polisacáridos localizados en la superficie de las células microbianas, dentro de los que encuentran polímeros de diferente composición química y propiedades físicas.<sup>12</sup>

Los exopolisacáridos forman cápsulas que se encuentran unidas a la superficie de la célula mediante enlaces no covalentes, aunque en ocasiones, pueden unirse covalentemente dependiendo de la célula a los fosfolípidos o al lípido A (conformado por dos unidades de glucosamina fosforilada),<sup>30,33</sup> la formación de EPS asociado a las células bacterianas se reconoce por la formación de colonias mucoides en crecimiento sólido o por un aumento de la viscosidad en medios líquidos. Dentro de las funciones asignadas al EPS está la adhesión de las células a superficies, en los procesos de morfogénesis y en la protección de la célula frente a la desecación y fluctuaciones potenciales de agua,<sup>9</sup> ya que actúa como reservorio de agua, además que sirven como barrera contra agentes antimicrobianos y cationes metálicos tóxicos, así lo demuestran estudios realizados por Mata 2006, basados en la caracterización de exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*.<sup>12</sup>

#### 1.6.3 Producción de compuestos antibióticos

Los antibióticos producidos por bacterias han evolucionado a lo largo de los años, permitiendo demostrar la capacidad de estos compuestos para ingresar a otros microorganismos e inhibir determinadas enzimas, macromoléculas o estructuras macromoleculares, dando como resultado una alta efectividad frente a agentes patógenos.<sup>46</sup> Se ha evidenciado así una selectividad en su mecanismo de acción, contribuyendo de igual manera a la evolución de los agentes farmacéuticos a partir de productos naturales. Una prueba de ello es que cerca de 5000 antibióticos han sido identificados a partir de los cultivos de bacterias Gram positivas y Gram negativas.<sup>53</sup>

Se ha reportado en la literatura que la bacteria halófila *Nocardioides sp.*, es capaz de producir antibióticos, con amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *Xanthomonas oryzae*.<sup>53</sup> Por otra parte Boudjelal en 2011, aisló una cepa del género *Actinoalloteichus*, capaz de inhibir un gran número de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, hongos y levaduras con halos de inhibición mayores a 13 mm.<sup>54</sup>

---

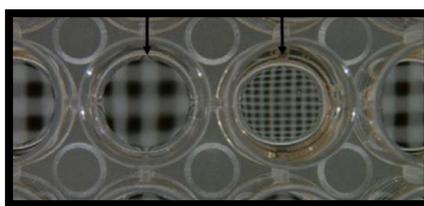
<sup>53</sup> Gebreyohannes, G.; Moges, F.; Sahile, S.; Raja, N. **2013**. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 426–435.

<sup>54</sup> Boudjelal, F.; Zitouni, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N. **2011**. Taxonomic study and partial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoalloteichus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 835–45.

#### 1.6.4 Producción de Biosurfactantes

Los biosurfactantes son agentes tensoactivos o surfactantes, que dan lugar a una disminución significativa de la tensión superficial, estas moléculas contienen un segmento liposoluble (soluble en aceite) y otro hidrosoluble (soluble en agua o compuestos polares);<sup>48</sup> en la industria son ampliamente utilizados en la remediación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos y pesticidas; también usados en la industria de alimentos; en la fabricación de pulpa de papel y en farmacología.<sup>30</sup>

Para el *screening* de biosurfactantes se llevan a cabo distintas técnicas entre las que se encuentran la actividad de emulsificación, medición de la tensión superficial, diluciones seriadas en placas de 96 pozos (Figura 4), análisis cualitativos en placa y el método del número más probable,<sup>55</sup> que permiten evidenciar la disminución de la tensión superficial y la formación de fases al entrar en contacto con determinados hidrocarburos, estas técnicas se llevan a cabo usando el medio de cultivo con microorganismos cultivados entre 3 a 5 días.<sup>55</sup>



**Figura 4.** Método cualitativo de microplatos<sup>55</sup>

Existen algunos reportes de bacterias halófilas capaces de producir biosurfactantes, como es el caso de *Oceanobacillus* sp. BRI 10 aislada de Mar Antártico, con actividad de emulsificación sobre hidrocarburos como kerosene, diésel, petróleo y aceite. Adicionalmente estos biosurfactantes poseen actividad inhibitoria sobre *E. coli*, siendo las glicoproteínas, que hacen parte del biosurfactante, las responsables de la inhibición.<sup>64</sup>

#### 1.6.5 Quorum sensing

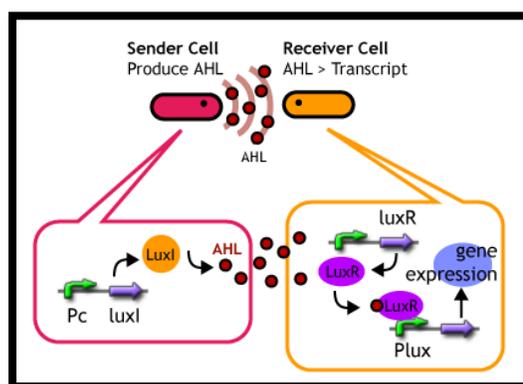
El *quorum sensing* es un fenómeno definido como la regulación de la expresión genética en función de la densidad de la población de bacterias que permite la sincronización de los fenotipos mediante la comunicación bacteriana a través de un lenguaje químico. Uno de los tipos de *quorum sensing* funciona a través de un circuito genético compuesto por un factor de transcripción (LuxR) y por acilhomoserinlactonas (AHL's) sintetizadas (LuxI). La acumulación de AHL's en el medio, debido a la gran cantidad de células presentes en un cultivo, conduce a la expresión de los genes regulados por

---

<sup>55</sup> Chen, C.; Baker, S.; Darton, C. **2007**. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, 70,503–510.

LuxR;<sup>56</sup> algunas de estas expresiones son: bioluminiscencia, motilidad, factores de virulencia o patogenicidad, maduración del biofilm, etc (Figura 5).<sup>57</sup> Uno de los locus involucrados en estos sistemas son YenR y YenI sintetizada en *Yersinia* y AL-2 en *E. coli*.<sup>58</sup>

Algunos compuestos sintetizados por microorganismos pueden inhibir los sistemas de señalización de *quorum sensing*, inhibiendo los genes involucrados, lo que hace que las bacterias sean más susceptibles a los tratamientos antimicrobianos siendo de gran ayuda en diferentes industrias como la farmacéutica, petrolera y naval.



**Figura 5.** Mecanismo de señalización de *quorum sensing*  
Tomado de: <http://2011.igem.org/Team:KAIST-Korea/Proposal1>

## 1.7 Estado del arte

Los ambientes hipersalinos, tienen características particulares que los convierten en ambientes propicios para el aislamiento de bacterias halófilas, por ejemplo, el Mar Muerto tiene una alta concentración de magnesio comparada con sodio, de donde han sido aisladas halófilas extremas de la especie *Halobacterium marismortui*,<sup>59</sup> mientras que el Gran Lago Salado de EEUU tiene mayor proporción de iones cloruro y sodio, además de cantidades significativas de sulfato y un pH alcalino

<sup>56</sup> Duque, C.; Tello, E.; Castellanos, L.; Fernandez, M.; Arévalo-Ferro, C. Bacterial sensors in microfouling assays. In State of the art in biosensors. Chapter 4. Intech-Open science. **2013**.

<sup>57</sup> Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. **2012**. Disruption in quorum sensing systems and biofilm inhibition of bacteria by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.* 75, 1637-1642.

<sup>58</sup> Suarez, Z.; Caballero, J.; Venturi, V. **2008**. The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaI repressor. *Microbiology*, 154, 2048–2059.

<sup>59</sup>Oren, A.; Lau, P.; Fox, G. **1988**. The taxonomic status of "*Halobacterium marismortui*" from the Dead Sea: a comparison with *Halobacterium vallismortis*. *Syst Appl Microbiol*, 10(3),251-8.

en donde fue posible el aislamiento de *Halovibrio variabilis*.<sup>60</sup> Así mismo, se ha encontrado que las bacterias halófilas son capaces de sintetizar compuestos bioactivos como enzimas, biosurfactantes, entre otros, que las convierten en objetivo de estudio con miras a la aplicación en diferentes industrias.

### 1.7.1 Bacterias halófilas y ecosistemas salinos

La mayoría de investigaciones en ambientes salinos se han enfocado en el aislamiento de microorganismos pertenecientes al dominio Arquea y en menor proporción a la búsqueda de bacterias halófilas.<sup>5</sup> Dentro de los ecosistemas salinos en los que ha sido posible el aislamiento de bacterias halófilas se encuentran el Mar muerto,<sup>59</sup> las minas de sal de Karak<sup>61</sup> y China,<sup>45</sup> el lago salado de Tunisia<sup>62</sup> y los manantiales salinos colombianos,<sup>20</sup> entre otros, en donde se han aislado nuevas especies con potencial biotecnológico útil en diferentes industrias. Así mismo, estudios recientes en salinas del Mediterráneo, Atlántico y Pacífico, han reportado el aislamiento aproximado de 4200 cepas diferentes, lo que confirma que los ambientes salinos albergan un sin número de géneros procariontes.<sup>63</sup> En la Tabla 2 se observan algunos estudios recientes enfocados en el aislamiento de bacterias halófilas, entre los cuales se destaca los realizados en minas de sal.

Sin embargo, es importante denotar que los estudios enfocados en el aislamiento de bacterias se han centrado principalmente en salinas acuáticas y en aislamientos provenientes de muestras de agua de mar, siendo las minas de sal, ecosistemas poco explorados en cuanto a la búsqueda de bacterias halófilas, lo que hace que se convierta en un hábitat con posibles nuevas especies con potenciales bioactivos inusitados.<sup>12,22</sup>

### 1.7.2 Producción de biosurfactantes, haloenzimas, antibióticos e inhibidores de quorum sensing en bacterias halófilas

La mayoría de bacterias halófilas tienen diferentes actividades entre las que se destacan la producción de haloenzimas, en especial hidrolasas, que han sido de gran uso en diferentes industrias como la farmacéutica, alimenticia y petrolera, ya que son capaces de tolerar altas concentraciones de sal además de resistir altas temperaturas y diferentes pH,<sup>48</sup> como es el caso de la bacteria halófila *Nocardioides* sp.,<sup>7</sup> la cual es capaz de sintetizar amilasas, utilizando diferentes fuentes de carbono. En otros estudios se han reportado la producción de enzimas hidrolíticas por parte de bacterias halófilas aisladas de la región andina en Bolivia.<sup>51</sup>

---

<sup>60</sup> Fendrich, C. **1988**. *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a New Halophilic Aerobic Coccoid Eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Systematic and Applied Microbiology*, 11(1), 36–43.

<sup>61</sup> Roohi, A.; Ahmed, I.; Iqbal, M.; Jamil, M. **2012**. Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of karak, pakistan. *Pak. J. Bot*, 44, 365-370.

<sup>62</sup> Hedi, A.; Sadfi, N.; Fardeau, M.; Rebib, H.; Cayol, J.; Ollivier, B.; Boudabous, A. **2009**. Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. *International Journal of Microbiology*, 1-17

<sup>63</sup> Viver, T.; Cifuentes, A.; Díaz, S.; Rodríguez, G.; González, B.; Antón, J.; Rosselló, R. **2015**. Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: Evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 266–275.

Así mismo, se han encontrado reportes de bacterias halófilas del género *Micrococcus*, provenientes del Mar Muerto capaces de sintetizar nucleasas<sup>12</sup> involucradas en la hidrólisis de ARN en procesos de biología molecular. Por otro lado bacterias del género *Chromohalobacter*,<sup>7</sup> producen xilanasas,<sup>51</sup> de gran uso en la industria alimenticia, también, la especie *Salinibacter ruber*<sup>43</sup> es capaz de sintetizar la enzima glutamato deshidrogenasa, usada en la industria farmacéutica.

De acuerdo a lo anterior, algunos géneros de bacterias halófilas, son capaces de sintetizar un número importante de enzimas con propiedades halotolerantes que las convierte en una fuente importante en diferentes industrias.

Otra de las actividades que han sido estudiadas, es la capacidad que tienen algunas bacterias halófilas de producir biopolímeros en especial biosurfactantes. Dentro estas bacterias, los géneros *Oceanobacillus*<sup>64</sup> *Kocuria*,<sup>65</sup> *Ochrobactrum*<sup>66</sup> y *Bacillus*, provenientes principalmente de salinas marinas, tienen la capacidad de sintetizar compuestos con propiedades biosurfactantes que emulsifican más del 50% del medio en presencia de keroseno y aceite.

Dentro de las moléculas biosurfactantes se destacan compuestos conformados por estructuras de ciclopropano y ácido nonanoico, que por lo general tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, como es el caso de *Oceanobacillus*, el cual produce un compuesto con propiedades biosurfactantes que inhiben el crecimiento de *E. coli*.<sup>64</sup>

El género *Kocuria*, en especial la especie *K. marina*, produce un biosurfactante capaz de resistir una concentración de sal de 15% (p/v) de NaCl. Este compuesto con propiedades biosurfactantes es capaz de presentar un índice de emulsificación mayor a 50% sobre petróleo y aceite de coco, que lo convierte en un compuesto que puede ser usado en diferentes industrias que requieren compuestos halotolerantes.<sup>65</sup>

La bacteria *Ochrobactrum* sp., produce un biosurfactante con actividad *anti-biofilm* y antimicrobiana capaz de inhibir el crecimiento de levaduras del género *Candida*.<sup>66</sup> Los biosurfactantes halotolerantes, son utilizados en procesos de biorremediación y en la industria farmacéutica y alimenticia como viscozantes o humectantes; lo que hace que jueguen un papel importante en diferentes industrias.<sup>10</sup>

---

<sup>64</sup> Romano, I.; Lama, L.; Nicolaus, B.; Poli, A.; Gambacorta.; Giordano, A. **2006.** *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. incaldanensis

subsp. nov., an alkalitolerant halophile isolated from an algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy), and emended description of *Oceanobacillus oncorhynchi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 805–810

<sup>65</sup> Sarafin, Y.; Donio, S.; Velmurugan, S.; Michaelbabu, M.; Citarasu, T. **2014.** *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. *Saudi Journal of Biological Science*, 21 (6), 511-519.

<sup>66</sup> Kumara, G.; Sujithaa, P.; Mamidyalab, K.; Usharanic, P.; Dasd, B.; Reddyd, C. **2014.** Ochrosin, a new biosurfactant produced by halophilic *Ochrobactrum* sp. strain BS-206 (MTCC 5720): Purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochemistry*, 49(10), 1708–1717.

Una de las actividades que ha sido poco estudiada para bacterias halófilas es la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, sin embargo, existen reportes de extractos provenientes de bacterias del género *Ocenaobacillus* capaces de inhibir el crecimiento de bacterias como *E. coli*,<sup>64</sup> así mismo, algunas cepas del género *Ochrobactrum* son capaces de inhibir *S. aureus*, *B. subtilis* y *Candida*,<sup>66</sup> por lo cual pueden ser consideradas como una nueva fuente de moléculas antibióticas con potencial aplicación en áreas como la medicina y la farmacología. Adicionalmente, se han encontrado algunos reportes de actinobacterias halotolerantes, entre las que se encuentran *Streptomyces sporocinereus* y *Nocardioopsis* sp., capaces de sintetizar compuestos antibióticos contra patógenos como *S. typhimurium*, *P. vulgaris* y *S. citreus*.<sup>26</sup>

La capacidad de las bacterias halófilas de inhibir los sistemas de *quorum sensing* no ha sido muy reportada en la literatura, sin embargo, sería una alternativa para el tratamiento de diferentes enfermedades o en la recuperación de superficies impactadas por procesos de *biofilm* lo que convertiría a las bacterias halófilas en una nueva fuente de compuestos con esta actividad.

Por lo anteriormente expuesto, se puede intuir que las bacterias halófilas sintetizan moléculas con potencial bioactivo, que puede tener un gran potencial de a nivel industrial y Medicinal.

**Tabla 2.** Estudios recientes enfocados en el aislamiento de bacterias halófilas.

Artículo	Año	Lugar de aislamiento	Géneros aislados
Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: Evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. <sup>63</sup>	2015	Salinas del Mediterráneo, Atlántico y Pacífico	Se aislaron más de 4200 cepas
<i>Aquibacillus salifodinae</i> sp. nov., a novel bacterium isolated from a salt mine in Xinjiang province, China. <sup>67</sup>	2015	<b>Mina de sal de la provincia de Xinjiang</b>	<i>Aquibacillus halophilus</i> B6B, <i>Aquibacillus koreensis</i> BH30097 y <i>Aquibacillus albus</i>
Isolation and Phylogenetic Identification of Halotolerant/Halophilic Bacteria from the Salt Mines of Karak, Pakistan. <sup>61</sup>	2014	<b>Minas de sal de Karak</b>	<i>Planococcus</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Halobacillus</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Gracilibacillus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Salinivibrio</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Oceanobacillus</i> <i>Bacillus</i>
Characterization of Halophilic Bacterial Communities in Turda Salt Mine (Romania). <sup>68</sup>	2014	<b>Mina de sal de Turda</b>	
<i>Halomonas qiaohouensis</i> sp. nov., isolated from salt mine soil in southwest China. <sup>69</sup>	2014	<b>Mina de sal en China</b>	<i>Halomonas</i> , <i>pantelleriensis</i> , <i>Halomonas qiaohouensis</i>
Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). <sup>70</sup>	2014	Humedal de Rambla Salada	<i>Halomonas</i> , <i>Marinobacter</i> y <i>Bacillus</i>
Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. <sup>71</sup>	2014	Suelos de Brasil	<i>Bacillus</i> <i>Halomonas</i> y <i>Shewanella</i>
Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. <sup>72</sup>	2012	Salinas de la India	<i>Marinobacter</i> , <i>Virgibacillus</i> , <i>Halobacillus</i> , <i>Geomicrobium</i> , <i>Chromohalobacter</i> , <i>Oceanobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>
Aislamiento, caracterización parcial y perfil de producción enzimática de bacterias halófilas y halotolerantes de la laguna Chairkota, Potosí – Bolivia. <sup>51</sup>	2013	Laguna Chairkota, Potosí – Bolivia	21 cepas halófilas sin identificar
Studies on the Biodiversity of Halophilic microorganisms Isolated From El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. <sup>62</sup>	2009	Lago saldo El-Djerid	<i>Salicola</i> , <i>Pontibacillus</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Marinococcus</i> , <i>Halobacillus</i>

<sup>67</sup> Zhang, W.; Hu, J.; Zhang, X.; Zhu, X.; Wu, M. **2015.** *Aquibacillus salifodinae* sp. nov., a novel bacterium isolated from a salt mine in Xinjiang province, China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(2),367-74.

<sup>68</sup> Carpa, R.; Keul, A.; Muntean, V.; Dobrotă, C. **2014.** Characterization of halophilic bacterial communities in Turda Salt Mine (Romania). *Orig Life Evol Biosph*, 44(3), 223-30.

<sup>69</sup> Wang, Y.; Xiao, W.; Dong, M.; Zhao, Q.; Li, Z.; Lai, Y.; Cui, X. **2014.** *Halomonas qiaohouensis* sp. nov., isolated from salt mine soil in southwest China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(2),253-60.

<sup>70</sup> Luque, R.; Béjar, V.; Quesada, E.; Llamas, I. **2014.** Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Can J Microbiol*, 60(12), 839-46.

<sup>71</sup> Irshad, A.; Ahmad, I.; Kim, S. **2014.** Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Braz J Microbiol*, 45(2), 563-71.

<sup>72</sup> Kumar, S.; Karan, R.; Kapoor, S. **2012.** Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Braz J Microbiol*, 43(4), 1595-603.

### 1.7.3 Biodiversidad en Colombia

Al hablar de bacterias halófilas es importante tener en cuenta los estudios que se han llevado a cabo en Colombia, ya que es el segundo país en biodiversidad en el mundo, lo cual hace evidente el compromiso y la necesidad de estudiar su fauna y flora, con el fin de encontrar nuevas alternativas aplicadas a distintas áreas de la medicina y la industria principalmente. Uno de los grandes enfoques de estudio encaminados a este objetivo es la bioprospección de productos naturales a partir de diversos organismos, lo cual se ha enfocado en la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial aplicación farmacológica, así mismo en el estudio de recursos genéticos, proteínas, especies biológicas o materia viva, con posible utilidad a nivel medicinal, industrial y biotecnológico.<sup>5</sup>

Dentro de los estudios de bacterias halófilas en Colombia, se encuentran las investigaciones realizadas en los manantiales salinos de Risaralda, en donde ha sido posible aislar nuevas especies de bacterias halófilas capaces de sintetizar enzimas hidrolíticas que serían de gran ayuda a nivel industrial.<sup>20</sup> Por otra parte se encuentran estudios realizados con bacterias provenientes del mar de la Isla de San Andrés y del Humedal Cintura de la Cuenca del río San Jorge en Córdoba, capaces de capturar sodio *In vitro* como una alternativa en procesos de biorremediación.<sup>50</sup>

En la mina de sal de Zipaquirá, se realizó un estudio con el objetivo de establecer cuáles son las arqueas pertenecientes a este ecosistema, logrando establecer mediante análisis morfológico, perfiles bioquímicos y de sensibilidad a antibióticos que cepas aisladas pertenecen a la familia *Halobacteriaceae*, específicamente a los géneros *Halobacterium* y *Halococcus*.<sup>15</sup>

Los ambientes salinos colombianos no han sido muy explorados en cuanto al aislamiento de bacterias halófilas, sin embargo, estos representan una nueva alternativa para la búsqueda de nuevas especies y metabolitos de interés. Por lo que en el presente proyecto se considera que las bacterias que crecen en “ambientes extremos” como la mina de sal de Zipaquirá, han debido desarrollar mecanismos de supervivencia tales como la producción de metabolitos químicamente inusuales con propiedades biosurfactantes, antibióticas e inhibidoras de *quorum sensing*; por esta razón las bacteria halófilas se catalogan como excelentes candidatas para estudios bioprospectivos con miras a encontrar nuevas moléculas bioactivas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Caracterizar bacterias halófilas con potencial bioactivo provenientes de las salinas de Zipaquirá localizadas en Cundinamarca-Colombia con el fin de contribuir a los estudios de bioprospección (diversidad biológica, química y potencial de aplicación) del país.

### **2.2 Objetivos específicos**

Establecer las condiciones óptimas de recolección, aislamiento y cultivo de las bacterias halófilas aisladas de las salinas de Zipaquirá-Colombia.

Identificar las bacterias halófilas aisladas mediante métodos moleculares y perfiles bioquímicos.

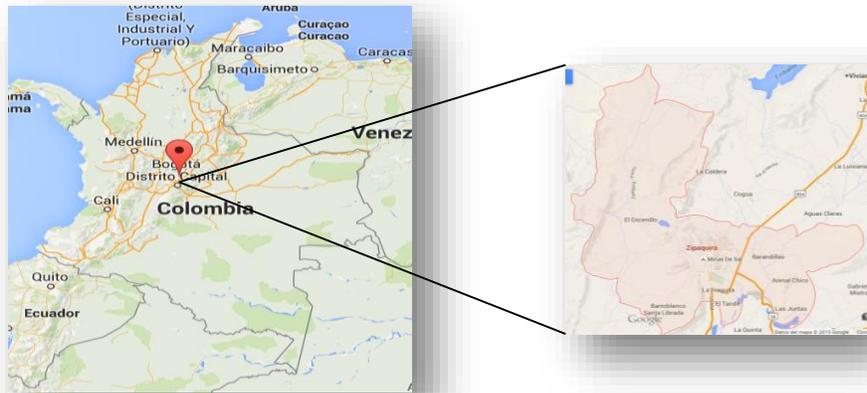
Establecer el potencial bioactivo de las bacterias halófilas aisladas como productoras de biosurfactantes, antibióticos e inhibidores de *quorum sensing*.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se exponen los pasos a seguir en la investigación, teniendo en cuenta el siguiente orden: **1)** toma de muestras y descripción de las zonas, **2)** aislamiento de las cepas, **3)** caracterización genotípica y fenotípica de los aislados, **4)** degradación de sustratos específicos y sensibilidad a antibióticos por parte de las cepas, **5)** Evaluación de actividad enzimática, biosurfactante, antibiótica e inhibidora de *quorum sensing*.

#### 3.1 Descripción del sitio de muestreo

Las muestras utilizadas en este estudio fueron recolectadas en cuatro zonas, localizadas dentro de la mina de sal de Zipaquirá a una altura aproximada de 2.652 m.s.n.m (5°01'08.2"N, 74°00'39.49"W) (Figura 6) en el departamento de Cundinamarca, Colombia.



**Figura 6.** Ubicación geográfica de Zipaquirá en Colombia.

Descargado de: <https://www.google.com/maps/place/Zipaquir%C3%A1,+Cundinamarca,+Colombia/@4.9054548,-74.2184179,9z/data=!4m2!3m1!1s0x8e406fe0433c8483:0xb98840c5a6a9e769>

##### 3.1.1 Descripción de las zonas de muestreo

Los muestreos en la mina de sal se realizaron en Septiembre de 2013; siguiendo la metodología descrita por Roohi en 2012<sup>61</sup> y Narvaez, 2007<sup>73</sup> quienes basaron su estudio en el aislamiento de microorganismos halófilos de diferentes ecosistemas salinos, entre los que se encuentran minas de sal y lagos.<sup>26,32</sup>

---

<sup>73</sup> Narvaez, V.; Suarez, G. *Aislamiento e identificación de bacterias aerobias halófilas con actividad proteolítica procedentes de piscinas de la industria de sal ECUASAL localizada en Santa Elena – Ecuador*. Tesis. Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador. 2007.

Se muestrearon en total 4 zonas, las cuales fueron escogidas de acuerdo a la disponibilidad de agua presente en los sitios de recolección y con la menor intervención por parte del hombre; estas zonas se caracterizaron por tener salmuera, sedimento y roca.

### Zona I

Está localizada en la parte no turística de la mina a 20 m de la plazoleta de comidas subterránea, se caracteriza por la presencia de un pozo con agua estancada, el cual recibe el agua procedente de una infiltración (Figura 7).



**Figura 7.** Zona I – Pozo Reja

### Zona II

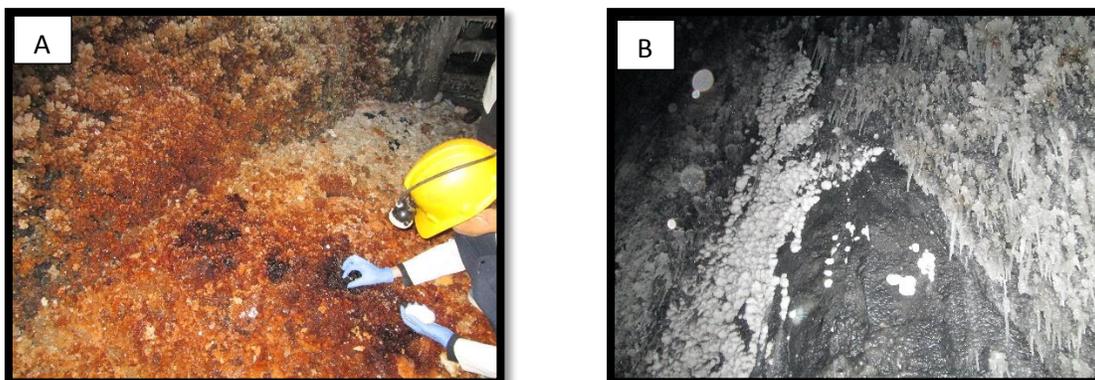
Está localizada a 5 m del escenario del show de luces, en la parte turística de la mina, no se evidenció presencia de agua (Figura 8).



**Figura 8.** Zona II - Pared Marmaja

### Zona III

Está localizada detrás del camerino en la parte no turística de la mina, se caracteriza por la infiltración de agua proveniente de la parte superior del socavón que cae en forma de gotas al suelo, el cual presenta coloraciones entre blanca, negra y marrón. (Figura 9A y 9B).



**Figura 9.** Zona III - infiltración de agua. **A.** Roca presente en el suelo de la zona III. **B.** Parte superior del socavón zona III.

#### Zona IV

Está localizada debajo del camerino, en la parte no turística de la mina, esta zona se caracteriza por la presencia de agua estancada (Figura 10). La zona IV recibe agua procedente de infiltraciones provenientes de la zona III.



**Figura 10.** Zona IV - Camerino

En cada una de las zonas se midió la temperatura ambiental con ayuda de un termómetro láser y el pH del agua con un pHmetro. La composición físico-química del agua se determinó para las zonas I y IV, debido a la cantidad de salmuera presente; estas muestras fueron enviadas a un tercero (Laboratorio Ambiental y Geociencias Antek S.A.S), para su respectivo análisis.

#### 3.1.2 Recolección de las muestras

Para la toma de las muestras se utilizaron tubos Falcon® de 15 mL con 9 mL de TSB + NaCl, placas de agar TSA + NaCl, bolsas plásticas de polietileno estériles vacías, con sello hermético con capacidad de 300 mL y pipetas de vidrio estériles.

Con el fin de favorecer el aislamiento de bacterias halófilas, para la recolección de las muestras se siguió la metodología descrita por Roohi, 2012; utilizando como medio enriquecido y de transporte

caldo tripticasa de soya, suplementado con NaCl al 1%, 3%, 10% y 15% (p/v) (TSB + NaCl) y agar tripticasa de soya suplementado con NaCl al 1%, 3%, 10% y 15% (p/v) (TSA + NaCl) (Anexo 2).<sup>61</sup>

Todos los recipientes y bolsas fueron rotulados con el nombre del sitio de muestreo, el tipo de análisis para el cual se tomaba la muestra y la fecha de recolección, posteriormente fueron transportadas a baja temperatura en neveras de icopor, hasta el laboratorio del grupo de investigación en Bioprospección de la Universidad de La Sabana, donde se refrigeraron a 4°C, hasta el momento de ser procesadas luego de 12 horas de su recolección.

### 3.1.3 Inoculación de las muestras

Las muestras recolectadas en cada zona dependieron de las características geológicas de la misma, siendo inoculadas *In situ* (mina de sal de Zipaquirá) y *Ex situ* (laboratorio de Bioprospección) como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Procesamiento de las muestras *In situ* y en *Ex situ*.

	Zona de recolección	Tipo de muestra	Proceso de inoculación
<i>In situ</i>	I, IV	Agua recolectada a profundidad ( <b>Muestra A y C</b> )	Se transfirió un 1 mL de salmuera en 9 mL de caldo TSB + NaCl, recolectando tres muestras para cada concentración de NaCl.
	III	Gotas de salmuera provenientes de infiltraciones de la parte superior del socavón ( <b>Muestra B</b> )	Se colocaron de 5 a 7 gotas de salmuera en placas de agar. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada concentración de NaCl.
	IV	Roca salina ( <b>Muestra D</b> )	Se colocaron pequeños trozos de roca sobre agar TSA + NaCl a las diferentes concentraciones de NaCl.
<i>Ex situ</i>	I, II, III	Roca salina ( <b>Muestra E, H, I</b> )	Se maceró la roca salina con mortero estéril colocando los trozos sobre agar TSA + NaCl a las diferentes concentraciones de NaCl.
	I	Sedimento ( <b>Muestra F</b> )	Se transfirió 1 mL de sedimento en 9mL de caldo TSB + NaCl Tres muestras para cada concentración de NaCl.
	IV	200 mL de salmuera ( <b>Muestra G, J</b> )	Las muestras se filtraron por un poro 0,22 µm, luego el papel filtro se colocó sobre agar TSA + NaCl

## **3.2 Aislamiento y conservación de las cepas bacterianas**

La caracterización de las cepas bacterianas presentes en las diferentes zonas de la mina se llevó a cabo mediante el aislamiento, seguido de la determinación de características morfológicas, fenotípicas y genotípicas de las cepas aisladas, como se describe a continuación:

### **3.2.1 Incubación de las muestras en los medios de cultivo**

Las muestras inoculadas *In situ* y *Ex situ*, fueron incubadas a 30°C con un 90% de humedad, en oscuridad, con el fin de favorecer el crecimiento.<sup>46</sup> Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 rpm, los medios inoculados fueron incubados durante 10 días y supervisados diariamente.

El crecimiento microbiano se determinó como la presencia de turbidez en medios líquidos y la formación de colonias en las placas de agar, lo cual se empezó a evidenciar entre el tercer y cuarto día posterior a la inoculación.

Con el fin de aislar bacterias provenientes de los medios líquidos, se sembró 0,1 mL de caldo de cultivo sobre placas de agar TSA + NaCl a igual concentración de NaCl, temperatura y tiempo al cual fueron incubados inicialmente.

### **3.2.2 Aislamiento de las cepas microbianas**

El aislamiento de las cepas bacterianas se llevó a cabo a partir de las colonias recuperadas en las placas de agar TSA + NaCl. Para llevar a cabo el primer aislamiento de las cepas halófilas, el *screening* se basó en las características morfológicas teniendo en cuenta coloración de Gram, elevación, forma, consistencia y pigmentación o liberación de compuestos difusibles. A las colonias que presentaron diferencias en estos aspectos, se les realizó un aislamiento en placa por estrías incubando a 30°C durante 10 días. Este procedimiento se realizó aproximadamente 5 veces dependiendo de la pureza de los aislados, hasta obtener cultivos con una sola morfología.

### **3.2.3 Conservación de las cepas aisladas**

Las bacterias aisladas fueron conservadas en 1 mL de caldo TSB con glicerol 40% (v/v) por triplicado a una temperatura de -80°C e incluidas en la colección de microorganismos del grupo de investigación del laboratorio de Bioprospección de la Universidad de La Sabana.<sup>12,20</sup>

## **3.3 Caracterización fenotípica**

### **3.3.1 Morfología de las células bacterianas aisladas**

La determinación de la morfología bacteriana se llevó a cabo mediante la observación en estereoscopio de las colonias aisladas teniendo en cuenta forma, elevación, borde, superficie, consistencia y pigmentación. Al mismo tiempo se utilizaron tres coloraciones que permitieron evidenciar algunos aspectos microscópicos de la morfología bacteriana como lo son la composición de la pared en cuanto cantidad de peptidoglucano (tinción de Gram), la formación de esporas (Tinción con verde de malaquita) y la presencia de cápsula (Tinción negativa con tinta china).<sup>39</sup>

### 3.3.2 Motilidad de las células bacterianas

La motilidad de las bacterias aisladas se realizó en tubos Falcon® con medio semisólido TSA + NaCl (Anexo 2), para ello se sembró una colonia por punción profunda con aguja de inoculación recta en el centro del tubo e incubando a 30°C, durante 5 días, dependiendo de la cepa. La motilidad se evidenció como la turbidez presente en el medio que se extiende más allá de la línea de siembra.<sup>39</sup>

### 3.4 Caracterización genotípica

Para identificar taxonómicamente los aislados se realizó la amplificación del gen 16S ARNr (~1492pb), siguiendo la metodología de Benlloch 1995.<sup>74</sup>

#### Amplificación del gen 16S ARNr

Para la amplificación se tomaron células de un cultivo puro y fresco en 200 µL de agua estéril libre de RNAsa y DNAsa, las cuales fueron colocadas en nitrógeno durante 24 horas, posteriormente se amplificó el gen 16S ARNr por PCR, usando dos primers universales, 8F-1492R, numerados de acuerdo al mismo gen en *E. coli* con respecto al gen 16S rARN, Las reacciones de PCR se realizaron en tubos eppendorf de 200 µL. Cada reacción de PCR de 50 µl, consistió en 2 µl de células lisadas, 1,4 µl de primers, 0,8 µl de dNTPs (25 mM), 5 µl de *Buffer* para *Taq* (10X), 2,8 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) y 0,8 µl de *Taq* polimerasa. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Anexo 3) realizando una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, anillado a 50°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.<sup>32,63</sup>

#### Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1,2% (p/v). El gel se preparó fundiendo la agarosa en buffer TAE 0,5X; la solución fue enfriada a ~37°C y se adicionó colorante *Syber safe* 1,5 µl, luego fue servido en un molde. La electroforesis se corrió en buffer TAE 0,5X a 90 Voltios\*cm<sup>-1</sup> durante 1 hora, utilizando como marcador de peso molecular Hyperladder III (500 pb-5 Kb) y posteriormente se observaron y analizaron las imágenes de los geles capturados,<sup>5,13</sup> teniendo en cuenta la calidad de las bandas y la posición respecto al marcado de peso molecular.

Los productos de PCR fueron sometidos a secuenciar con la empresa Macrogen Korea <http://www.macrogen.com/>.

---

<sup>74</sup> Benlloch, S Acinas, S.; Antón, J.; López, A.; Luz, P.; Rodríguez, F. **2001**. Archaeal Biodiversity in Crystallizer Ponds from a Solar Saltern: Culture versus PCR. *Microbial Ecology*, 41(1), 12–19.

### **Análisis bioinformática de las secuencias del gen 16S ARNr**

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación fueron editados con el programa CLCbio®. Todas las secuencias de ARNr 16S fueron comparadas contra las bases de datos SILVA <http://www.arb-silva.de/>,<sup>75</sup> Ez-Taxon-e <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/><sup>76</sup> y RDP <http://rdp.cme.msu.edu/>,<sup>77</sup> calculando el porcentaje de similitud con los vecinos más cercanos a las cepas.

### **Análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr**

Para la construcción de los árboles filogenéticos, se utilizó el método de parsimonia usando el algoritmo "*Phylyp DNA parsimony*" como estrategia de agrupamiento en el programa ARB. El alineamiento de las secuencias se realizó con la herramienta "SINA", online disponible en la base de datos de 16S ARNr Silva ([www.silva.org](http://www.silva.org)).<sup>78</sup> Escala= 0.01

## **3.5 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento**

### **3.5.1 Determinación del medio de cultivo óptimo**

Para determinar el medio de cultivo óptimo que favoreciera el crecimiento de los aislados se evaluaron diferentes medios reportados en la literatura como óptimos para bacterias halófilas a las concentraciones de NaCl establecidas en el muestreo (1%, 3%, 10% y 15% (p/v)) entre los que se encuentran: *Modified Growth Medium* (MGM), medio Vreeland (MV) para halófilas extremas, medio Caton (MC) para halófilas moderadas y medio Trypticasa de soya suplementado con NaCl (TS) (Anexo 2).<sup>79</sup> Se usaron como inóculos cultivos de las cepas en caldo TSB + NaCl, luego de 8 días de incubación a 30°C y 200 rpm.

Para los medios líquidos, se transfirieron 3 mL de inóculo a 6 mL de caldo MGM, MV, MC y TSB + NaCl por triplicado incubando a 30°C durante 8 días a 200 rpm, posteriormente se evaluó la turbidez presente en los medios.

Para las placas de agar los inóculos fueron diluidos hasta 10<sup>-6</sup> en solución salina (0.9% p/v) e inoculados en profundidad e incubados durante 8 días a 30°C. El conteo de colonias se realizó para las dos últimas diluciones diariamente.<sup>79</sup>

---

<sup>75</sup> Ribosomal RNA database. SILVA. <http://www.arb-silva.de/>

<sup>76</sup> Ez taxón. <http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>

<sup>77</sup> Ribosomal Database Project at Michigan State University. RDP. <http://rdp.cme.msu.edu/>,

<sup>78</sup> Hall, B. **2013**. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 30(5), 1229-1235.

<sup>79</sup> Rodriguez, F.; Juez, G.; Kushner, J. **1983**. *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *System Appl Microbiol*, 4, 369-381.

### 3.5.2 Determinación de los parámetros óptimos de crecimiento

#### ➤ Temperatura, Salinidad y pH óptimo

Para determinar las condiciones óptimas de crecimiento se establecieron diferentes rangos de temperatura, salinidad y pH como se muestra en la Tabla 4, con un tiempo de incubación de 5 días.

**Tabla 4.** Condiciones óptimas de crecimiento de las cepas aisladas.

Rango de Temperaturas (°C)	Rango de Salinidad (%NaCl p/v)	Rango de pH	Tiempo de incubación
14-20-25-30-37	1-3-5-10-15-20-25-30	5,0-6,0-7,0-9,0-11,0	5 días

--Temperatura y pH óptimo

#### ➤ Metabolismo de respiración microbiano

##### Crecimiento en condiciones aerobias

La capacidad de los aislados de crecer se determinó cualitativamente mediante las siembras en estrías de las cepas sobre agar TSA + NaCl, en condiciones aerobias, incubadas a 30°C durante 5 días. El crecimiento se evidenció en la formación de colonias en el medio.

##### Crecimiento en condiciones anaerobias y microaerofílicas

La capacidad de crecer en condiciones anaerobias se realizó en cámaras de anaerobiosis con anaerogen® mediante la siembra en placa sobre medio TSA + NaCl, usando nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) 10 mM, como aceptor final de electrones e incubadas a 30°C durante 5 días. El crecimiento se evidenció en la formación de colonias en el medio.<sup>12,33</sup>

Para determinar el crecimiento en condiciones de microaerofilia se inocularon las cepas halófilas en tubos Falcon® de 15 mL con 5 mL de medio TSA suplementado, posteriormente se introdujo en el tubo una capa de 1 cm de vaselina a la cual se le hicieron pequeñas perforaciones con una aguja estéril. Los tubos inoculados se incubaron a 30°C durante 5 días. El crecimiento se evidenció en la turbidez del medio.

##### Condiciones de cultivo utilizadas durante el estudio

Es importante destacar que luego de determinar las condiciones óptimas de crecimiento, todos los ensayos posteriores se realizaron bajo las siguientes condiciones (Tabla 4):

- **Medio de cultivo:** Trypticasa de soya suplementado con NaCl
- **Temperatura de incubación:** 30°C

- **pH:** 7,0
- **Salinidad:** Las cepas fueron sembradas a la concentración de NaCl (p/v), óptima de crecimiento teniendo en cuenta halotolerantes 3%, halófilas débiles 3%, halófilas moderadas 10%, halófilas extremas 25%.
- **Tiempo de incubación:** 5 días en oscuridad.

### 3.6 Determinación de la utilización de sustratos orgánicos y sensibilidad a antibióticos

#### 3.6.1 Utilización de sustratos orgánicos

Con el fin de evaluar la capacidad de las cepas para emplear diferentes compuestos como fuentes de carbono, se utilizó el kit API 20E<sup>®</sup> para bacterias Gram-negativas, API 50CH<sup>®</sup> para Gram-positivas y API Staph<sup>®</sup> para el género *Staphylococcus*, de Biomerieux, tomando como inóculo de la galería de bacterias Gram-negativas solución salina al 7% (p/v),<sup>64</sup> de API 50CH<sup>®</sup> caldo API 50CHB<sup>®</sup> y para API Staph<sup>®</sup> una ampolla de API *Staph medium*, llevándolos a la concentración indicada por el fabricante.

La inoculación de las galerías se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante, depositando agua en la cubierta de las galerías y colocando 200 µl de inóculo en cada microtubo con sustrato deshidratado; los test fueron incubados a 30°C durante 5 días, posteriormente los resultados fueron analizados de acuerdo con a las instrucciones proporcionadas por bioMérieux en la galería API<sup>®</sup>.

#### 3.6.2 Determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos

Estos ensayos se realizaron para determinar el perfil de susceptibilidad de las cepas, mediante la exposición de las cepas a 6 antibióticos diferentes entre los que se encuentran ampicilina (150 µl), tetraciclina (75 µl), kanamicina (150 µl), ácido nalidíxico (4 µl), nitrofurantonia (150 µl) y gentamicina (75 µl), adicionando los antibióticos al medio TSA + NaCl estéril, seguido de la siembra por estrías e incubando a 30°C durante 5 días. La inhibición del crecimiento se evidenció en la ausencia de colonias en el medio.<sup>80,81</sup>

---

<sup>80</sup> Lee, S.; Oh, T.; Kim, W.; Yoon, H. **2010**. *Oceanobacillus locisalsi* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2758–62.

<sup>81</sup> Sánchez, C.; Tokunaga, H.; Tokunaga, M.; Ventosa, A. **2007**. *Chromohalobacter japonicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Japanese salty food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2262–2266.

### 3.7 Actividad biológica de las cepas aisladas

#### 3.7.1 Actividad antibiótica

Esta prueba permitió determinar las cepas capaces de producir compuestos que inhiben el crecimiento de otras bacterias.

#### Pruebas de *T-streak* y *Kirby Bauer* (Ensayo 1)

La técnica de *T-streak*, consistió en realizar una estría de la cepa halófila a enfrentar en el centro de la caja de Petri y perpendicular a ésta se siembran los microorganismos a inhibir.

Para la prueba de *Kirby Bauer*,<sup>8</sup> se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se cultivaron las bacterias halófilas en 5 mL de caldo TSB + NaCl a 30°C, 200 rpm durante 5 días, luego los caldos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 15 minutos.
2. Las bacterias cuyo crecimiento se pretendía inhibir se incubaron en caldo Luria-Bertani (LB) (Anexo 2), durante 24 horas a 30°C y 200 rpm, monitoreando el crecimiento mediante densidad óptica a 600 nm. Para ello, se incluyeron en este análisis: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumani* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 23724, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 21556.
3. Luego del periodo de incubación, la cepa a enfrentar se sembró sobre agar LB o TSA + NaCl y con ayuda de un sacabocados, se hicieron pozos sobre la placa que fueron inoculados con 100 µL de sobrenadante proveniente del cultivo de las bacterias halófilas descrito en el numeral 1. La producción de antimicrobianos se evidenció por la formación de halos alrededor de los pozos inoculados.

#### 3.7.2 Detección de la producción de enzimas hidrolíticas

Para determinar la producción de enzimas por parte de las cepas aisladas, se agregó al medio TSA + NaCl, los sustratos a hidrolizar (almidón, caseína, tributirina y celulosa), posteriormente se sembró por estrías las cepas halófilas, las cuales fueron incubadas a 30°C durante 5 días,<sup>20</sup> los controles positivos y negativos permitieron establecer que no existían interferentes que impidieran la veracidad de los resultados de las pruebas, para ello se utilizaron microorganismos productores de enzimas hidrolíticas. Como control negativo se utilizó medio sin inocular.

#### Actividad amilolítica

Para determinar la actividad amilolítica se adicionó al medio TSA + NaCl 2 g/L de almidón soluble de yuca, luego de la incubación se agregó a la caja de Petri 5 mL de una solución de lugol (I<sub>2</sub> 0.026% + KI 0.26%), que permite evidenciar la presencia de halos de hidrólisis alrededor de las colonias.

Como control positivo se utilizó *Bacillus lincheniformis*, el cual fue sembrado inicialmente en caldo nutritivo e incubado durante 24 horas a 37°C, posteriormente la cepa se inoculó en medio TSA con almidón (2 g/L) y se incubó a 37°C durante 24 horas.

#### **Actividad proteolítica**

La actividad proteolítica se determinó adicionando 3 g/L de leche descremada al agar TSA + NaCl, luego de la incubación se determinó cualitativamente la formación de halos de proteólisis en el agar.<sup>12</sup>

Como control positivo se usó la cepa de *Bacillus subtilis*, la cual fue sembrada inicialmente en caldo nutritivo e incubado durante 24 horas a 37 ° C, posteriormente la cepa se inoculó en medio TSA con leche descremada (3 g/L) y se incubó a 37°C durante 24 horas.

#### **Actividad lipolítica**

Para la actividad lipolítica se utilizó tributirina 10 g/L, adicionada al medio TSA + NaCl. La actividad se evidenció luego de la incubación por la formación de halos alrededor de las colonias debido a la hidrólisis del triglicérido, dejando el medio translúcido.

Como control positivo se usó la cepa de *Aspergillus niger*, la cual fue inoculada inicialmente en caldo nutritivo e incubado durante 3 días a 25 ° C, posteriormente la cepa se sembró en medio TSA con tributirina (10 g/L) y se incubó a 25°C durante 5 días.

#### **Actividad celulolítica**

Para determinar la actividad celulolítica se adicionó al medio TSA + NaCl 1%(p/v) de carboximetil celulosa (CMC), luego de la incubación se agregó a la caja de 5 mL de rojo congo 1% (p/v) durante 15 minutos, posteriormente se retiró el exceso de colorante y se adicionaron 5 mL de una solución de NaCl 0,1 M, dejando actuar durante 15 minutos, la hidrólisis se evidenció como la presencia de halos alrededor de las colonias.

Como control positivo se usó la cepa de *Pleurotus ostreatus*, la cual fue sembrada inicialmente en caldo nutritivo e incubado durante 3 días a 25 ° C, posteriormente la cepa se inoculó en medio TSA con tributirina (10 g/L) y se incubó a 25°C durante 5 días.

### **3.7.3 Métodos para la determinación de biosurfactantes en las muestras provenientes de las bacterias halófilas aisladas**

#### **Producción de matriz gelatinosa y biosurfactantes**

Para evaluar la producción de biosurfactantes, las cepas aisladas se inocularon en 10 mL de medio TSB + NaCl al cual se le adicionó 0,1% (p/v) de glucosa y sacarosa e incubando a 30°C y 200 rpm

durante 10 días. La producción de biosurfactantes fue evaluada mediante la medición de la tensión superficial del medio y el análisis cualitativo en microplacas.

### **Medición de la tensión superficial**

La tensión superficial del medio de cultivo se determinó mediante el método de la placa, el cual mide la fuerza que ejerce la superficie a la cual se desea determinar la tensión superficial, sobre una placa lisa de platino. Para llevar a cabo esta prueba se colocó una placa de geometría rectangular sobre la superficie del líquido, realizando 5 repeticiones de la medición. Como controles se utilizó medio de cultivo sin inocular, agua y Tween 20.<sup>64</sup>

### **Análisis cualitativo en microplacas**

El ensayo cualitativo de microplacas se fundamenta en la capacidad que tienen los tesoactivos de generar una distorsión óptica o efecto lupa. Para ello, luego del periodo de incubación, los caldos de cultivo fueron centrifugados a 10000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se sirvieron 100  $\mu$ L de sobrenadante en cada pozo en una placa de 96 pozos. La placa fue analizada usando como base una hoja de papel cuadrículada a blanco y negro.<sup>64</sup>

### **Obtención de los biosurfactantes**

La separación de fases se llevó a cabo adicionando 5 mL de diclorometano a 5 mL caldo de cultivo, seguido de agitación; los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente en una gradilla durante 24 horas con el fin de garantizar la separación de las fases, posteriormente fue separada la fase orgánica de la acuosa. El solvente de la fase orgánica fue evaporado y luego estas muestras fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilizadas durante 12 horas.<sup>57</sup>

### **Espectroscopia infrarroja**

La espectroscopía infrarroja es una técnica instrumental espectroscópica que permite establecer la presencia de los grupos funcionales en las moléculas que conforman la matriz gelatinosa o los biosurfactantes, para ello se utilizó 1 mg de la matriz gelatinosa liofilizada disuelta en 100 mg de bromuro de potasio en el equipo IR NICOLET ISIO.

#### **➤ Actividad biológica de los biosurfactantes.**

### **Ensayo de inhibición de cepas patógenas ATCC**

El material liofilizado se reconstituyó en 10  $\mu$ L de agua y 290  $\mu$ L de metanol y se transfirieron 30  $\mu$ L a cada sensidisco. Los microorganismos cuyo crecimiento se pretendía inhibir fueron inoculados en caldo LB a  $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, durante 48 horas, determinando el crecimiento final por densidad óptica a 600 nm, posteriormente los inóculos de los patógenos fueron sembrados en masivo sobre agar

LB y los discos fueron colocados sobre el agar inoculado incubando a 30°C durante 48 horas. La inhibición se evidenció por la presencia de halos alrededor de los discos.

Las cepas ATCC que se utilizaron fueron: *Acinetobacter baumani* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 23724, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 21556 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

#### **Ensayo de inhibición de *quorum sensing***

Para este ensayo se llevó a cabo la misma metodología descrita en el numeral anterior, utilizando la cepa *Chromobacterium violaceum* ATCC 31592, la cual fue inoculada en caldo LB a 30°C y 200 rpm durante 48 horas dependiendo de la cepa, determinando el crecimiento final por DO a 600 nm. Las cepas fueron sembradas en masivo sobre agar LB e incubadas a 30°C durante 48 horas. La inhibición de *quorum sensing* se evidenció en el color blanco de las colonias alrededor de los discos, debido a la inhibición de la comunicación de los sistemas de *quorum sensing*, inhibiendo la producción de violaceina, que le da el pigmento violeta a las colonias.<sup>57</sup>

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización fisicoquímica de las zonas de muestreo

Se escogieron 4 zonas de muestreo, de acuerdo a la disponibilidad de agua presente y con el menor impacto por parte del hombre, estas zonas registraron en el momento del muestreo una temperatura de 16°C, un pH del agua cercano a la neutralidad en las infiltraciones provenientes de agua subterráneas (Tabla 5) y oscuridad, condiciones similares han sido reportadas en minas de sal en Pakistán y en China donde se han aislado bacterias halófilas, lo que permitió intuir desde un principio que la mina de sal es un ecosistema que presenta algunos parámetros físicos que favorecen el crecimiento y desarrollo de bacterias halófilas.<sup>82</sup>

Los ecosistemas salinos presentan diferencias o similitudes entre los parámetros ambientales, de acuerdo a las condiciones geográficas en que se encuentren. Un ejemplo de ello son los parámetros evidenciados en los Manantiales salinos de Risaralda y Boyacá- Colombia,<sup>20</sup> los cuales guardan similitudes con los registrados en la mina de sal China, excepto por la presencia de luz,<sup>46,83</sup> la cual influyó notoriamente en el aislamiento de algunos géneros bacterianos.

**Tabla 5.** Condiciones físicas de cada sitio de muestreo

Zona	Nombre zona	Temperatura ambiental (°C)	pH del agua
I	Pozo reja	13,8	6,65
II	Pared marmaja	16,8	N/A
III	Infiltración	15,0	6,78
IV	Camerino	19,5	6,84

N/A: No aplica

#### 4.1.1 Características físico-químicas del agua de las zonas I y IV

Los parámetros físico-químicos del agua se evaluaron en las zonas I y IV, ya que presentaron mayor cantidad de agua, en comparación con la zona II, en donde no había presencia de agua y la zona III, en que la solamente caían gotas de salmuera provenientes de infiltraciones. El análisis anterior permitió establecer que las zonas I y IV, tienen un pH cercano a 6, una concentración de sólidos disueltos >50.000 mg/L y rangos de conductividad mayores a 60,000  $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ , lo cual permite clasificarlas como aguas hipersalinas.<sup>84</sup> La cantidad de cloruros, nitratos, nitritos, materia orgánica,

<sup>82</sup> Castillo, L.; Barragán, E. **2011**. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4, 45-54.

<sup>83</sup> Castillo, L.; Barragán, E. **2011**. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4, 45-54.

<sup>84</sup> Thomas, C.; Ionescu, D.; Ariztegui, D. **2014**. Archaeal populations in two distinct sedimentary facies of the subsurface of the Dead Sea. *Marine Genomics*, 17, 53–62.

hierro total, calcio, magnesio, potasio y sodio es mayor en la zona I que en la zona IV, a diferencia de la zona IV la cual presentó un mayor contenido de sulfatos que en la zona I. En cuanto a las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  (Tabla 6), se estableció que estas son mayores en las muestras de agua de la mina que en las reportadas en otros ambientes hipersalinos reconocidos por su elevada concentración de sal, como son el Mar Muerto, que presenta una concentración  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  de 224000 mg/L y 40100 mg/L respectivamente.<sup>84</sup>

Los parámetros mencionados anteriormente, son esenciales para el crecimiento de bacterias halófilas, principalmente la cantidad de magnesio y potasio, los cuales están involucrados en procesos que permiten a las bacterias soportar altas concentraciones de sal, debido a que ayudan a regular la presión osmótica con el medio, mientras que los nitratos, los nitritos, los sulfatos y el calcio, son necesarios para llevar a cabo las rutas metabólicas propias de la célula, así mismo, la materia orgánica es usada por las bacterias como fuente de gran variedad de nutrientes.<sup>46</sup>

**Tabla 6.** Características fisicoquímicas del agua de las zonas I y IV

PARAMETRO	UNIDADES	TECNICA ANALITICA	METODO	Zona I	Zona IV
pH	Unidades	Electrométrico	SM4500H+B	6,03	5,83
Conductividad	$\mu\text{S}/\text{cm}$	Electrométrico	SM2510B	>200 000	>200 000
Cloruros	mg/L $\text{Cl}^-$	Argentométrico	SM4500-CLB	452 000	637 000
Sulfatos	mg/L $\text{SO}_4^{2-}$	Turbidimétrico	SM4500-SO4-2E	378	1320
Nitratos	mg/L N- $\text{NO}_3$	Espectrofotométrico Uv	SM4500-NO3B	0,851	0,374
Nitritos	mg/L N- $\text{NO}_2$	Colorimétrico	SM4500-NO2B	0,059	0,012
Fosforo reactivo total	mg/L P	Digestión-colorimétrico	SM4500PE	<0,062	<0,062
Materia orgánica	mg/L	Oxidación de persulfato	-----	653	435
Sólidos disueltos totales	mg/L	Electrométrico	SM2510B	>50 000	>50 000
Hierro total	mg/L	E.A.A.	SM3030E-SM3111B	0,537	0,123
Calcio	mg/L	E.A.A.	SM3111D	3 080	2 370
Magnesio	mg/L	E.A.A.	SM3111B	1 350	692
Potasio	mg/L	E.A.A.	SM3111B	1 570	785
Sodio	mg/L	E.A.A.	SM3111B	113 000	104 000

N.E: No establecido N.A: No aplica E.A.A: Espectrometría de Absorción Atómica E.A.A: Espectrometría de Emisión Atómica. Método de análisis utilizado: Standard Methods for the examination of wáter & wastewater 22nd edition 2012. Apha, Awwa, Wep.

## 4.2 Aislamiento de bacterias halófilas

Utilizando la metodología descrita en el numeral 2.3, se lograron aislar 41 cepas de la mina de sal, de las cuales el 54% pertenecen a la zona IV, el 29% a la zona I, el 15% a la zona III y el 2% a la zona II (Tabla 7), de las cuales la mayoría de cepas provenían de muestras de agua, seguidas de los aislamientos provenientes de sedimento y roca, lo anterior puede estar asociado a que los nutrientes y las sales en el agua se encuentran disueltos siendo más fácil el transporte de los mismos, lo que genera un mayor número de microorganismos en medios líquidos que en sólidos.<sup>85,86</sup>

**Tabla 7.** Número de cepas halófilas aisladas de cada zona de muestreo

Concentración de NaCl (%)	Cepas halófilas por zona				Total
	I	II	III	IV	
1	7	1	3	0	11
3	2	0	1	7	10
10	2	0	2	6	10
15	1	0	0	9	10
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>22</b>	<b>41</b>

### 4.2.1 Características morfológicas de los aislados bacterianos

Se evidenció la presencia de diferentes morfologías bacterianas, entre las que se encuentran 30 cepas con forma irregular y 11 puntiformes, en su mayoría con elevación convexa, borde redondo, superficie lisa, consistencia cremosa o mucóide y coloraciones variadas (blanca, crema, amarilla, naranja, roja y rosada) (Anexo 1 y 5). Estas características morfológicas han sido previamente reportadas para bacterias halófilas, como es el caso de las salinas de Karak, en Pakistán<sup>61</sup> y en el Mar Muerto en Israel.<sup>59</sup> En general, la morfología microscópica más frecuente aislada de la mina de Zipaquirá fueron bacilos Gram-positivos seguida de bacilos Gram-negativos (Figura 11 y Tabla 8). Según estudios realizados en el Lago salado de El-Djerid (Tunisia)<sup>62</sup> y en los suelos salinos de Coahuila (México),<sup>87</sup> los bacilos han sido la morfología bacteriana más encontrada en este tipo de ambientes, lo cual es consistente con las observaciones microscópicas realizadas en esta mina de sal.

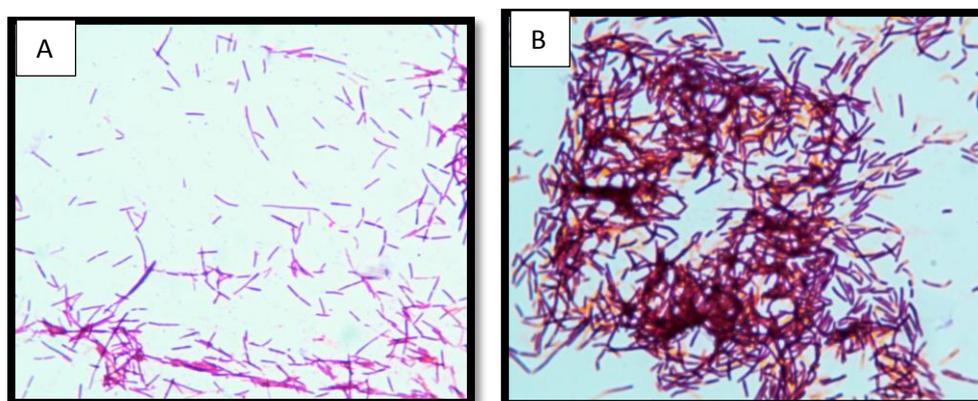
<sup>85</sup> Curtis, T.; Sloan, W.; Scannell, J. **2002**. Estimating prokaryotic diversity and its limitis. *Prokaryotic Nat Acad SciU*, 99 (16), 10494-10499.

<sup>86</sup> Torsvik, V.; Ovreas, L.; Thingstad, T. **2002**. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics and controlling factors. *Science*, 296, 1064-1066.

<sup>87</sup> Castro, L.; Flores, A.; Rodríguez, A.; Aguilar, M.; Aguilar, C.; Rodríguez, R. **2011**. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro ciénagas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5 (3), 33-43.

**Tabla 8.** Morfología microscópica de las cepas aisladas en distintas concentración de NaCl

Concentración de NaCl (%)	Cocos Gram positivos	Cocos Gram negativos	Bacilos Gram positivos	Bacilos Gram negativos
1	8	-	3	-
3	1	1	7	1
10	-	-	4	6
15	1	-	3	6
<b>Total</b>	10	1	17	13

**Figura 11.** Coloración de Gram. **A.** Bacilos Gram positivos de la cepa 432. **B.** Bacilos Gram negativos cepa 3S31

Las esporas bacterianas son estructuras de resistencia que permiten a las bacterias sobrevivir a condiciones extremas, proporcionándoles una ventaja competitiva frente a especies no esporuladas. La presencia de esporas se determinó mediante la tinción con verde de malaquita, encontrando que 16 aislados poseen endoesporas como se muestra en el Anexo 5. La presencia de esporas ha sido reportada para algunos géneros de bacterias halófilas como lo son *Oceanobacillus*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus* y *Ornithinibacillus*.<sup>30,32</sup>

Por otra parte, en la tinción negativa con tinta china se observó que la cepa 137 presenta una posible cápsula que se observó al realizar la coloración negativa con tinta china, como se muestra en la Figura 12 (Anexo 5), la cual además de ser una estrategia de supervivencia, permite tener un equilibrio osmótico con el medio.<sup>22</sup>



**Figura 12.** Tinción negativa con tinta china de la cepa 137

La motilidad le confiere a las bacterias la posibilidad de desplazarse en el medio, lo que les proporciona una ventaja competitiva frente a otros microorganismos no motiles.<sup>32</sup> En cuanto a la capacidad de motilidad por parte de los aislamientos, se evidenció que más del 80% de los aislados son bacterias motiles (Anexo 5), como se ve a modo de ejemplo en la Figura 13.



**Figura 13.** Prueba de motilidad de la cepa 1S32 en agar TSA + NaCl semisólido.

### 4.3 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento

#### 4.3.1 Crecimiento en distintos medios de cultivo para bacterias halófilas

El medio de cultivo en el cual se evidenció un mayor crecimiento de bacterias, traducido como un incremento de la turbidez del medio y mayor recuento de colonias en medio sólido, fue el medio Tripticasa de soya (TS + NaCl), en contraste con los medios *Modified Growth Medium* (MGM), medio Vreeland (MV) y medio Caton (MC).<sup>46</sup> El medio TS + NaCl, ha sido ampliamente reportado para el crecimiento de bacterias halófilas provenientes de diferentes tipos de muestras,<sup>61,32,46</sup> ya

que este medio proporciona sustratos más simples de degradar, lo que favorece el crecimiento, con un periodo de incubación máximo de 5 días, debido a que la mayoría de cepas tienden a disminuir el recuento de colonias, entre el cuarto y quinto día posterior a la inoculación.<sup>5,30,32</sup>

#### 4.3.2 Temperatura, pH y metabolismo de respiración

Los valores de temperatura y pH óptimos de crecimiento determinados en los ensayos fueron una temperatura de 30°C y un pH de 7,0, los cuales están dentro de los rangos establecidos por Shneegurt en 2012 para bacterias halófilas aerobias, siendo la temperatura óptima 30°C y el pH entre 6,8 a 7,5.<sup>46</sup> Por otra parte, no se presentó crecimiento en condiciones de anaerobiosis con  $\text{NO}_3^-$  como aceptor final de electrones, ni en condiciones de microaerofilia, como se deduce de los resultados de recuento en las condiciones evaluadas.

#### 4.3.3 Concentración de NaCl

Las halófilas extremas son el grupo de bacterias con menor número de aislamientos reportados, debido a que requieren condiciones físico-químicas específicas, entre las que se destaca extrema salinidad, debido a esto, gran parte de los estudios enfocados en el aislamiento de bacterias halófilas han encontrado cepas en su mayoría halotolerantes y moderadas,<sup>5</sup> sin embargo, es importante destacar que en la mina de Zipaquirá fue posible aislar 6 cepas de bacterias halófilas extremas (415, 439, 433, 434, 436, 137) capaces de crecer en un rango de salinidad entre 20-30% (p/v) de NaCl; siendo en su mayoría aisladas de la zona IV, esto probablemente debido a alta salinidad que presenta el entorno del cual fueron aisladas, siendo la zona IV, un ambiente propicio para el aislamiento de nuevas especies de bacterias halófilas extremas.

### 4.4 Diversidad de las bacterias aisladas

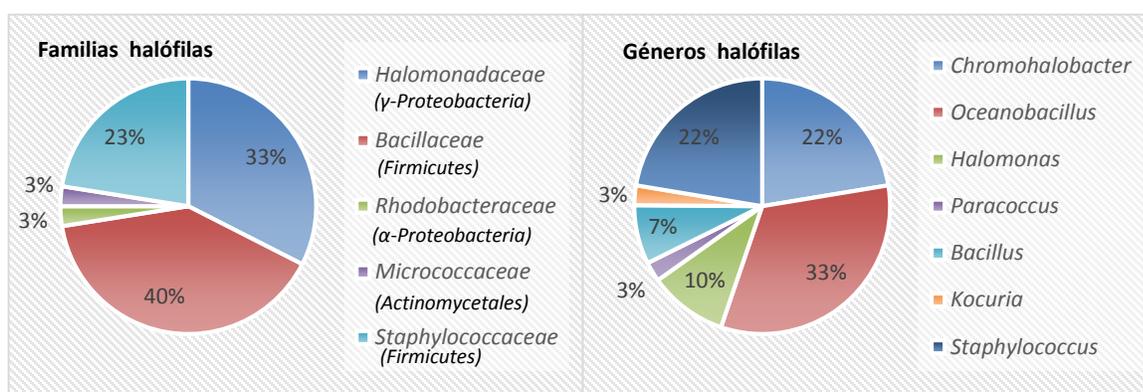
#### 4.4.1 Clasificación taxonómica

La caracterización molecular se llevó a cabo usando como marcador la subunidad pequeña del gen 16S ARNr, lo cual permitió confirmar que las cepas aisladas pertenecen al dominio *Bacteria* y guardan similitudes con bacterias halófilas, como se observa en la Gráfica 1.

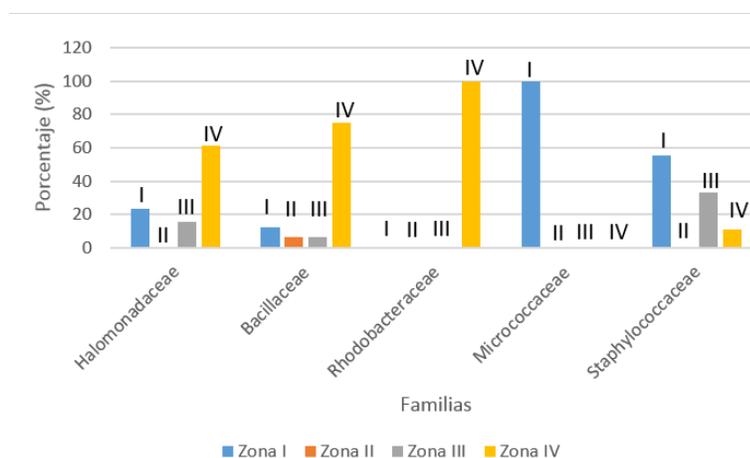
El análisis filogenético indicó que los aislamientos están afiliados a las familias *Halomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* (Figuras 14 y 15), encontrándose un mayor número de aislados en la familia *Bacillaceae*, la cual posee representantes en las cuatro zonas de muestreo. En contraste las cepas pertenecientes a las familias *Micrococcaceae* y *Rhodobacteraceae* fueron aisladas únicamente de las zonas I y IV respectivamente (Gráfica 2). Estas familias ya habían sido detectadas en otros ambientes salinos como lo reportó Roohi en el 2014 en la minas de sal de Karak (Pakistan), donde se aislaron cepas pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Kocuria*, *Oceanobacillus*, *Bacillus* y *Staphylococcus* de 5 zonas diferentes.<sup>61</sup> Lo anterior permite intuir que la mina de sal de Zipaquirá, es un ecosistema con un perfil diverso de bacterias,

distribuidas específicamente en las zonas muestreadas, entre las que fue posible aislar 13 especies nuevas, de acuerdo al bajo porcentaje de identidad (<98%) y a los perfiles bioquímicos y de sensibilidad a antibióticos.

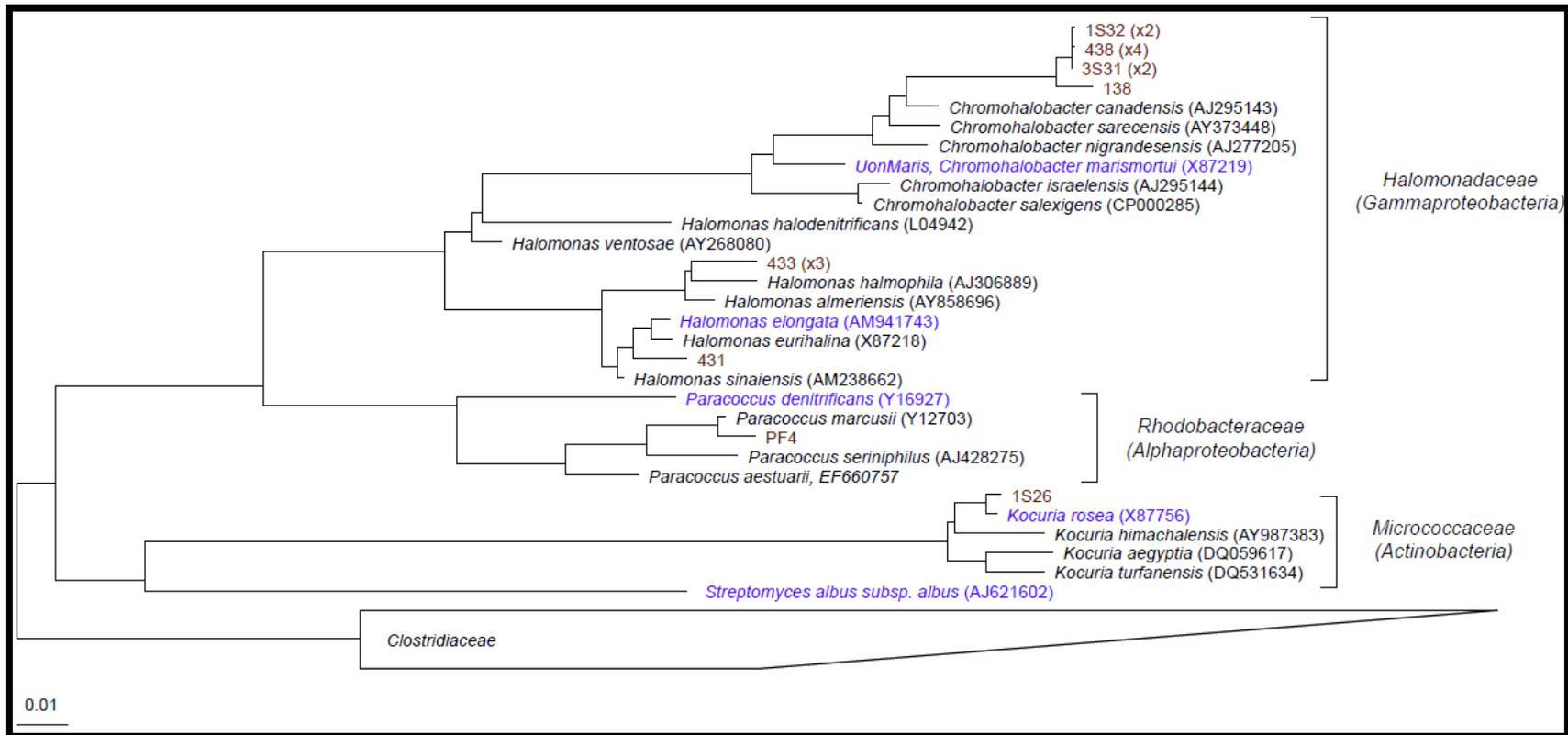
La cepa 137 presentó dificultades en el momento de amplificar y secuenciar el gen ARNr 16S, por lo que no fue posible clasificarla taxonómicamente. Este aislado se caracterizó por ser un halófilo estricto, con una pigmentación roja en las colonias. Actualmente, se están adelantando ensayos para determinar la naturaleza del pigmento y se enviaron nuevamente muestras a Macrogen® para su identificación, por tal razón los resultados de su clasificación taxonómica no se presenta en este trabajo.



**Gráfica 1.** Diversidad de familias y géneros presentes en los aislamientos identificados por secuenciación del gen 16S ARNr. \*() Filo al que pertenece la familia.



**Gráfica 2.** Diversidad de familias halófilas aisladas por zonas de muestreo



**Figura 14.** Árbol filogenético generado para las familias *Halomonadaceae*, *Rhodobacteraceae* y *Micrococcaceae*.

Para la construcción del árbol filogenético, se utilizó el método de parsimonia usando el algoritmo "*Phylip DNA parsimony*" como estrategia agrupamiento en el programa ARB. El alineamiento de las secuencias se realizó con la herramienta "SINA" online disponible en la base de datos de ARNr 16S Silva ([www.silva.org](http://www.silva.org)). La familia *Clostridiaceae* fue usada como grupo externo. Escala= 0.01. \*(xn): número de cepas por clado. \*\*Cepas color café: Aislados de la mina de sal de Zipaquirá – Cepas color azul: cepas de referencia.



➤ Filo *γ-Proteobacteria*

**Familia *Halomonadaceae***

El análisis filogenético derivado de la secuenciación del gen 16S ARNr permitió determinar que 9 cepas (22,5%) pertenecen al género *Chromohalobacter* y 4 (10%) al género *Halomonas* (Figura 14).

• **Género *Chromohalobacter*.**

Las cepas catalogadas dentro de este género poseen similitudes morfológicas con *C. canadensis* (Tabla 9), un halófilo moderado que tiene como hábitats principales el Mar Muerto y las salinas marinas.<sup>88</sup> A pesar de las semejanzas entre los aislados y la especie más cercana, los porcentajes de identidad de los OTUS aislados con respecto a *C. canadensis* son menores al 98,7%, lo que permite inferir que se trata de nuevas especies.<sup>42</sup> En el árbol filogenético las cepas se agruparon en clados de acuerdo a la zona de recolección, excepto la cepa 138, la cual se encuentra separada en una sola rama, a su vez, las cepas 415 y 439 aisladas de la zona IV, poseen una característica poco frecuente en el género *Chromohalobacter*, como es la capacidad de vivir en altas concentraciones de sal (20% y 30% NaCl (p/v)).<sup>88</sup>

**Tabla 9.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Chromohalobacter*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Halotolerancia	Especie cercana	% de identidad
Bacilos Gram-negativos, curvos, no esporoformadores, móviles (Anexo 1)	Roca, no seguido de agua y sedimentos	I	138	Tolerante	<i>C. canadensis</i>	97,9
			1S32	Moderado		97,9
			1S33			97,9
		III	3S31	Moderado		97,9
			3S32			97,9
		IV	415	Extrema		97,9
			416	Moderado		97,8
			438			97,8
			439	Extrema		97,7

Respecto a los perfiles de degradación de azúcares, se pudo establecer que son iguales para las cepas 138 y 1S33; 415 y 416; 438 y 439 (Tabla 10), mientras que el perfil de susceptibilidad a

<sup>88</sup> Arahal, D.; Garcia, T.; Ludwig, W.; Schleifer, K.; Ventosa, A. 2001. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1443–1448.

antibióticos fue idéntico solo para las cepas 138 y 1S33 (Tabla 11). Lo anterior permite inferir que las cepas que guardan similitudes en cuanto a degradación y sensibilidad, comparten la misma maquinaria metabólica, la cual depende de las condiciones proporcionadas por las zonas de recolección o en laboratorio. En cuanto a las diferencias de los perfiles registrados por los aislados con el vecino más cercano, estas se deben posiblemente a que la primera cepa reportada de *C. canadensis*, fue aislada de salinas marinas, lo que hace que las rutas metabólicas para adaptarse a este entorno sean diferentes a las que podría llegar a necesitar en una mina, debido a que parámetros como presencia de luz, temperatura y concentración de sal son diferentes entre estos ecosistemas.

Tabla 10. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Chromohalobacter*.

Prueba Bioquímica	<i>Chromohalobacter</i>									
	138	1S32	1S33	3S31	3S32	415	416	438	439	A
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	-	+	-	-	+	+	-	-	ND
ADH	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CIT	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
IND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
GEL	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
GLU	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
SAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
MEL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
ARA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	ND

\*ONPG: 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida, ADH:L-arginina, LCD: L-lisina, ODC: L-ornitina, CIT: Citrato de sodio, H<sub>2</sub>S: Tiosulfato de sodio, URE: urea, TDA: L-triptofano, IND: L-triptofano (Indol), VP: Voges-Proskauer, GEL: gelatina, GLU: D-glucosa, MAN: D-manitol, INO: Inositol, SOR: D-sorbitol, RHA: L-ramnosa, SAC: D- sacarosa, MEL: D-melibiosa, SAC: D-sacarosa, AMY: Amigdalina, ARA: L-arabinosa.

\*\* A: *C. canadensis*

\*\*\*ND: datos no disponibles

Tabla 11. Sensibilidad a antibióticos de los géneros aislados.

Género	Cepa	Amp	TeC	Kan	AN	NT	Gen
<i>Chomohalobacter</i>	138	+	-	-	+	-	-
	1S32	-	-	+	-	-	+
	1S33	+	-	-	+	-	-
	3S31	-	-	+	-	-	+
	3S32	-	-	+	-	-	+
	415	+	+	+	+	+	-
	416	+	-	+	+	-	+
	438	-	+	+	+	-	+
	439	+	+	+	+	+	+
<i>Halomona</i>	431	-	-	-	-	-	-
	434	-	+	+	+	+	+
	433	-	+	+	+	+	+
	436	-	+	-	+	-	+
<i>Oceanobacillus</i>	413	+	-	+	+	-	+
	412	-	-	-	+	+	+
	432	+	-	+	+	-	+
	441	-	-	+	+	-	+
	441-3	+	-	+	+	-	-
	442	+	-	+	-	+	-
	444	+	-	+	+	-	+
	444T	-	+	-	+	+	+
	445	+	-	+	-	+	-
	446	-	-	+	+	+	-
	447	-	-	+	+	-	-
	PF3	+	-	+	-	+	-
	1S25	-	+	-	+	+	-
<i>Bacillus</i>	1S31	-	+	+	+	+	+
	PF1	+	-	+	-	+	-
	PF2	-	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus</i>	1S23	+	-	+	+	-	-
	1S24	+	+	-	-	-	+
	133	+	+	-	-	-	+
	132	+	+	-	-	-	+
	136	+	+	-	-	-	+
	331	+	+	-	-	-	+
	334	+	+	-	-	-	+
	335	+	+	-	-	-	+
	435	+	+	-	-	-	+
<i>Paracoccus</i>	PF4	-	-	-	+	-	-
<i>Kocuria</i>	1S26	-	-	+	+	+	+

- **Género *Halomonas*.**

Las cepas pertenecientes a este género se encuentran distribuidas dentro de las especies *H. almeriensis*, *H. sinaiensis* y *H. halmophila*, aisladas de lagos y salinas<sup>22</sup> las cepas aisladas pertenecientes a las especies *H. almeriensis*, y *H. halmophila*, se caracterizaron por presentar porcentajes de similitud menores o iguales al 98,7%, lo que permite intuir que se trata de especies nuevas,<sup>42</sup> capaces de crecer a altas concentraciones de sal, lo que hace que estas cepas sean un aporte para los estudios de biodiversidad bacteriana en ambientes extremos colombianos, con miras a la búsqueda de metabolitos (Tabla 12).

**Tabla 12.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Halomonas*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Halotolerancia	Especie más cercana	% de identidad
Bacilos Gram-negativos, no esporoformadores, móviles (Anexo 1)	Agua	IV	431	Tolerante	<i>H. sinaiensis</i>	98,8
			433	Extrema	<i>H. almeriensis</i>	98,7
			434	Extrema	<i>H. almeriensis</i>	96,4
			436	Extrema	<i>H. halmophila</i>	96,8

En general las cepas se caracterizan por presentar un perfil de degradación de sustratos diferente entre los aislados, sin embargo, las cepas 434 y 433 presentan similitudes en la degradación de azúcares con *H. almeriensis* (Tabla 13), así mismo, estas cepas comparten semejanzas en el perfil antibiótico (Tabla 11), lo que indica que las cepas 433 y 434 a pesar de tener porcentajes de identidad menores o iguales a 98,7%, guardan similitud metabólica con la cepa más cercana, debido posiblemente a que comparten algunas características genéticas, al contrario de las cepas 431 y 436 las cuales difieren en los perfiles de degradación y susceptibilidad con la cepa más cercana. Lo anterior permite inferir que algunas especies nuevas pertenecientes al género *Halomonas*, guardan similitudes metabólicas con especies que ya han sido reportadas, lo que sería de gran ayuda en la búsqueda de nuevas fuentes de metabolitos de interés industrial sintetizados por bacterias halófilas que han sido previamente reportadas.<sup>12</sup>

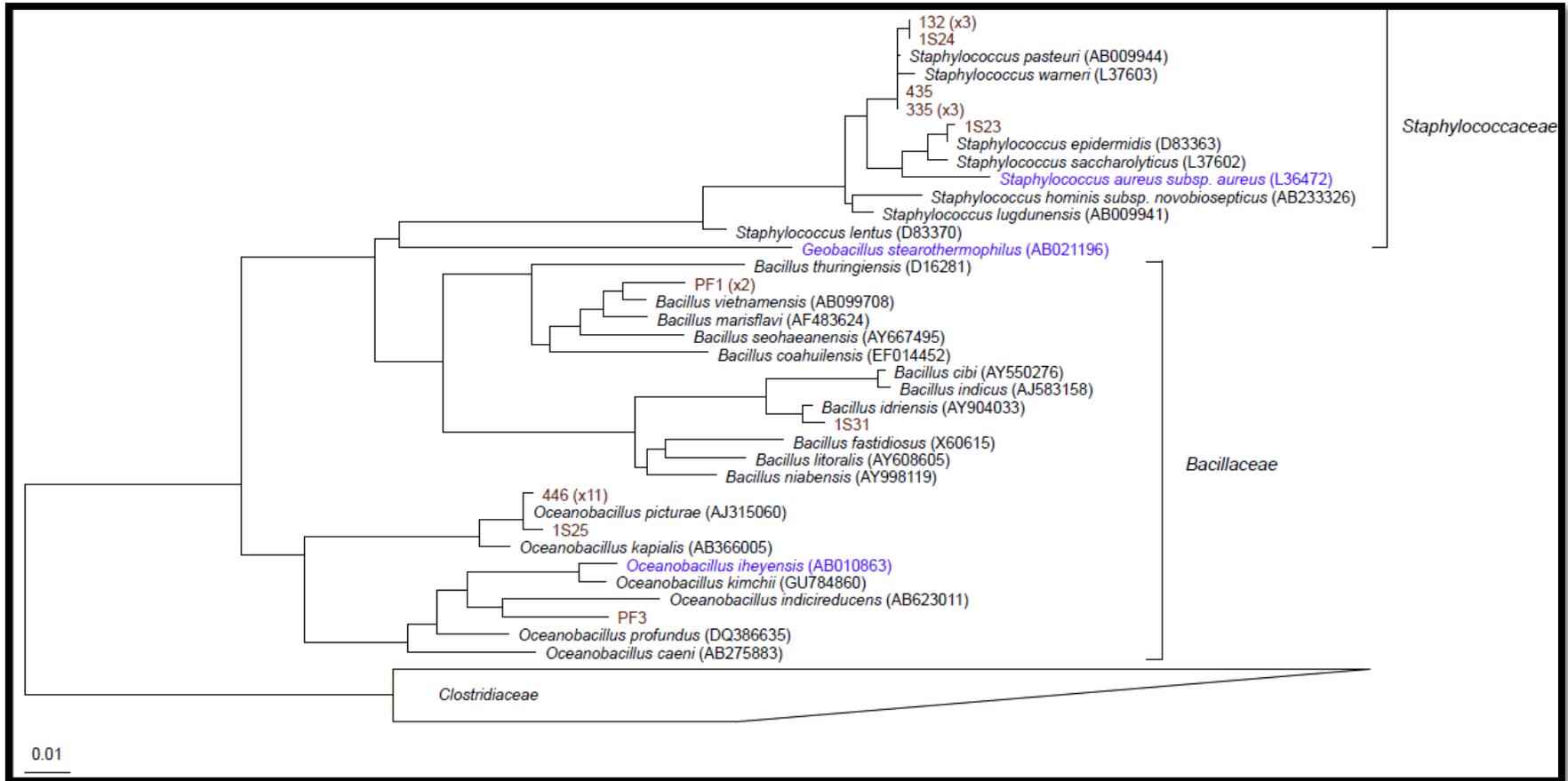
**Tabla 13.** Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Halomonas*.

Prueba Bioquímica	<i>Halomonas</i>						
	431	A	434	433	B	436	C
Oxidasa	+	ND	-	-	-	+	+
Catalasa	+	ND	+	+	ND	+	ND
ONPG	+	ND	+	+	ND	-	ND
ADH	-	+	-	-	ND	-	ND
LDC	-	ND	-	-	-	-	+
ODC	-	ND	-	-	ND	-	ND
CIT	-	ND	+	-	ND	-	ND
H <sub>2</sub> S	+	ND	-	+	ND	+	ND
URE	-	ND	-	-	-	-	-
TDA	-	ND	-	-	ND	-	ND
IND	-	-	-	-	ND	-	ND
VP	-	ND	-	-	ND	-	ND
GEL	+	ND	-	-	-	-	-
GLU	+	ND	+	+	+	-	-
MAN	+	ND	-	-	-	-	+
INO	-	+	-	-	ND	-	ND
SOR	-	ND	-	-	ND	-	ND
RHA	+	ND	-	+	ND	+	ND
SAC	-	ND	-	-	ND	-	ND
MEL	-	+	-	-	ND	-	ND
AMY	-	ND	-	-	ND	-	ND
ARA	-	ND	-	-	-	-	-

\*ONPG: 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida, ADH:L-arginina, LCD: L-lisina, ODC: L-ornitina, CIT: Citrato de sodio, H<sub>2</sub>S: Tiosulfato de sodio, URE: urea, TDA: L-triptofano, IND: L-triptofano (Indol), VP: Voges-Proskauer, GEL: gelatina, GLU: D-glucosa, MAN: D-manitol, INO: Inositol, SOR: D-sorbitol, RHA: L-ramnosa, SAC: D- sacarosa, MEL: D-melibiosa, SAC: D-sacarosa, AMY: Amigdalina, ARA: L-arabinosa.

\*\* A: *H. sinaiensis*, B: *H. almeriensis*, C: *H. halmophila*

\*\*\*ND: datos no disponibles



**Figura 15.** Árbol filogenético generado para las familias *Staphylococcaceae* y *Bacillaceae*.

Para la construcción del árbol filogenético, se utilizó el método de parsimonia usando el algoritmo "Phylip DNA parsimony" como estrategia agrupamiento en el programa ARB. El alineamiento de las secuencias se realizó con la herramienta "SINA" online disponible en la base de datos de ARNr 16S Silva ([www.silva.org](http://www.silva.org)). La familia Clostridiaceae fue usada como grupo externo. Escala= 0.01. \*(xn): número de cepas por clado. \*\*Cepas color café: Aislados de la mina de sal de Zipaquirá – Cepas color azul: cepas de referencia.

➤ Filo *Firmicutes*

**Familia *Bacillaceae***

Según el análisis de la secuenciación del gen 16S ARNr de la familia *Bacillaceae* se aislaron 16 cepas, las cuales 13 pertenecen al género *Oceanobacillus* (32,5%), 3 al género *Bacillus* (7,5%) y 9 al *Staphylococcus* (22,5%) (Figura 15).

• **Género *Oceanobacillus*.**

La mayoría de las cepas pertenecientes a este género presentan porcentajes de identidad mayores a 99% con *O. picturae*, un microorganismo halófilo aislado en el mar Amarillo de Korea, que crece a una concentración entre 5 y 10% de NaCl,<sup>89</sup> por lo que podría tratarse de una cepa de la misma especie. Por el contrario, la cepa PF3 tiene una similitud de 97,3% con la especie *O. profundus*,<sup>90</sup> un aislado de sedimentos marinos en la Cuenca de Ulleung del Mar Oriental, Korea, este porcentaje de identidad menor a 98,7% permite sugerir que muy probablemente esta cepa corresponda a una nueva especie<sup>42</sup> (Tabla 14), adicionalmente, se evidencia que las cepas se agrupan en diferentes clados en el árbol filogenético (Figura 15) de acuerdo a la zona donde fueron recolectados, lo que hace que las zonas de recolección determinen la filogenia de las poblaciones.

**Tabla 14.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Oceanobacillus*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Halotolerancia	Especie más cercana	% de identidad
Bacilos Gram-positivos, esporoformadores, móviles (Anexo 1)	Agua y roca salina	I	1S25	Tolerante	<i>O. picturae</i>	99,8
		III	PF3		<i>O. profundus</i>	97,3
			412			99,9
			413			99,8
			432			99,9
			441			99,8
			441-3			99,9
		IV	442		<i>O. picturae</i>	99,7
			444			99,9
			444T			100,0
			445			99,9
			446			99,9
			447			99,3

<sup>89</sup> Lee, J.; Lim, J.; Lee, J.; Park, Y.; Kim, Ch. **2006.** *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 251-257.

<sup>90</sup> Kim, Y.; Choi, D.; Hyun, S.; Cho, B. **2007.** *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 409-413.

En cuanto a la capacidad de degradar azúcares, se pudo establecer que es diferente entre los aislados y las especies *O. picturae* y *O. profundus* (Tabla 15), sin embargo, se observó que las cepas 413, 432 y 444 poseen un perfil de sensibilidad igual (Tabla 10), las cuales pertenecen la zona IV de recolección, lo que indica que la especie *O. picturae* está conformada por cepas capaces de degradar diferentes azúcares y con un perfil de sensibilidad que difiere entre los aislados. Por lo que es posible intuir que los aislados son diferentes entre sí, a pesar de que el porcentaje de identidad sea mayor a 98,7% con el vecino más cercano; estas diferencias pueden deberse a la activación de rutas metabólicas inducidas por las condiciones presentes en la mina o en el laboratorio. De acuerdo a lo anterior se puede concluir que las zonas de recolección y los fenotipos no son un factor delimitante para la degradación de sustratos y la sensibilidad a antibióticos por parte de estas cepas. Por otro lado la cepa PF3, es un aporte a la biodiversidad de especies que conforman el género *Oceanobacillus*, con miras a la búsqueda de metabolitos.<sup>89</sup>

**Tabla 15.** Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Oceanobacillus*.

Prueba Bioquímico	<i>Oceanobacillus</i> .																
	441	447	432	446	444T	A	PF3	B	441	447	432	446	444T	A	PF3	B	
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	25	-	-	-	-	-	+	-	ND
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	26	-	-	-	-	-	ND	-	ND
1	-	+	-	-	-	-	-	+	27	-	-	-	-	-	ND	-	ND
2	-	-	-	-	-	ND	-	ND	28	-	+	-	-	-	ND	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	ND	29	-	-	-	-	-	ND	-	ND
4	-	+	-	-	-	ND	-	ND	30	-	+	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	ND	-	ND	31	-	-	-	-	-	ND	-	ND
6	-	+	-	-	-	ND	-	ND	32	-	+	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	-	-	ND	-	ND	33	-	-	-	-	-	ND	-	ND
8	-	-	-	-	-	ND	-	ND	34	-	-	-	-	-	ND	-	ND
9	-	-	-	-	-	ND	-	ND	35	-	-	-	-	-	ND	-	ND
10	-	-	-	-	-	-	-	+	36	-	+	-	-	-	ND	-	ND
11	-	+	-	-	-	-	-	+	37	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	-	-	-	+	-	+	38	-	-	-	-	-	ND	-	ND
13	-	+	-	-	-	-	-	+	39	-	-	-	-	-	ND	-	ND
14	-	-	-	-	-	ND	-	ND	40	-	-	-	-	-	ND	-	ND
15	-	-	-	-	-	-	-	ND	41	-	-	-	-	-	ND	-	ND
16	-	-	-	-	-	ND	-	ND	42	-	-	-	-	-	ND	-	ND
17	-	-	-	-	-	-	-	ND	43	-	-	-	-	-	-	-	ND
18	-	-	-	-	-	-	-	+	44	-	-	-	-	-	ND	-	ND
19	-	-	-	-	-	ND	-	ND	45	-	-	-	-	-	ND	-	ND
20	-	-	-	-	-	ND	-	ND	46	-	-	-	-	-	ND	-	ND
21	-	-	-	-	-	ND	-	ND	47	-	-	-	-	-	ND	-	ND
22	-	-	-	-	-	ND	-	+	48	-	-	-	-	-	ND	-	ND
23	-	-	-	-	-	+	-	+	49	-	-	-	-	-	-	-	ND
24	-	-	-	-	-	ND	-	ND									

\*1:Glicerol, 2:Eritritol, 3:D-arabinosa, 4:L-arabinosa, 5:D-ribosa, 6:D-xilosa, 7:L-xilosa, 8:D-adonitol, 9:Metil-βD-xilopiranosida, 10:D-galactosa, 11: D-glucosa, 12: D-fructosa, 13: D-mamnosa, 14: L-sorbosa, 15: L-rhamnosa, 16: Dulcitol, 17:Inositol,18:D-manitol,19:D-sorbitol,20:Metil-αD-manopiranosida,21:Metil-αD-glucopiranosida,22:N-etilglucosamina, 23: Amigdalina, 24: Arbutina,25: Esculina-citratoferrico,26: Salicina, 27:D-celobiosa, 28: D-maltosa, 29: D-lactosa,30: D-melibiosia,31: D-sacarosa,32: D-trehalosa,33: Inulina, 34: D-melezitosa,35: D-rafinosa,36: Almidón, 37: Glicógeno, 38: Xilitol, 39: Gentinobiosa,40: D-turanosa,41:D-lixosa, 42:D-tagatosa, 43:D-fucosa, 44:L-fucosa, 45: D-arabitol, 46:L-arabitol, 47:Gluconato potásico, 48:2-cetogluconato potásico, 49:5-cetogluconato potásico.

\*\* A: *O. Picturae*, B: *O. profundus*

\*\*\* ND: Datos no disponibles

- **Género *Bacillus*.**

Las cepas pertenecientes al género *Bacillus*, presentaron porcentajes de identidad mayores a 98% con *B. vietnamensis* y *B. idriensis* (Tabla 16). Sin embargo, la cepa PF1, tiene un porcentaje de identidad de 98,7% con la especie *B. vietnamensis*, un bacilo aislado por primera vez en el Golfo de

México a partir de muestras de pescado,<sup>91</sup> este porcentaje de similitud con la especie más cercana cataloga a la cepa PF1 como una nueva especie.<sup>11</sup> Sin embargo, PF2 ocupa la misma posición que PF1 en el árbol filogenético en donde se encuentran agrupadas en un solo clado, posiblemente porque guardan algunas similitudes genéticas a pesar de ser especies diferentes.

La especie *B. idriensis* a la que pertenece la cepa 1S31, no ha sido reportada como un microorganismo halófilo, ya que ha sido aislada principalmente de muestras humanas, considerada una cepa patógena capaz de producir sepsis.<sup>92</sup> Sin embargo, fue posible cultivarla en el medio TSA + NaCl a una concentración de 3% de NaCl (p/v).

**Tabla 16.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Bacillus*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Halotolerancia	Especie cercana	más % de identidad
Bacilos Gram-positivos, esporulados, móviles aerobios (Anexo 1).	Sedimento, agua y roca	I	1S31	Tolerante	<i>B. idriensis</i>	99,4
			PF1	Tolerante	<i>B. vietnamensis</i>	98,7
		II	PF2	Tolerante	<i>B. vietnamensis</i>	99,1

Los perfiles de antibióticos y degradación de azúcares difieren entre todas las cepas evaluadas y las especies más cercanas, como se observa en las Tablas 17 y 11, en donde es posible evidenciar que este género no tiene perfiles homogéneos, a pesar de que presentan morfologías similares,<sup>92</sup> lo anterior se debe posiblemente a que las cepas tienen diferencias metabólicas de acuerdo a las condiciones de las zonas de recolección, o del laboratorio que permitieron la activación de genes involucrados en la degradación de ciertos azúcares y la sensibilidad a antibióticos, que puede ser traducida en una ventaja competitiva entre géneros. Las diferencias con el vecino más cercano pueden ser producto de la zona de aislamiento.

<sup>91</sup> Noguchi, H.; Uchino, M.; Shida, O.; Takano, K.; Nakamura, K.; Komagata, K. **2004.** *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce, 54, 117-120.

<sup>92</sup> Soo, K.; Sup, W.; Lee, M.; Ho, J.; Lee, H.; Ran, K.; Yong, N.; Song, J. **2006.** *Bacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2541–2544

**Tabla 17.** Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Bacillus*.

Prueba Bioquímica	<i>Bacillus</i>										
	1S31	A	PF1	PF2	B	1S31	A	PF1	PF2	B	
<b>Oxidasa</b>	-	+	-	-	+	<b>25</b>	-	ND	-	-	ND
<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	+	<b>26</b>	-	+	-	-	-
<b>1</b>	+	-	+	+	ND	<b>27</b>	-	ND	-	-	ND
<b>2</b>	-	ND	-	-	ND	<b>28</b>	+	ND	-	-	ND
<b>3</b>	-	ND	-	-	-	<b>29</b>	-	ND	-	-	-
<b>4</b>	-	ND	-	-	ND	<b>30</b>	+	ND	-	-	-
<b>5</b>	-	ND	+	-	+	<b>31</b>	+	ND	-	-	ND
<b>6</b>	+	ND	-	-	ND	<b>32</b>	+	+	-	-	ND
<b>7</b>	-	ND	-	-	ND	<b>33</b>	-	+	-	-	ND
<b>8</b>	-	ND	-	-	ND	<b>34</b>	-	ND	-	+	ND
<b>9</b>	-	ND	+	+	ND	<b>35</b>	+	ND	-	-	ND
<b>10</b>	+	ND	-	-	-	<b>36</b>	+	ND	-	-	+
<b>11</b>	+	ND	-	-	+	<b>37</b>	-	+	-	-	+
<b>12</b>	+	ND	+	+	+	<b>38</b>	-	ND	-	-	-
<b>13</b>	-	ND	-	-	-	<b>39</b>	+	ND	-	-	ND
<b>14</b>	-	ND	-	-	ND	<b>40</b>	-	ND	-	-	ND
<b>15</b>	-	ND	+	-	-	<b>41</b>	-	ND	+	+	ND
<b>16</b>	-	ND	-	-	ND	<b>42</b>	-	ND	-	-	-
<b>17</b>	-	ND	-	-	ND	<b>43</b>	-	ND	-	-	-
<b>18</b>	+	+	-	-	+	<b>44</b>	-	ND	-	-	ND
<b>19</b>	-	ND	-	-	ND	<b>45</b>	-	ND	+	+	-
<b>20</b>	-	ND	-	-	ND	<b>46</b>	-	ND	-	-	ND
<b>21</b>	+	ND	-	-	ND	<b>47</b>	+	ND	-	-	ND
<b>22</b>	+	ND	+	-	+	<b>48</b>	-	ND	-	-	-
<b>23</b>	+	ND	-	-	ND	<b>49</b>	-	ND	-	-	-
<b>24</b>	-	ND	-	-	ND	-	-	-	-	-	-

\*1:Glicerol, 2:Eritritol, 3:D-arabinosa, 4:L-arabinosa, 5:D-ribosa, 6:D-xilosa, 7:L-xilosa, 8:D-adonitol, 9:Metil-βD-xilopiranosida, 10:D-galactosa, 11: D-glucosa, 12: D-fructosa, 13: D-mamnosa, 14: L-sorbosa, 15: L-rhamnosa, 16: Dulcitol, 17:Inositol, 18:D-manitol, 19:D-sorbitol, 20:Metil-αD-manopiranosida, 21:Metil-αD-glucopiranosida, 22:N-acetilglucosamina, 23: Amigdalina, 24: Arbutina, 25: Esculina-citratoferrico, 26: Salicina, 27: D-celobiosa, 28: D-maltosa, 29: D-lactosa, 30: D-melibiosa, 31: D-sacarosa, 32: D-trehalosa, 33: Inulina, 34: D-melezitosa, 35: D-rafinosa, 36: Almidón, 37: Glicógeno, 38: Xilitol, 39: Gentinobiosa, 40: D-turanosa, 41:D-lixosa, 42:D-tagatosa, 43:D-fucosa, 44:L-fucosa, 45: D-arabitol, 46:L-arabitol, 47:Gluconato potásico, 48:2-cetogluconato potásico, 49:5-cetogluconato potásico.

\*\*A: *B. idriensis*, B: *B. vietnamiensis*

\*\*\* ND: Datos no disponibles

### Familia *Staphylococcaceae*

- **Género *Staphylococcus* sp.**

Dentro del género *Staphylococcus*, se aislaron 9 cepas, las cuales presentaron porcentajes de identidad mayores a 99% con *S. epidermidis* y *S. pasteurii* (Tabla 18) cepas que fueron reportadas por primera vez a partir de muestras clínicas provenientes de humanos. Este porcentaje de identidad mayor a 98,7% con los vecinos más cercanos permitió afirmar que las cepas pertenecen a estas especies.<sup>11</sup>

**Tabla 18.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Staphylococcus*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Halotolerancia	Especie más cercana	% de identidad
Cocos Gram positivos (Anexo 1)	Agua, sedimento	I	1S23	Débil	<i>S. epidermidis</i>	99,8
			1S24	Tolerante		
			133			
			132	Débil		
		III	136		<i>S. pasteurii</i>	99,8
			331			
			334	Tolerante		
			335			
		IV	435			

En relación con la degradación de sustratos y el perfil de sensibilidad a antibióticos, las cepas presentaron similitudes en cuanto a degradación de sustratos y al perfil de sensibilidad, excepto por la cepa 1S23 que pertenece a la especie *S. epidermidis* (Tabla 19 y 11). Lo cual permite intuir que las cepas aisladas pertenecientes a este género son miembros de las especies más cercanas. De acuerdo a lo anterior y a los reportes enfocados en el aislamiento de estas especies, es posible establecer que las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, pueden ser una contaminación cruzada en el momento de la siembra o por el tráfico de personas en la mina, ya que por lo general, estas bacterias se aíslan de muestras humanas y no de ecosistemas hipersalinos.

Tabla 19. Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*.

Prueba Bioquímica	<i>Staphylococcus</i>										
	1S23	A	1S24	133	132	136	331	334	335	435	B
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
MNE	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TRE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MAN	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
NIT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
VP	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
XYL	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
SAC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
MDG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
ADH	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
URE	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND

\*Glu:D-glucosa, FRU:D-fructosa, MNE:D-manosa, MAL:D-maltosa, LAC:D-lactosa, TRE:D-trehalosa, MAN:D-manitol, XLT:xilitol, MEL:D-melibiosa, NIT:nitrato de potasio, PAL:β-nafti-fosfato, VP:piruvato de sodio, RAF: D-rafinosa, XYL: D-xilosa, SAC:D-sacarosa, MDG:Metil-αD-glucopiranosidasa, NAG:N-acetil-glucosamina, ADH:L-arginina, URE:urea.

\*\* A: *S. epidermidis*, B: *S. pasteurii*.

\*\*\* ND: Datos no disponibles

➤ **Filo  $\alpha$ - Proteobacteria**

**Familia Rhodobacteriaceae**

Dentro de la familia *Rhodobacteriaceae*, se aisló una cepa halófila perteneciente al género *Paracoccus* (2,5%), aislada de la zona IV.

• **Género *Paracoccus*.**

El género *Paracoccus* fue aislado de una muestra de agua, la cual presentó un porcentaje de identidad con *Paracoccus marcusii* de 99,4% (Tabla 20), el cual es un microorganismo que fue aislado por primera vez en 1998 como contaminante en una placa de agar, caracterizándose por ser halotolerante.<sup>93</sup>

**Tabla 20.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Paracoccus*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Haloterancia	Especie más cercana	% de identidad
Cocos Gram-negativos, no móviles (Anexo 1)	Agua	IV	PF4	Halotolerante	<i>P. Marcusii</i>	99,4

Los perfiles de antibióticos y de azúcares son iguales a los reportados para *P. marcusii* (Tablas 21 y 11), por lo que se puede afirmar que se trata de esta especie, la cual en estudios recientes fue aislada de sedimentos marinos del ártico y es de gran interés a nivel industrial ya que presenta un pigmento naranja en las colonias debido a la presencia de carotenoides, que serían útiles en la industria alimenticia como colorantes en alimentos con altas concentraciones de sal.

<sup>93</sup> Harker, M.; Hirschberg, J.; Oren, A. **1998.** *Paracoccus rmarcusii* sp. nov., an orange Gram-negative coccus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 543-548.

**Tabla 21.** Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Paracoccus*.

Prueba Bioquímica	<i>Paracoccus</i>			
	PF4	A	VP	ND
Oxidasa	+	+	VP	-
Catalasa	+	+	GEL	-
ONPG	+	ND	GLU	+
ADH	-	-	MAN	+
LDC	-	-	INO	+
ODC	-	-	SOR	-
CIT	-	ND	RHA	-
H <sub>2</sub> S	-	ND	SAC	+
URE	-	ND	MEL	+
TDA	-	-	AMY	-
IND	-	-	ARA	+

\*ONPG: 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida, ADH:L-arginina, LCD: L-lisina, ODC: L-ornitina, CIT: Citrato de sodio, H<sub>2</sub>S: Tiosulfato de sodio, URE: urea, TDA: L-triptofano, IND: L-triptofano (Indol), VP: Voges-Proskauer, GEL: gelatina, GLU: D-glucosa, MAN: D-manitol, INO: Inositol, SOR: D-sorbitol, RHA: L-ramnosa, SAC: D- sacarosa, MEL: D-melibiosa, SAC: D-sacarosa, AMY: Amigdalina, ARA: L-arabinosa.

\*\* A: *P. marcusii*

\*\*\*ND: datos no disponibles

➤ **Filo Actinomycetales**

**Familia Micrococcaceae**

Dentro de la familia *Micrococcaceae* se aisló una cepa halófila perteneciente al género *Kocuria* (2,5%).

- **Género *Kocuria*.**

El género *Kocuria*, fue aislado de la zona I de una muestra de sedimento. El porcentaje de identidad con *K. rosea* fue de 99,7% (Tabla 22), la cual es frecuentemente aislada de muestras humanas y de suelo.<sup>94</sup>

**Tabla 22.** Generalidades de las cepas aisladas pertenecientes al género *Kocuria*.

Morfología	Tipo de muestra	Zona	Cepa	Halotolerancia	Especie más cercana	% de identidad
Bacilos Gram-positivos, no esporulados, no móviles (Anexo 1)	Sedimento	I	1S26	Halotolerante	<i>K. rosea</i>	99,7

Por otra parte, los perfiles de antibióticos y de azúcares son muy similares a los reportados para *K. rosea* (Tablas 23 y 11). Según reportes en la literatura esta especie es capaz de producir biosurfactantes halotolerantes y un exopolisacárido con actividad inmunosupresora (kocuran) además de un pigmento rosado en la colonias, lo que la convierte en una cepa bacteriana con un gran potencial para diferentes industrias que requieran metabolitos con actividad a diferentes concentraciones de sal.

<sup>94</sup> Parshetti, G.; Kalme, S.; Saratale, G. **2006.** Biodegradation of Malachite Green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chim. Slov*, 53, 492–498

**Tabla 23.** Perfil de degradación de sustratos por las cepas pertenecientes al género *Kocuria*.

Prueba Bioquímica	<i>Kocuria</i>					
	1S26	A	16	1S26	33	A
Oxidasa	-	-	16	-	33	ND
Catalasa	+	+	17	-	34	ND
1	-	ND	18	+	35	ND
2	-	ND	19	+	36	ND
3	-	+	20	-	37	ND
4	+	ND	21	-	38	ND
5	-	ND	22	-	39	ND
6	-	ND	23	-	40	ND
7	-	ND	24	+	41	ND
8	-	ND	25	-	42	ND
9	-	ND	26	+	43	ND
10	-	ND	27	+	44	ND
11	+	ND	28	-	45	ND
12	+	ND	29	+	46	ND
13	-	ND	30	-	47	ND
14	-	ND	31	+	48	ND
15	+	ND	32	-	49	ND

\*1:Glicerol, 2:Eritritol, 3:D-arabinosa, 4:L-arabinosa, 5:D-ribosa, 6:D-xilosa, 7:L-xilosa, 8:D-adonitol, 9:Metil-βD-xilopiranosida, 10:D-galactosa, 11: D-glucosa, 12: D-fructosa, 13: D-mamnosa, 14: L-sorbosa, 15: L-rhamnosa, 16: Dulcitol, 17:Inositol,18:D-manitol,19:D-sorbitol,20:Metil-αD-manopiranosida,21:Metil-αD-glucopiranosida,22:N-acetilglucosamina, 23: Amigdalina, 24: Arbutina, 25: Esculina-citratoferrico, 26: Salicina, 27: D-celobiosa, 28: D-maltosa, 29: D-lactosa, 30: D-melibiosa, 31: D-sacarosa, 32: D-trehalosa, 33: Inulina, 34: D-melezitosa, 35: D-rafinosa, 36: Almidón, 37: Glicógeno, 38: Xilitol, 39: Gentinobiosa, 40: D-turanosa, 41:D-lixosa, 42:D-tagatosa, 43:D-fucosa, 44:L-fucosa, 45: D-arabitol, 46:L-arabitol, 47:Gluconato potásico, 48:2-cetogluconato potásico, 49:5-cetogluconato potásico.

\*\*A: *K. rosea*

\*\*\* ND: Datos no disponibles

#### 4.4.2 Diversidad de las bacterias halófilas por zonas de aislamiento

La salinidad de cada zona influyó notoriamente en los tipos de bacterias halófilas aisladas, encontrando que la mayoría de las halófilas extremas se agruparon en la zona IV, esto puede ser debido a que esta zona presenta un alto contenido de NaCl, por el contrario, las bacterias débiles y halotolerantes se aislaron de las zonas I y III, lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en el lago salado El-Djerid Salt Lake (Tunisia), donde los géneros de bacterias halófilas aisladas se distribuyeron de acuerdo a las concentraciones de sal presentes en la zonas de recolección, siendo posible aislar 5 géneros de bacterias halófilas, de las cuales *Halomonas* sp., fue aislada en todas las zonas de recolección.<sup>62</sup>

De las 41 cepas aisladas, 13 son candidatas a nuevas especies pertenecientes a los géneros *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus*, y *Halomonas*, ya que presentan porcentajes de similitud menores a 98,7% con el vecino más cercano y diferentes perfiles de degradación de sustratos y sensibilidad a antibióticos con la cepa más cercana, comparado con lo reportado en la literatura, en donde fue posible aislar nuevas cepas diferentes entre sí y con la cepa más cercana, aisladas de algunas minas de China, encontrando que los perfiles de degradación de sustratos y sensibilidad son pruebas que confirman la presencia de una nueva especie. Dentro de este grupo 6 cepas se caracterizaron por ser halófilas extremas (25%NaCl), aisladas principalmente de la zona IV, ya que ésta presenta mayor cantidad de sal que las otras zonas. Lo anterior, es consistente con los estudios reportados en algunas minas de sal de China en donde se encontró una nueva especie perteneciente al género *Halomonas*, denominada *Halomonas qiaohouensis*, la cual se caracteriza por ser una halófila moderada,<sup>69</sup> así mismo se aisló de la mina de sal de la provincia de Xinjiang, en China, *Aquibacillus salifodinae*, una nueva especie de halófila moderada,<sup>67</sup> lo anterior indica que las minas de sal son ecosistemas que albergan nuevas especies de bacterias halófilas que pueden llegar a presentar actividades biológicas de gran uso en diferentes industrias.

Las cepas pertenecientes a los demás géneros presentaron diferencias entre sí y con el vecino más cercano en cuanto a perfil de azúcares y sensibilidad a antibióticos, lo anterior puede ser producto de la adaptación de las bacterias al medio, lo que puede generar perfiles diversos de degradación y sensibilidad. Lo anterior, ha sido evidenciado en estudios realizados en las piscinas de las salinas ECUASAL localizadas en Santa Elena –Ecuador, en donde se llevaron a cabo pruebas de degradación de sustratos encontrando diferencias entre los aislados bacterianos.<sup>511</sup> Esto puede deberse a la activación de rutas metabólicas debido a la condiciones proporcionadas en el laboratorio o en el sitio de recolección, por lo que, es posible concluir que las cepas han creado estrategias de adaptación no solamente para soportar altas concentraciones de sal sino para degradar ciertos azúcares y resistir antibióticos.

Por consiguiente, es posible inferir que la mina de sal es un ecosistema con una diversidad de géneros de bacterias halófilas, entre las que se encuentran especies nuevas capaces de resistir altas concentraciones de sal, lo cual es un gran aporte para los estudios taxonómicos de bacterias halófilas en ambientes extremos.

## **4.5 Actividad biológica de las cepas aisladas y los extractos**

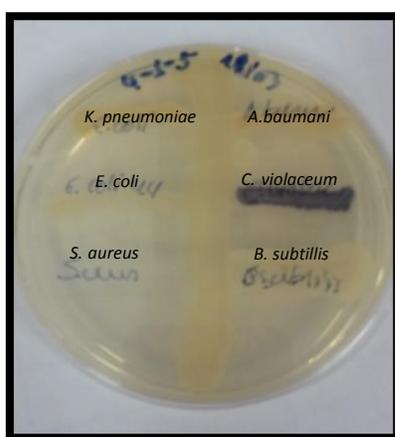
### **4.5.1 Actividad antibiótica de las cepas**

- **Pruebas de T- streak y Kirby Bauer**

La producción de antibióticos y la inhibición de *quorum sensing* por parte de bacterias halófilas no ha sido muy estudiada, sin embargo, se ha reportado que algunos actinomicetos halófilos son capaces de producir moléculas antibióticas<sup>65</sup> y que bacterias halófilas del género *Halomonas*,

sintetizan moléculas que inhiben la señalización de los sistemas de *quorum sensing* tales como las N-acil-homoserin-lactonasas.<sup>95</sup>

El enfrentamiento directo de bacterias halófilas con cepas patógenas no ha sido muy estudiado, ya que los microorganismos cuyo crecimiento se pretende inhibir no son comunes en hábitats salinos, lo cual hace que las bacterias halófilas no tengan mecanismos de defensa contra estos microorganismos al estar presentes en un mismo medio. Debido a lo anterior, en las pruebas de *T-streak* y *Kirby Bauer* no fue posible evidenciar inhibición del crecimiento de las bacterias evaluadas probablemente porque no se activaron los genes involucrados en estas actividades (Figura 16), por lo que se evaluaron extractos provenientes de cultivos en medios líquido, los cuales se describen más adelante en el numeral 3.5.3.



**Figura 16.** Prueba *T-streak* en agar TSA + NaCl de la cepa 415 contra las cepas patógenas evaluadas y *C. violaceum* ATCC 31592.

#### 4.5.2 Detección de la producción de enzimas hidrolíticas

Existen diversos estudios enfocados en la capacidad que tienen las bacterias halófilas de producir enzimas hidrolíticas haloestables, como es el caso *Halobacillus* sp., el cual es capaz de producir  $\alpha$ -amilasas en un medio con 5% de NaCl (p/v), pH de 7,8, 30°C y 200 rpm,<sup>96</sup> por otro lado, estudios realizados con la bacteria halófila *Nesterenkonia* sp., permitieron establecer que la mayor síntesis de amilasas se da a una concentración de NaCl de 7,5 % (p/v), a un pH de 7,0, 33°C y en medio

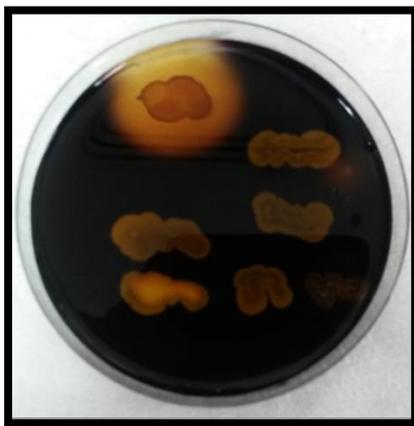
<sup>95</sup> Sarilmiser, H.; Ates, O.; Ozdemir, G.; Arga, K.; Oner, E. **2015**. Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (4), 455-463.

<sup>96</sup> Amoozegar, M.; Malekzadeha, F.; Malik, F. **2003**. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2 *Journal of Microbiological Methods*, 52, 353 – 359.

sólido,<sup>97</sup> lo anterior permite inferir que la producción de haloenzimas se da bajo condiciones óptimas dependiendo de la cepa.

Lo anterior es consistente con los resultados observados para la cepa 1S31, perteneciente a *Bacillus idriensis*, la cual demostró ser capaz de producir amilasas evidenciado en una zona de hidrólisis sobre agar almidón (Figura 17). Por lo anterior, es posible concluir que esta enzima tiene actividad amilolítica a una concentración de NaCl de 3% (p/v), lo que la hace un metabolito de gran interés en la industria alimentaria.

Sin embargo, es posible que las cepas halófilas que no presentaron actividad, requieran de una serie de condiciones diferentes a las proporcionadas que permiten la activación de los genes productores de enzimas hidrolíticas.



**Figura 17.** Halo de hidrólisis de la cepa 1S31 en agar TSA + NaCl suplementado con almidón y revelado con lugol.

Debido a que las pruebas de *T-streak* y *Kirby Bauer*, no dieron los resultados esperados que permitieran desarrollar los objetivos propuestos, se optó por el uso de extractos provenientes de cultivos bacterianos en medio líquido, basándose en estudios realizados con extractos de bacterias halófilas pertenecientes a los géneros *Oceanobacillus*<sup>864</sup> y *Ochrobactrum*<sup>66</sup>, los cuales presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* además de ser compuestos con propiedades biosurfactantes, por tal razón las pruebas antibióticas y de inhibición de los sistemas de *quorum sensing*, se realizaron con los extractos de los medios de cultivo líquidos (TSA + NaCl) provenientes de los 41 aislados, como se muestra a continuación:

---

<sup>97</sup> Shafiei, M.; Ziaee, A.; Amoozegar, M. **2010** Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic  $\alpha$ -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F. *Process Biochemistry*, 45, 694–699.

### 4.5.3 Obtención de extractos de las bacterias halófilas

#### Métodos para la determinación de biosurfactantes en las muestras provenientes de las bacterias halófilas aisladas

Los extractos del medio adicionado con glucosas provenientes de los géneros *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus* y *Halomonas*, se caracterizaron por presentar producción de biosurfactantes, actividad antibiótica e inhibidora de *quorum sensing*, a diferencia de los medios con sacarosa lo anterior ha sido reportado en estudios con bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* donde la glucosa se considera una de las fuentes de carbono que favorece para la producción de exopolisacáridos los cuales tienen propiedades similares a las observadas en la matriz gelatinosa, encontrando los siguientes resultados para cada género:

El género *Chromohalobacter*, se caracteriza según reportes en la literatura por la capacidad de sintetizar enzimas en especial xilanasas, amilasas y deshidrogenasas,<sup>98,99</sup> en consecuencia, 7 cepas pertenecientes a este género y aisladas de la mina de sal de Zipaquirá fueron capaces de sintetizar una matriz gelatinosa, de las cuales las cepas 1S33 y 1S32 disminuyeron la tensión superficial del caldo y presentaron una mayor capacidad biosurfactante que el tween, un reconocido agente biosurfactante (Tabla 24). Lo anterior, permite establecer que los biosurfactantes con propiedades halotolerantes tienen una potencial aplicación y son de gran interés para diferentes industrias como la de alimentos y de petróleo. Adicionalmente, los extractos pertenecientes a las cepas 1S32 y 416 inhibieron el crecimiento de *K. pneumoniae* y *E. coli*, la cual fue evidenciado debido a la disminución del crecimiento bacteriano alrededor de los pozos (Tabla 25).

---

<sup>98</sup> Prakash, B.; Vidyasagar, M.; Jayalakshmi, S.; Sreeramulu, K. **2012**. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4 (3), 192-198

<sup>99</sup> Wagschal, K.; Jordan, D.; Lee, C.; Younger, A.; Braker, J.; Chan, V. **2015**. Biochemical characterization of uronate dehydrogenases from three *Pseudomonas* spp., *Chromohalobacter alixigens*, and *Polaromonas naphthalenivorans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 69, 62-68

**Tabla 24.** Pruebas cualitativas y presencia de matriz gelatinosa generada por el biosurfactante de las bacterias halófilas.

Especie	Cepa	Tensión superficial (mN/m)	Distorsión en microplacas	Matriz gelatinosa
<i>C. canadensis</i>	1S32	46,5	x	x
	1S33	22,2	x	x
	3S31	48,6	x	x
	3S32	20,5	x	x
	416	46,8	x	x
	415	43,0	x	x
	439	46,8	x	x
<i>O. picturae</i>	413	55,0	x	x
	412	47,8	x	x
	432	49,4	x	x
	441	41,8	x	x
	441-3	47,9	x	x
	442	18,6	x	x
	444	49,2	x	x
	444T	42,0	x	x
	445	47,6	x	x
446	48,0	x	x	
447	47,5	x	x	
<i>O. profundus</i>	PF3	49,8	x	x
<i>H. almeriensis</i>	433	42,7	x	x
	434	42,8	x	x
<i>H. halmophila</i>	436	42,0	x	x
Medio	Medio 10%	47,3		
	Medio 15%	47,5		
	Tween 20	30,0		
	Agua	72,0		

--. Tensión superficial de las cepas productoras de biosurfactantes

X Prueba positiva

**Tabla 25.** Actividad biológica de las cepas aisladas contra cepas patógenas ATCC e inhibición de *quorum sensing*

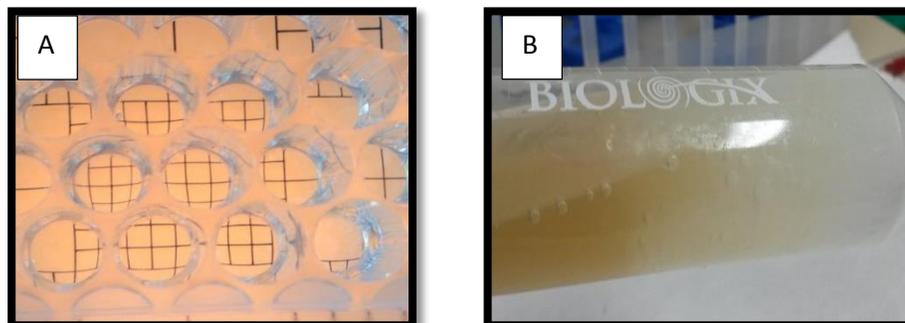
Especie	Cepa	Inhibición patógenos ATCC		Inhibición <i>quorum sensing</i>
		<i>K.pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. violaceum</i>
<i>C. canadensis</i>	1S32		X	
	416	X	X	
<i>O. picturae</i>	413	X	X	
	432	X	X	
	444			X
	444T	X		
<i>H. almeriensis</i>	433	X	X	
	434		X	X
<i>H. halmophila</i>	436	X		

X: Prueba positiva

Para el género *Halomonas* las cepas 433, 434 y 436 sintetizaron una matriz gelatinosa (Tabla 24) la cual presentó una actividad antibiótica capaz de inhibir el crecimiento de *K. pneumoniae* y *E. coli*, adicionalmente, la cepa 434 fue capaz de inhibir la señalización de los sistemas de *quorum sensing* generados por *C. violaceum* (Tabla 25). Estas dos actividades no han sido ampliamente reportadas para este género en las bases de datos *Science Direct* y *Scopus*, por lo que es posible que alguna de las condiciones ambientales de la mina o del laboratorio, permitieron la producción de la matriz, la cual dependiendo de las moléculas que la conforman tienen propiedades antibióticas o inhibidoras de *quorum sensing*, que serían una nueva alternativa para el uso de compuestos provenientes de bacterias halófilas útil en medicina o recuperación de superficies impactadas con *Bioflim*.<sup>57</sup>

Para el género *Oceanobacillus*, el extracto de la cepa 442 se caracterizó por disminuir la tensión superficial, esta actividad ha sido ampliamente estudiada en este género, en especial en cepas provenientes del mar Antártico en donde fue posible encontrar compuestos con actividad biosurfactantes, las cuales fueron estables a altas temperaturas y pHs alcalino.<sup>8</sup> De las bacterias aisladas 12 cepas sintetizaron la matriz gelatinosa, como se muestra en la Tabla 25 (Figura 18), siendo la cepa 444T la que produjo mayor cantidad de la matriz en comparación con las demás cepas evaluadas en todo el ensayo. Lo anterior permite inferir que las cepas pertenecientes al género *Oceanobacillus*, aisladas de la mina de sal de Zipaquirá guardan similitudes con cepas aisladas en otros ambientes como el mar Antártico, en cuanto a la capacidad de producir biosurfactantes, convirtiéndose en una nueva fuente de compuestos biosurfactantes sintetizados por bacterias pertenecientes al género *Oceanobacillus*, que sería de gran ayuda para diferentes industrias. Por otra parte, la matriz gelatinosa sintetizada en mayor cantidad por cepas pertenecientes a este género, puede ser utilizada en diferentes industrias como la farmacéutica en

los procesos de fabricación de medicamentos que requieren estar expuestos a altas concentraciones de sal.



**Figura 18. A.** Distorsión de la cuadrícula, generada por el sobrenadante proveniente de la cepa 444T mediante el método de microplatos. **B.** Matriz gelatinosa sintetizada por la cepa 444.

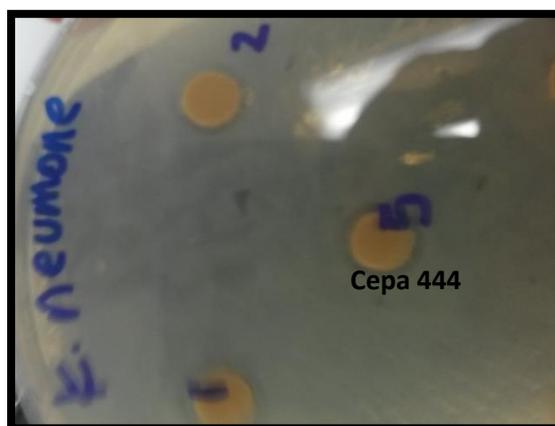
Las cepas aisladas pertenecientes al género *Oceanobacillus*, no tienen un mayor potencial bioactivo en cuanto a producción de antibióticos e inhibición de la comunicación celular vía AHL. Sin embargo, los extractos de las cepas 413, 432 y 444T inhibieron el crecimiento de *K. pneumoniae* y *E. coli*, como se muestra en la Tabla 25 y en la Figura 19. Del mismo modo, estudios realizados con la cepa *Oceanobacillus* sp. BRI 10 en 2013, demostraron que el biosurfactante producido por esta cepa es capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*.<sup>8</sup>

En cuanto a la inhibición de *quorum sensing*, por parte del género *Oceanobacillus*, el extracto de la cepa 444, fue capaz de inhibir los sistemas de señalización de *quorum sensing* en *C. violaceum*, según investigaciones realizadas con cepas marinas de *Oceanobacillus* sp., se determinó que este género es capaz de sintetizar N-acil homoserin lactonasas,<sup>100</sup> moléculas que interfieren en las señales de *quorum sensing*<sup>101</sup> generadas entre bacterias de la especie *C. violaceum*, así mismo, la capacidad de inhibir estos sistemas mediante otro tipo de señalización mediada por péptidos ha sido reportada para la especie *O. iheyensis*, la cual produjo un exopolisacárido que inhibió la señalización en la cepa patógena *S. aureus*.<sup>100</sup>

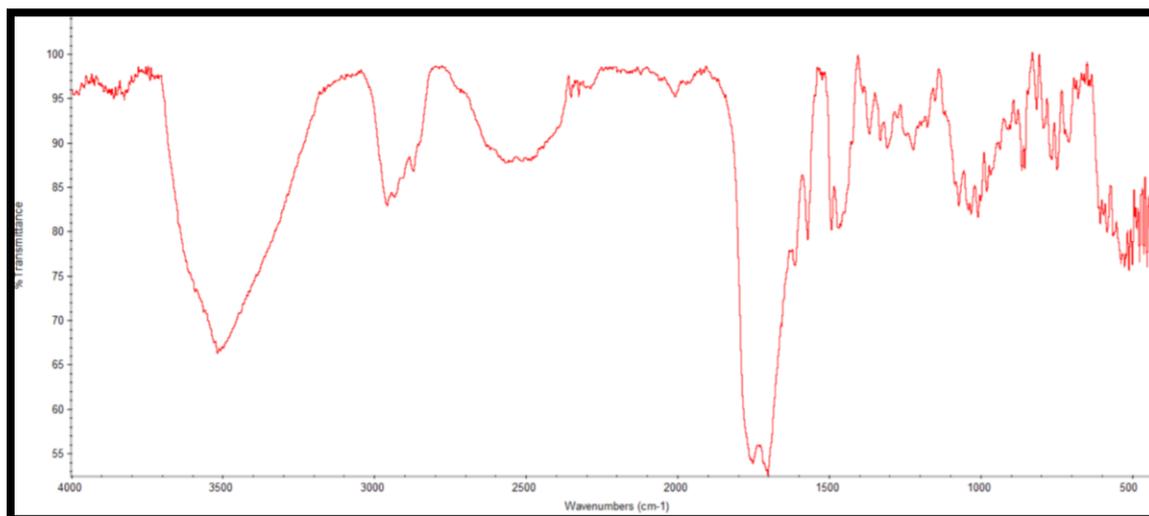
De acuerdo a lo anterior el género *Oceanobacillus*, es el que presenta todas las actividades evaluadas, por lo que las cepas que lo conforman serían un aporte importante para diferentes industrias ya que son compuestos que resisten concentraciones de sal con actividades biosurfactantes, antibióticas e inhibidoras de *quorum sensing*, siendo un género con una diversidad de cepas con un amplio potencial bioactivo.

<sup>100</sup> Kavita, K.; Singh, V.; Mishra, A.; Jha, B. **2014.** Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. *Carbohydrate Polymers*, 101, 29–35

<sup>101</sup> Kalia, V. **2013.** Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31, 224–245.



**Figura 19.** Halo de Inhibición generado por el extracto de la cepa 444 frente a *K. pneumoniae*



**Figura 20.** Perfil de infrarrojo del extracto proveniente de la cepa 444 perteneciente al género *Oceanobacillus*.

Se analizaron los diferentes extractos liofilizados provenientes de las 22 cepas de bacterias halófilas, los respectivos espectros infrarrojos permitieron establecer que todas las cepas producen el mismo tipo de matriz gelatinosa de acuerdo a la presencia de las siguientes bandas en el infrarrojo: una banda ancha e intensa entre 3400 y 3600  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a los estiramientos O-H, una banda de mediana intensidad entre 2950 y 2990  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a estiramientos simétricos y asimétricos C-H (típicos de  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ) y una banda intensa a aguda entre 1700 y 1760  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento C=O típicos de carbonilos de aldehídos, cetonas y carboxilos tipo Ester (Figura 20). Los resultados anteriores permiten establecer a la matriz gelatinosa como una macromolécula que contiene grupos funcionales tipo hidroxilo, carbonilo y carboxilo dispuestos en una cadena hidrocarbonada que probablemente tenga un alto grado entrecruzamiento.

## 4.6 Discusión general

La mina de sal de Zipaquirá se caracteriza por ser un ecosistema hipersalino, el cual presenta pocos estudios a nivel de ecología microbiana y potencial bioactivo, esto ha despertado un inusitado interés en la búsqueda de bacterias halófilas y su potencial uso a nivel industrial y medicinal. Por lo anterior, se planteó establecer el potencial bioactivo de las bacterias halófilas en esta mina de sal, para ello, se tuvieron en cuenta parámetros como la salinidad, la cual influyó notoriamente en los tipos de bacterias halófilas aisladas, encontrando que las halófilas extremas se agruparon principalmente en la zona IV, de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos de la zona, ya que presenta un alto contenido de NaCl. En la zona I se aislaron bacterias débiles y halotolerantes, lo cual es consistente con la concentración de NaCl que presenta esta zona. Los resultados anteriores son soportados por algunos estudios sobre el tema, en particular el realizado en el lago salado de El-Djerid (Tunisia), en el cual se encontró que la halotolerancia de las cepas dependía de la salinidad presente en el sitio de aislamiento.<sup>62</sup> Lo anterior se debe a que las cepas halófilas desarrollan diferentes estrategias de supervivencia que les permiten tener un equilibrio osmótico con el medio dependiendo de la concentración de sal que posea su entorno,<sup>5</sup> por tal motivo las cepas pertenecientes a la zona IV, probablemente han adquirido estrategias diferentes de osmoregulación que les permiten crecer a altas concentraciones de sal a diferencia de las cepas que se aislaron de la zona I que presenta una concentración de sal menor.

Bajo condiciones físico-químicas similares a las presentadas por la mina de sal, se lograron aislar 41 cepas halófilas pertenecientes al dominio *Bacteria*, entre las cuales se encontraron los géneros *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus* y *Staphylococcus*, los cuales se encuentran distribuidos homogéneamente en tres zonas de la mina (I, III y IV), lo que permite intuir que se trata de bacterias que comparten nichos ecológicos dentro de un ecosistema, lo anterior es consistente con investigaciones realizadas en la mina de sal de Karak, donde se aislaron cepas pertenecientes al género *Bacillus* en todos los sitios de recolección, a diferencia del género *Halomonas*, el cual fue aislado solamente en uno de los sitios de recolección.<sup>61</sup> Lo anterior, se debe posiblemente a que las zonas de recolección comparten características ambientales que permiten el crecimiento de bacterias del mismo género, así mismo, también puede deberse a que algunos géneros bacterianos tienen mayor número de unidades formadoras de colonia en comparación con otros géneros, lo que hace que sea más factible aislarlos a pesar de estar en el mismo nicho.

Al realizar los análisis taxonómicos se encontró que 13 cepas pertenecientes a los géneros *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus* y *Halomonas*, presentan porcentajes de identidad menores a 98,7% con el vecino más cercano, lo que permite proponer a estas cepas como posibles especies nuevas, lo anterior es similar a lo reportado en estudios realizados en manantiales salinos colombianos, en donde se aislaron nuevas cepas con porcentajes de identidad menores a 97%.<sup>20</sup> Lo que permite concluir que los ecosistemas salinos de Colombia son una fuente potencial de nuevas especies de bacterias halófilas.

Una característica relevante de este grupo de especies nuevas es que 6 cepas provenientes de la zona IV, son capaces de crecer en concentraciones de salinidad hasta 30% (p/v), por lo que se puede

establecer que esta zona, proporciona las características físico-químicas adecuadas para el crecimiento de nuevas especies de bacterias halófilas extremas, por lo tanto, es una zona de gran interés y con gran potencial para el aislamiento de este tipo de bacterias. Los resultados obtenidos permiten establecer a la zona IV como un lugar de alto interés para realizar estudios de microorganismos halófilos en ecosistemas salinos colombianos.

En general, las cepas consideradas como nuevas se caracterizaron por crecer a una temperatura óptima de 30°C, pH 7, aerobiosis y oscuridad durante 5 días, además, presentaron un perfil de azúcares y sensibilidad a antibióticos diferente entre ellas y la cepa más cercana, lo que confirma que se trata de cepas distintas, posiblemente con una maquinaria metabólica diferente. De estas especies el 77% son bacilos Gram negativos y el 24% son bacilos Gram positivos, lo que permite concluir que en la mina existe una diversidad de especies bacterianas, las cuales pertenecen principalmente a los géneros *Chromohalobacter* y *Halomonas*.

Las cepas restantes (cepas con alto porcentaje de similaridad >98.7%), evidenciaron un perfil diverso de degradación de azúcares y sensibilidad a antibióticos, que las hacen diferentes entre sí (Tablas 9-22); esta característica puede deberse a que las condiciones de la mina favorecen diferentes rutas metabólicas, de acuerdo a los sustratos disponibles en el medio, como ha sido establecido en estudios realizados en las minas de sal en Yunnan, China, donde las cepas difieren en su mayoría en la degradación de sustratos dependiendo de la especie.<sup>69</sup> Esto permite concluir que los ambientes salinos albergan una diversidad de cepas con características metabólicas diferentes que pueden ser usadas en algunos sectores de la industria como la alimenticia para realzar algunos sabores.

Al evaluar el potencial bioactivo de cada una de las cepas pertenecientes a los diferentes géneros aislados, se estableció que la cepa 1S32 es productora de amilasas, enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar el almidón. Este tipo de enzimas ha sido reportada ampliamente en bacterias halófilas de la familia *Bacillaceae*, como es el caso de *Amphibacillus* sp., el cual es capaz de sintetizar una amilasa halófila termoestable<sup>102</sup> y al mismo tiempo que la cepa halófila *Bacillus* sp. EMB9, sintetiza proteasas halófilas,<sup>103</sup> esta clase de enzimas capaces de tolerar condiciones extremas en especial las amilasas son de gran utilidad en diferentes industrias como la alimentaria, enfocada a alimentos con altas concentraciones de sal.

De los géneros *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus* y *Halomonas*, 22 cepas son capaces de sintetizar una matriz gelatinosa, la cual es un polímero que puede tener como función la protección de la célula ante altas concentraciones de sal, además, puede presentar diversas actividades biológicas. Dentro de estas actividades, la matriz producida por las cepas 1S33, 3S32 y 442, tiene la capacidad

---

<sup>102</sup> Mesbaha, N.; Wiegel, J. **2014**. Halophilic alkali- and thermostable amylase from a novel polyextremophilic *Amphibacillus* sp. NM-Ra2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 222–229.

<sup>103</sup> Sinha, R.; Khare, S. **2013**. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 145, 357–361.

de disminuir la tensión superficial del medio de cultivo TSB + NaCl (Tabla 24). Esta actividad biosurfactante ha sido reportada principalmente para el género *Oceanobacillus*, el cual presenta algunos reportes sobre cepas provenientes del mar Antártico, con capacidad de producir compuestos que disminuyen la tensión superficial.<sup>64</sup> Estos biosurfactantes son de gran uso en diferentes industrias como la cosmética, alimentaria, farmacéutica y petrolera, ya que tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial en condiciones de alta salinidad.

Por otro parte, la matriz gelatinosa generada de las cepas 1S32, 416, 413, 432, 444T, 433 y 436 presentó actividad antibiótica contra *E. coli* y *K. pneumoniae* (Tabla 25), una actividad poco reportada para los géneros *Chromohalobacter* y *Halomonas*. Sin embargo, existen reportes de cepas pertenecientes al género *Oceanobacillus*, capaces de producir compuestos que inhiben el crecimiento de *E. coli*. Las cepas 444 y 434, inhibieron los sistemas de comunicación de *quorum sensing* en *C. violaceum*, esta actividad no ha sido reportada para el género *Halomonas*, al cual pertenece la cepa 444, pero si en el género *Oceanobacillus*, al cual pertenece la cepa 434. Las bacterias pertenecientes a este género han sido reportadas como productoras de N-acil homoserin lactonasas, enzimas que degradan las AHLs e interfieren en la señalización de los sistemas de *quorum sensing*.<sup>101</sup> Estas actividades son uno de los mayores aportes de este trabajo ya que dos géneros de bacterias halófilas como lo son *Chromohalobacter* y *Halomonas*, son capaces de sintetizar compuestos antibióticos con potencial aplicación a nivel medicinal y farmacológico como inhibidores de bacterias patógenas e interferentes de la señalización de los sistemas de *quorum sensing*, lo cual puede ser de gran utilidad en la prevención de la formación de biopelículas (*Biofilm*).

En resumen, se aislaron e identificaron 41 cepas halófilas (halotolerantes hasta extremas), con morfologías y pigmentos propios de bacterias halófilas, además de un perfil diverso de degradación de sustratos y sensibilidad a antibióticos con actividades hidrolíticas, biosurfactantes, antibióticas e inhibidores de *quorum sensing*; por lo cual en este estudio se reporta el potencial bioactivo de diferentes estas bacterias, las cuales pueden ser utilizadas en la industria petrolera, alimentaria y farmacéutica. Principalmente, la cepa 434 perteneciente al género *Halomonas*, debido a que posee un amplio potencial bioactivo, como inhibidora de algunos patógenos y de sistemas de señalización en *quorum sensing*.

## 5 CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron cepas de bacterias halófilas de las cuales 13 son especies nuevas ya que presentaron un porcentaje de identidad menor a 98,7%, siendo un aporte para la biodiversidad de microorganismos en ambientes extremos colombianos.

La salinidad presente en la zona de recolección es un factor decisivo para el aislamiento de las diferentes especies de bacterias halófilas, encontrando que las halófilas extremas se agruparon principalmente en la zona IV, de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos de la zona, ya que presenta un alto contenido de NaCl.

Las cepas aisladas son diferentes entre sí, debido a que tienen un perfil de degradación de azúcares y sensibilidad a antibióticos que difiere entre los aislados, posiblemente porque cada una de ellas adaptó una maquinaria metabólica de acuerdo a las condiciones del entorno, lo que permite establecer que la mina de sal de Zipaquirá tiene una gran diversidad de bacterias con metabolismos diferentes.

Algunas cepas presentaron potencial bioactivo, como es el caso de la cepa 1S31 la cual es capaz de producir enzimas hidrolíticas de tipo amilasas a una concentración de NaCl de 3% (p/v), por otro parte, 22 cepas pertenecientes a los géneros *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus*, y *Halomonas*, fueron capaces de sintetizar una matriz gelatinosa con propiedades biosurfactantes, antibióticas contra *E. coli* y *K. pneumoniae* e inhibidoras de *quorum sensing* en *C. violaceum*. Es de resaltar, que la cepa 434 comparte estas dos actividades, las cuales han sido poco reportadas para bacterias halófilas, lo que hace que estas cepas representen un inusitado potencial bioactivo útil en diferentes industrias.

Por lo anterior, es posible concluir que la mina de sal de Zipaquirá, constituye un reservorio de nuevas especies de bacterias halófilas (halotolerantes y extremas) capaces de producir compuestos de interés para diferentes industrias como la farmacéutica, la alimentaria y la petrolera.

De acuerdo a lo anterior, se cumplieron los objetivos establecidos para esta tesis, ya que se lograron aislar bacterias halófilas con potencial bioactivo, entre ellas algunas especies nuevas que contribuyen a los estudios de biodiversidad en ambientes extremos. Adicionalmente, este estudio permitió al grupo de investigación en Bioprospección de la Universidad de La Sabana establecer una metodología para el aislamiento, identificación y búsqueda de bacterias halófilas con potencial bioactivo. Así como, la generación de nuevos proyectos de tesis utilizando las cepas obtenidas en este trabajo, para las cuales se creó un repositorio de bacterias halófilas.

## 6 RECOMENDACIONES

Es importante seguir con los estudios enfocados hacia la recolección y aislamiento de bacterias halófilas de diferentes hábitats, con el fin de estandarizar procesos que permitan la máxima recolección de microorganismos, además de determinar la función que cumplen en el ecosistema, mediante técnicas.

Continuar con pruebas enfocadas a actividades reportadas para los géneros aislados como producción de xilanasas, degradación de pHas, entre otras con el fin de encontrar el mayor número de actividades para estos microorganismos.

Determinar la composición química exacta de la matriz gelatinosa con el fin de encontrar los posibles usos en la industria alimentaria y farmacéutica.

Enfocar los estudios en la elucidación de las moléculas antibióticas e inhibidoras de *quorum sensing*, con el fin de determinar los genes involucrados y los mecanismos de acción que tienen sobre patógenos. Los cuales serían de gran ayuda en distintas industrias como la farmacéutica.

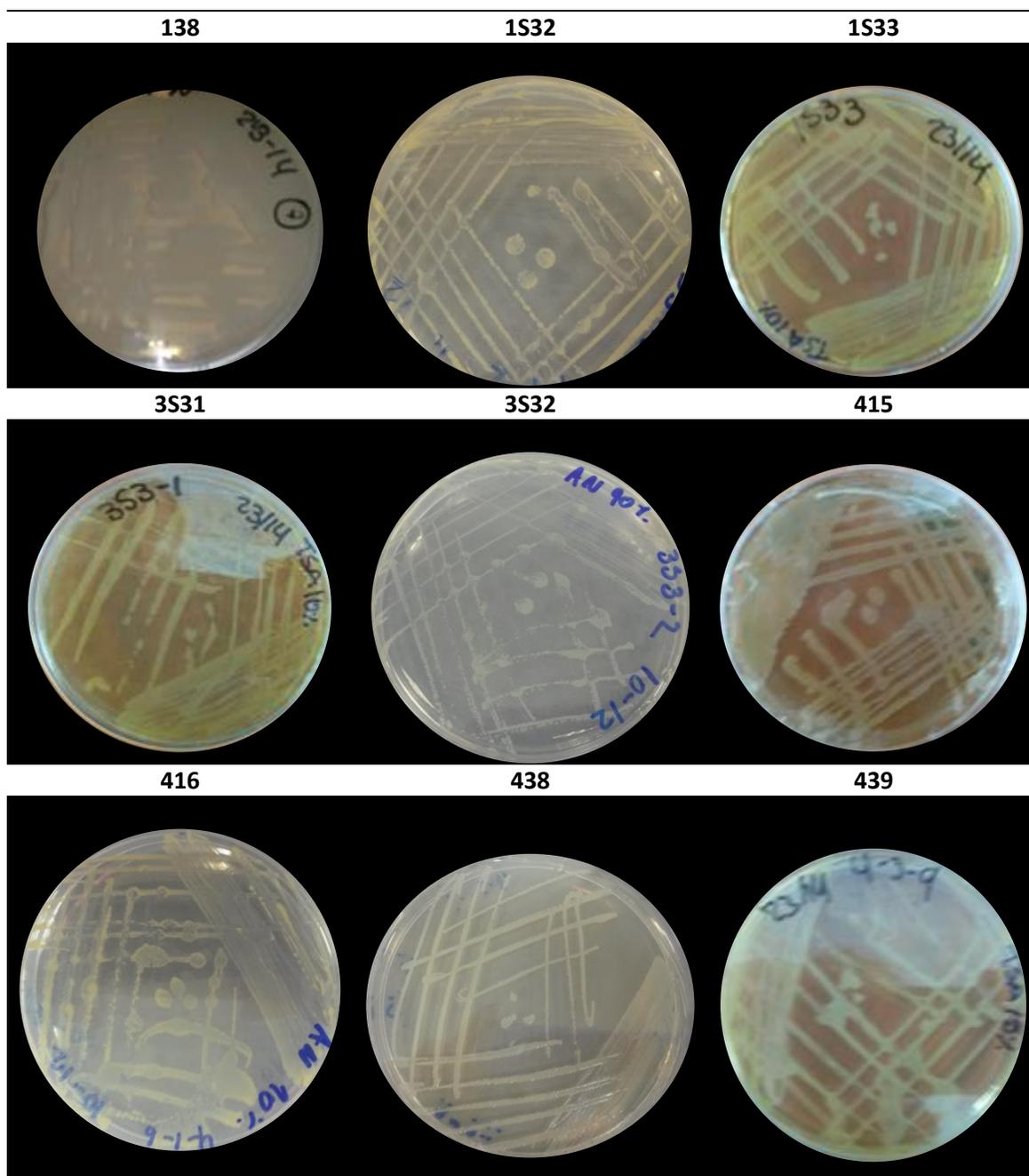
Determinar los mecanismos que tiene la cepa 434 para tener las tres actividades evaluadas, con el fin de aprovechar al máximo el potencial bioactivo de la cepa.

Escalar las cepas que presentaron actividad con el fin de obtener mayor cantidad de metabolitos.

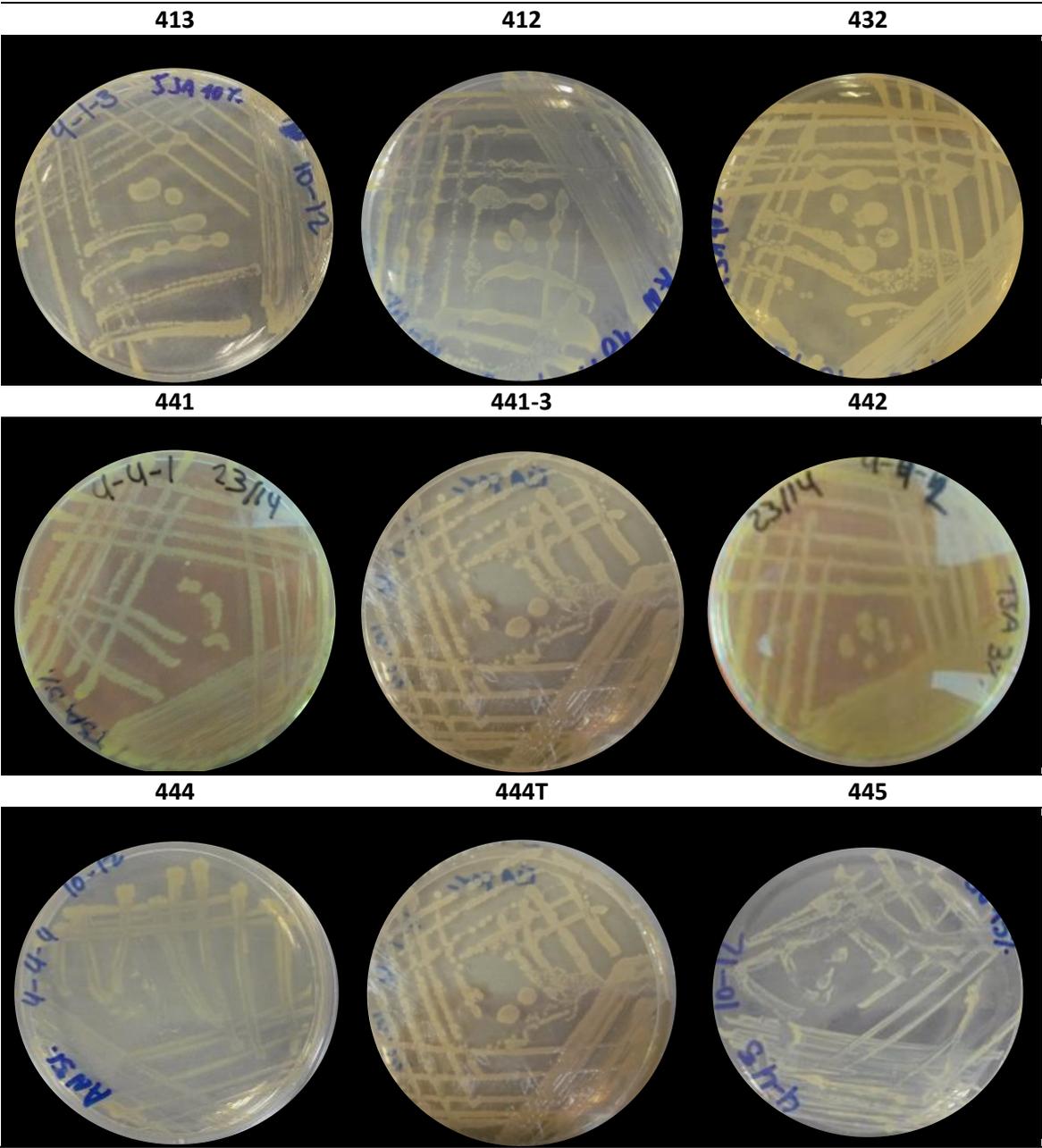
Utilizar varios medios de cultivo y técnicas de *screening* como Maldi-Tof, con el fin de aislar un mayor número de bacterias halófilas, como lo reportado en salinas del Mediterráneo, Atlántico y Pacífico, en donde fue posible aislar más de 4200 cepas procariotas, de las cuales el 40,9% fueron bacterias, esta recuperación tan elevada se debe a las técnicas utilizadas para el aislamiento y *screening*, las cuales se basaron en diluciones seriadas de las muestras recolectadas en agar SW con una concentración de NaCl de 20% y 30% (p/v) con 0,05% de extracto de levadura, además de una combinación de sales,<sup>63</sup> lo que pudo favorecer el crecimiento de un mayor número de cepas.

## Anexo 1. Fotografías de las cepas halófilas aisladas

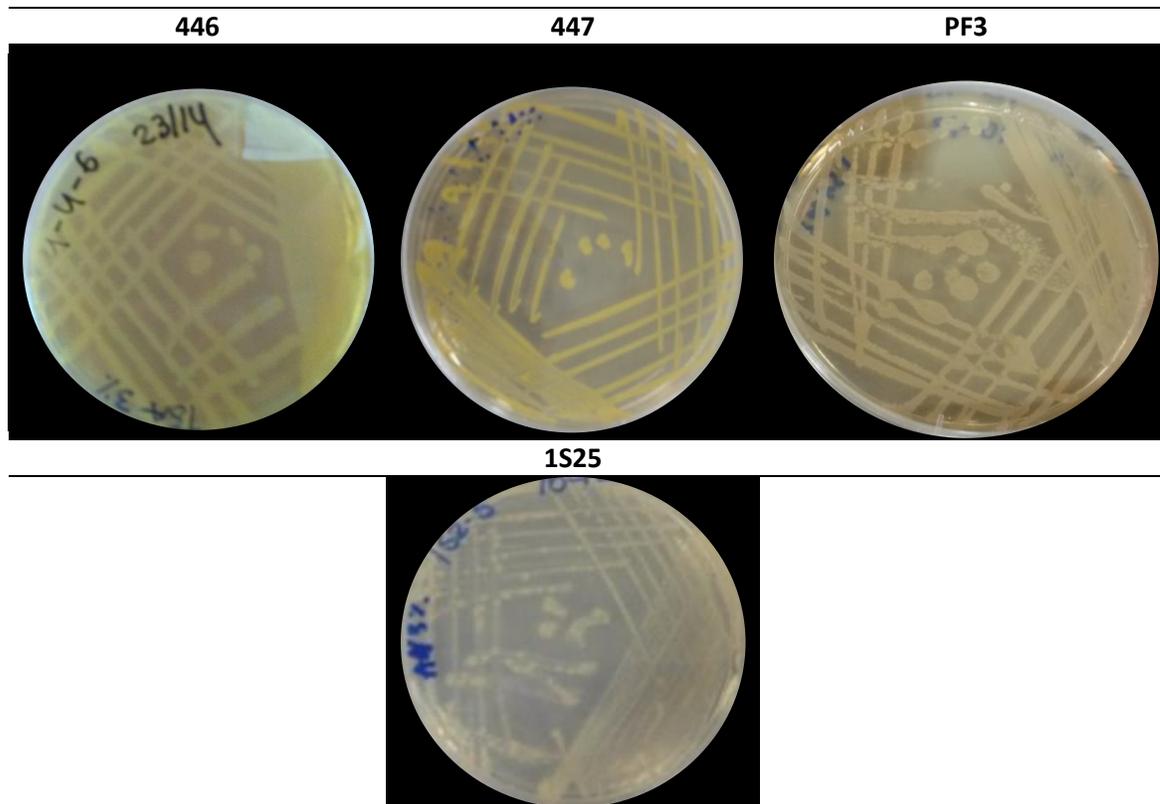
- Género *Chromohalobacter*



- Género *Oceanobacillus*



- Género *Oceanobacillus* . Continuación



- *Halomonas*

434

433

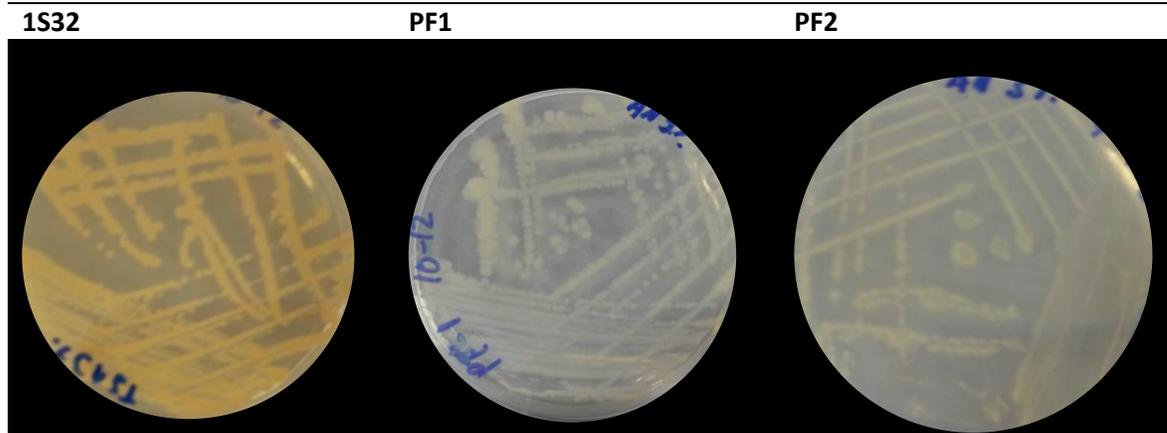
436



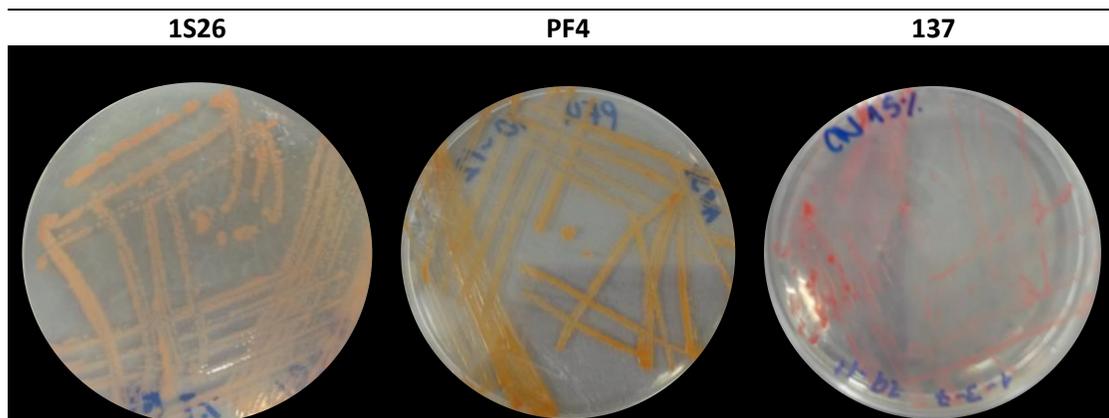
431



- *Bacillus*



- Géneros *Kocuria*, *Paracoccus*, Cepas 137





## Anexo 2: Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de bacterias halófilas

### Composición del caldo tripticasa de soya (TSB)

Componente	Concentración (g/L)
Digerido pancreático de caseína	15,0
Peptona de harina de soya	5,0
NaCl	5,0

### Composición del agar tripticasa de soya (TSA)

Componente	Concentración (g/L)
Digerido pancreático de caseína	15,0
Peptona de harina de soya	5,0
NaCl	5,0
Agar	15,0

### Composición del medio semisólido tripticasa de soya OXOID® (TSB) semisólido

Componente	Concentración g/L
Digerido pancreático de caseína	15,0
Peptona de harina de soya	5,0
NaCl	5,0
Agar	5,0

### Solución stock *Salt wáter* 30% (p/v)

Componente	Concentración g/L
NaCl	240,0
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	30,0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	35,0
KCl	7,0
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,5

**Composición del caldo *Modified Growth Medium* (MGM) por litro**

Componente	MGM 1%	MGM 3%	MGM 10%	MGM 15%
Solución SW (mL)	33	100	330	500
Peptona OXOID (g)	5	5	5	5
Extracto de levadura OXOID (g)	1	1	1	1

**Composición del agar *Modified Growth Medium* (MGM) por litro**

Componente	MGM 1%	MGM 3%	MGM 10%	MGM 15%
Solución SW (mL)	33	100	330	500
Peptona OXOID (g)	5	5	5	5
Extracto de levadura OXOID (g)	1	1	1	1
Agar-agar	15	15	15	15

**Composición del caldo Vreeland para halófilas extremas**

Componente	Concentración g/L
NaCl	200,0
KCl	4,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20,0
Glicerol	2,5
Piruvato	2,5

**Composición del agar Vreeland para halófilas extremas.**

Componente	Concentración g/L
NaCl	200,0
KCl	4,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	20,0
Glicerol	2,5
Piruvato	2,5
Agar	15,0

### Composición de los caldos Caton para halófilas moderados

Componente	Concentración g/L
NaCl	98,0
KCl	2,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,0
NaBr	0,23
NaHCO <sub>3</sub>	0,06
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001
Extracto de levadura	10,0
Peptona	5,0
Glucosa	1,0

### Composición del agar Caton para halófilas moderadas

Componente	Concentración g/L
NaCl	98,0
KCl	2,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,0
NaBr	0,23
NaHCO <sub>3</sub>	0,06
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001
Extracto de levadura	10,0
Peptona	5,0
Glucosa	1,0
Agar	15,0

### Composición del agar Luria-Bertani OXOID®.

Componente	Concentración g/L
Triptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
NaCl	10,0
Agar	15,0

**Anexo 3. Primers usados para la amplificación del gen 16S RNAr**

<b>Posición de anillamiento</b>	<b>Secuencia (5' a 3') del 16S rARN de <i>E. coli</i>.</b>
8	CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT
1492	CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GG TGA TCC AGC C

## Anexo 4: Equipos, reactivos y software

### Equipos

Equipo	Marca
Termómetro de mercurio	-
pH metro	Handylab
Temociclador	Bio-rad
GelDoc™ EQ	Bio-Rad
Cámara de anaerobiosis	3M
Liofilizador	LabConco

### Reactivos

Reactivo	Marca
Hyperladder III (500pb-5Kb)	Bioline
Taq Polimerasa	Vivantis
dNTPs	Vivantis
Buffer para Taq	Vivantis
Syber safe	Vivantis
Anaerogen <sup>R</sup>	Merck

### Software

Programa	Versión
Quantity One <sup>®</sup>	4.1
CLCbio Workbench <sup>®</sup>	7.0
MEGA <sup>®</sup>	5.0

### Anexo 5: Características morfológicas de las cepas halófilas aisladas

Zona	Cepa	%NaCl inicial del aislamiento	Muestra de aislamiento	Morf*	Gram*	Esporas	Cap*	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Consistencia	Pigmento
I	138	10	Sedimento	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
I	1S32	10	Roca	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Marrón
I	1S33	10	Roca	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Amarilla
III	3S31	10	Roca	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Mucoide	Blanca
III	3S32	10	Roca	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca
IV	415	15	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
IV	416	10	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Amarilla
IV	438	15	Sedimento	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Mucoide	Blanca transparente
IV	439	15	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Mucoide	Blanca transparente
IV	413	10	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca transparente
IV	412	10	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca
IV	432	10	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca transparente
IV	441	10	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Marrón
IV	441-3	3	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Marrón
IV	442	3	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Ondulado	lisa	Cremosa	Amarillo pálido
IV	444	10	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca transparente
IV	444T	15	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca

## Características morfológicas de las cepas halófilas aisladas

Zona	Cepa	%NaCl inicial del aislamiento	Muestra de aislamiento	Morf*	Gram*	Esporas	Cap*	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Consistencia	Pigmento
IV	445	15	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Amarilla transp
IV	446	3	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Ondulado	lisa	Cremosa	Blanca
IV	447	3	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Amarillo
III	PF3	3	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca transparente
I	1S25	3	Sedimento	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
IV	434	15	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Amarillo palido
IV	433	15	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Seca	Amarillo palido
IV	436	15	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca transparente
IV	431	3	Agua	Bacilos	Negativos	-	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca
IV	PF4	3	Agua	Cocos	Negativos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Naranja
IV	1S31	3	Sedimento	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Amarillo palido
I	PF1	1	Agua	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca
II	PF2	1	Roca	Bacilos	Positivos	Terminal	-	Irregular	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Blanca
I	1S26	1	Sedimento	Bacilos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Rosada
I	1S23	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
I	1S24	1	Sedimento	Cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
I	133	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema

I	132	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
---	-----	---	-----------	-------	-----------	---	---	------------	---------	------------	------	---------	-------

Características morfológicas de las cepas halófilas aisladas

Zona	Cepa	%NaCl inicial del aislamiento	Muestra de aislamiento	Morf*	Gram*	Esporas	Cap*	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Consistencia	Pigmento
I	136	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
III	331	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
III	335	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
III	334	1	Sedimento	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema
IV	435	2	Agua	cocos	Positivos	-	-	Puntiforme	Convexa	Redondeado	lisa	Cremosa	Crema

\*Morf: Morfología Gram: Coloración de Gram Cap: Presencia de cápsula

## Continuación Anexo 5. Condiciones óptimas de crecimiento de las bacterias halófilas aisladas en medio TSA

Cepa	Zona de recolección	Rango pH de crecimiento (óptimo)	Rango Temp de crecimiento (óptimo)	Rango de % NaCl (óptimo)		Movilidad	Relación con el oxígeno
138	I	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
1S32	I	6-9 (7)	20-37 (30)	5-15 (10)	Moderado	+	Aerobio
1S33	I	6-9 (7)	14-37 (30)	5-15 (10)	Moderado	+	Aerobio
3S31	III	6-9 (7)	20-37 (30)	5-15 (10)	Moderado	+	Aerobio
3S32	III	6-9 (7)	14-37 (30)	5-15 (10)	Moderado	+	Aerobio
415	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
416	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	5-10 (10)	Moderado	+	Aerobio
438	IV	6-9 (7)	14-37 (30)	5-15 (10)	Moderado	+	Aerobio
439	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	20-30 (25)	Extrema	+	Aerobio
413	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
412	IV	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
432	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
441	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
441-3	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
442	IV	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
444	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
444T	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
445	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
446	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
447	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
PF3	III	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
1S25	I	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (5)	Tolerante	+	Aerobio
434	IV	6-9 (7)	14-37 (30)	20-30 (25)	Extrema	+	Aerobio
433	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	20-30 (20)	Extrema	+	Aerobio
436	IV	6-9 (7)	14-37 (30)	20-30 (25)	Extrema	+	Aerobio
431	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
PF4	IV	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	-	Aerobio
1S31	I	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
PF1	I	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
PF2	II	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
1S26	I	6-9 (7)	20-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	+	Aerobio
1S23	I	6-9 (7)	20-37 (30)	1-5(3)	Débil	-	Aerobio
1S24	I	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	-	Aerobio
133	I	6-9 (7)	14-37 (30)	1-5(3)	Débil	-	Aerobio
132	I	6-9 (7)	14-37 (30)	1-5(3)	Débil	-	Aerobio

136	I	6-9 (7)	14-37 (30)	1-5(3)	Débil	-	Aerobio
331	III	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	-	Aerobio
335	III	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	-	Aerobio
334	III	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	-	Aerobio
435	IV	6-9 (7)	14-37 (30)	0-5 (3)	Tolerante	-	Aerobio

