

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**Bacterias halófilas de un ambiente salino acuático,
identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024**

Para optar el título profesional de:
BIÓLOGO, ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:
Bach. Edison PALOMINO GUERRERA

ASESORA:
Dra. Vidalina ANDÍA AYME

AYACUCHO - PERÚ

2025

A Dios, a mis padres Teresa y Rolando, a mis hermanos y a mi fiel compañero Doky, por su apoyo abnegado en mi formación como profesional, de la cual aprendí no solo a enamorarme, sino amarla con el alma.

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater* donde alcancé mis conocimientos académicos abriéndome las puertas de su seno científico que me permitieron apreciar la Escuela de Biología y seguir avanzando profesionalmente.

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, por acogerme en sus instalaciones, en especial al grupo del Laboratorio de Genética y Biotecnología Microbiana, de Facultad de Ciencias Biológicas. Así mismo, mis más profundo y sincero agradecimiento a la Dra. María Antonieta Quispe Ricalde por su asesoramiento y mentoría que fueron determinantes desde el inicio hasta el final de la investigación.

A la Organización CHIRAPAQ por el apoyo financiero en el proyecto de investigación.

A la Dra. Vidalina Andía Ayme, por su respaldo y orientación en la ejecución del proyecto y el apoyo abnegado en su asesoramiento.

Al Dr. Gilmar Peña Rojas, por su amistad, la confianza y apoyo en el asesoramiento, permitiendo la elaboración y finalización del trabajo de investigación

Al Blgo. Hugo Infañón Escobar, por el apoyo en el Laboratorio de Salud Ambiental de la DIRESA - Ayacucho.

“El ADN no es destino, es historia. Tus genes son el legado de todos los organismos que existieron antes que tú, empezando por tus padres y rebobinando para atrás hasta el mismo principio.

En algún lugar de tu código genético está el relato de cada plaga, cada parasito, cada depredador, y cada alteración planetaria a la que tus antepasados sobrevivieron.

Y cada mutación, cada cambio que les ayuda a adaptarse mejor a esas circunstancias está escrito ahí”

Sharom Moalen 2007

ÍNDICE GENERAL

	Pág
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xí
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes de la investigación	3
2.1.1 Internacionales	3
2.1.2 Nacionales	4
2.2 Bases teóricas	6
2.2.1 Hábitats extremos	6
2.2.2. Microorganismos de ambientes extremos	7
2.2.3 Microorganismos halófilas	8
2.2.4 Bacterias halófilas	9
2.2.5 Osmorregulación de bacterias halófilas	11
2.2.6 Estrategias de solutos compatibles	12
2.2.7 Estrategia de salinización (<i>Salt – in</i>)	13
2.2.8 Actividades biológicas de las bacterias halófilas	13
2.2.9 Aislamiento de microorganismos halófilos	14
2.2.10 Condiciones de cultivo para bacterias halófilos	15
2.2.11 Características de bacterias halófilas	15
2.2.12 Caracterización fenotípica	15
2.2.13 Extracción de ADN	16
2.2.14 Cuantificación del ADN	16
2.2.15 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	17
2.2.16 <i>Primers</i>	18
2.2.17 El gen ribosomal ARN 16S	18
2.2.18 Regiones del Gen Ribosomal 16S	18
2.2.19 Electroforesis	20
2.2.20 Secuenciación Sanger	20

III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Ubicación de la zona de estudio	23
3.1.1. Ubicación política	23
3.1.2. Ubicación geográfica	23
3.2. Población y muestra	23
3.2.1. Unidad de análisis	23
3.2.2. Población	23
3.3 Metodología y recolección de datos	23
3.3.1 Zona de muestreo	23
3.3.2 Toma de muestra	24
3.3.3 Etiquetado, preservación y almacenamiento de la muestra	24
3.3.4 Medición de salinidad del agua de la zona salina	25
3.3.5 Medio de cultivo para aislamiento de bacterias halófilas	25
3.3.6 Método de siembra y aislamiento	26
3.3.7 Caracterización fenotípica de las bacterias halófilas	29
3.3.8 Cultivo de cepas puras en medio líquido <i>Sea Water</i>	29
3.3.9 Extracción de ADN de cepas aisladas	29
3.3.10 Determinación de la concentración del ADN de las cepas aisladas	30
3.3.11 Amplificación del gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR	31
3.3.12 Electroforesis para ver la integridad del gen amplificado	32
3.3.13 Secuenciación del gen ribosomal ARN 16S	33
3.3.14 Análisis bioinformático de las secuencias del gen ARNr 16S	33
IV. RESULTADOS	34
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES	58
VII. RECOMENDACIONES	59
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
X. ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación de los organismos halófilos en base a la concentración óptima de NaCl para su crecimiento.	10
Tabla 2.	Composición del medio de cultivo.	25
Tabla 3.	Rótulo de las muestras cultivadas.	26
Tabla 4.	Cebador universal utilizado.	31
Tabla 5.	Sistema mix de PCR (KAPA Taq PCR Kit-Merck) para volumen de 25 µl.	32
Tabla 6.	Resultados de cultivo y aislamiento de bacterias halófilas, por método filtro de membrana en medio <i>Sea Water</i> . Ayacucho, 2024.	35
Tabla 7.	Los resultados del análisis fisicoquímico de la muestra de agua de la fuente salina de Cachipata. Ayacucho, 2024.	37
Tabla 8.	Resultado de resiembras para la purificación de cepas en medio líquido de SW, Ayacucho, 2024.	38
Tabla 9.	Resultados de características macroscópicas y microscópicas de bacterias halófilas aisladas (Anexo 5). Ayacucho, 2024.	39
Tabla 10.	Resultados de cuantificación de ADN extraído de las cepas bacterianas. Ayacucho, 2024.	44
Tabla 11.	Resultados de pares de base del amplicón, analizado por el software (Image Lab versión 6.1, Bio-Rad Laboratories) para medir la distancia recorrida (anexo 13). Ayacucho 2024.	47
Tabla 12.	Resultados de identidad aproximada de familias, de grupos bacterianos halófilos mediante herramienta BLASTn..	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación de la corteza terrestre que muestra la diversidad de ambientes extremos y su ubicación aproximada. Adaptada de (Merino <i>et al.</i> , 2019).	7
Figura 2. Árbol filogenético de las Bacterias y las Archaea, basado en comparaciones de secuenciación del gen ARNr 16S (Ventosa <i>et al.</i> , 1998), adaptada de (Warren, 2016).	9
Figura 3. Visión general de la osmorregulación en bacterias y arqueas halófilas (Saum & Müller, 2008), Adaptada por (Mukhtar <i>et al.</i> , 2020).	12
Figura 4. Representación esquemática del gen ARNr 16S, indicando las regiones variables (V1-V9), y conservadas (C1-C9). Citado de (Altarejos, 2015).	19
Figura 5. Secuenciación por el método Sanger (Claverie, 2007), adaptada por (Romoacca, 2018).	22
Figura 6. Muestras de agua en botellas.	25
Figura 7. Procedimiento de filtración, siembra de las muestras, e incubación.	27
Figura 8. Resiembra de las cepas con buen crecimiento en medio de cultivo SW líquido y sólido.	28
Figura 9. Programación para amplificación del gen ARNr 16S en el termociclador.	32
Figura 10. Muestra el número y abundancia de bacterias que crecieron en relación a horas (24-160) en incubación a 36°C. Ayacucho, 2024.	36
Figura 11. Resultado de caracterización macroscópica de bacterias halófilas aisladas. Ayacucho, 2024.	42
Figura 12. Resultado de las características microscópicas de bacterias halófilas, aisladas. Ayacucho, 2024.	43
Figura 13. Los resultados de la amplificación del gen ARNr 16S, por técnica de la PCR y visualizadas por electroforesis. Ayacucho, 2024.	46

- Figura 14. Abundancia relativa de presencia de familia de bacterias halófilas encontradas, en relación al % de NaCl. Ayacucho 2024. 49
- Figura 15. Porcentaje de abundancia de familia de bacterias halófilas encontradas. Ayacucho 2024. 50

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Lugar de toma de muestra.	69
Anexo 2. Recolección de muestras del manantial Cachipata.	69
Anexo 3. Análisis fisicoquímico del agua.	70
Anexo 4. Procedimiento de (tinción Gram), para observar caracteres microscopicos de las cepas.	71
Anexo 5. Características culturales y microscópicas.	72
Anexo 6. El kits de extracción de ADN “Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit”.	73
Anexo 7. Equipo de Nanoespectrofotómetro, midiendo la longitud de onda y la absorbancia a 260nm.	73
Anexo 8. kits para la amplificación del gen ARNr 16S.	74
Anexo 9. Preparación del tampón de carga Buffer TBE (0,5X) 1L.	74
Anexo 10. Preparación de gel de agarosa al 1%.	74
Anexo 11. Producto del gen ribosomal 16S, en gel de agarosa 1%.	75
Anexo 12. Resultado del algoritmo BLAST.	75
Anexo 13 Software Image Lab para medir los resultados de pares base.	76
Anexo 14 Matriz de consistencia.	77

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se centra en el estudio de diversidad de bacterias halófilas, que se obtuvieron a partir de muestra de agua del manantial salado de los andes del sur del departamento de Ayacucho, del sector denominado Cachipata, perteneciente al distrito de Hualla, provincia de Víctor Fajardo, el trabajo de investigación se da por la necesidad de conocer la abundancia de bacterias en hábitat salino, así mismo reportar los primeros estudios microbiológicos de este tipo de ambientes que presentan nuestra región de Ayacucho, del cual no hay evidencias previas de su estudios. El objetivo de la investigación fue caracterizar e identificar por medio del gen ribosomal 16S, los grupos bacterianos halófilos aisladas del manantial salino.

Se procesaron 68 cepas bacterias, cuyas características morfológicas fueron determinadas a partir de su fenotipo, considerando la forma, pigmentación, elevación, superficie, consistencia y borde de las colonias, con ayuda de un estereoscopio, así mismo sus características microscópicas mediante tinción Gram, teniendo 58 cepas Gram negativas y 10 cepas Gram positivas con las diferentes formas como son; bacilos cortos y largos, cocos y diplococos, en donde con mayor número son los bacilos, posterior a ellos se realizó la extracción de ADN de cada cepa; para así, poder amplificar el gen ribosomal 16S, seguido a ello el análisis de secuencia parcial del gen ribosomal 16S, en el depósito de la base de datos (National Center for Biotechnology Information-NCBI), donde mediante el algoritmo del BLAST las secuencias parciales fueron comparadas, y se llegaron a identificar aproximaciones de 7 Familias bacterianas como: Halomonadaceae, Halanaerobiaceae, Bacillaceae, Carnobacteriaceae, Vibrionaceae, Idiomarinaceae y Ectothiorhodospiraceae, todas estas pertenecientes a grupo bacteriano halófilo.

Palabra clave: bacterias halófilas, aislamiento e identificación, gen ribosoma

I. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas extremos del mundo son activos naturales importantes, con un considerable valor estético, cultural, económico, recreativo, científico, de conservación y ecológico (Williams, 2002), estos ecosistemas presentan una variedad de características particulares que los hacen ideales para albergar comunidades microbianas (Burgess *et al.*, 2017), entre estos ecosistemas se encuentran los manantiales salinos, que debido a sus inusuales condiciones fisicoquímicas, son denominados ambientes extremos (Ward & Brock, 1978). Los manantiales salinos se clasifican en atalosalinos y talasosalinos, de acuerdo a su origen. En estos entornos habitan bacterias halófilas, una clase de microorganismos extremófilos que prosperan en concentraciones muy altas de sal. En los últimos años, las bacterias halófilas han despertado un gran interés a nivel mundial, principalmente por sus aplicaciones y potencialidades biotecnológicas. Para poder sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de sal, estas bacterias han desarrollado complejas estrategias de adaptación. Las dos estrategias clásicas de osmoadaptación son: "alta sal en el citoplasma" y "compatibilidad de solutos en el citoplasma", las cuales les permiten prosperar en condiciones hipersalinas (Reang *et al.*, 2024; Moreno *et al.*, 2009).

Kushner (1992), clasifican las bacterias halófilas de acuerdo a sus diferentes características, dependiendo de la concentración de cloruro de sodio que puede tolerar y en función de sus requisitos de sal. Los halófilos débiles son aislados principalmente de suelo marinos y marismas marinas, caracterizados por crecer a bajas concentraciones de sal de 1 a 3 % (p/v) (Mata, 2006), los halófilos moderados constituyen la mayor parte de la población microbiana total en los ambientes hipersalinos y desempeñan un papel ecológico importante, crecen a concentraciones de sal mayores de 3 a 15 % (p/v) (Fourçans *et al.*, 2006), los halófilos extremos suelen crecer lentamente en concentraciones mayores de 15 a 32 % (p/v), (Stan-Lotter & Fendrihan, 2013), y la mayoría contienen una variedad

de carotenoides, que les ayudan a la estabilización de la membrana, a tolerar alto estrés osmótico (Amoozegar *et al.*, 2016; Sasaki *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, la clasificación de los microorganismos se ha basado en una variedad de características tales como, morfológicas, fisiológicas, ecológicas y genéticas. Sin embargo, en la actualidad, la clasificación de procariotas se lleva a cabo principalmente mediante métodos moleculares, genómicos rápidos. Esta información genética recopilada permite el desarrollo de sistemas filogenéticos, a partir del desarrollo y preparación de librerías, posteriormente busca establecer relaciones entre los microorganismos por medio de una diversidad de herramientas bioinformáticas (Azahara, 2014). En el presente trabajo, desarrollado en Cachipata ubicado en los andes del sur de Ayacucho busca dar a conocer los primeros reportes del estudio de microorganismos extremófilos, para ello se utilizó técnicas clásicas de cultivo microbiológico y diferentes métodos de biología molecular como es la extracción de ADN con “Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit”. Posterior a este proceso se amplifica el gen diana mediante PCR técnica que hace miles de copias del gen 16S ARNr para su mejor estudio que permitieron estudiar la secuencia de bacterias halófilas para poder tener una clasificación en base al gen rRNA 16S. En base a lo expuesto, se plantearon los siguientes objetivos de investigación:

Objetivo general

Identificar mediante el gen ribosomal 16S bacterias halófilas aisladas de un ambiente acuático salino.

Objetivos específicos

- Aislar bacterias halófilas del ambiente acuático “Cachipata”.
- Caracterizar pruebas orientativas de bacterias aisladas del ambiente acuático “Cachipata”.
- Usar técnica molecular para amplificar el gen ribosomal 16S de las bacterias halófilas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Internacionales

Garzón (2016), aisló e identificó bacterias halófilas por método de extracción ADN, haciendo un análisis comparativo basado en la secuenciación del gen 16S ARNr. Además, se llevaron a cabo estudios morfológicos, bioquímicos, perfiles de resistencia a antibióticos y evaluaciones de diversas actividades biológicas. Dando resultados relevantes la presencia de diversos géneros aislados, entre ellos *Chromohalobacter*, *Oceanobacillus*, *Halomonas*, *Paracoccus*, *Kocuria* y *Staphylococcus*. Estos microorganismos exhibieron un amplio perfil bioquímico y demostraron la capacidad de producir enzimas, sustancias hidrolizantes, biosurfactantes, antibióticos e inhibidores para la detección de *quórum*.

Jácome (2018), caracterizó bacterias halófilas, en total 125 cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron 33 que resultaron similares en pruebas de observación macroscópica, microscópica, así como en pruebas bioquímicas y enzimáticas, del conjunto seleccionado, el 75% correspondió a bacilos Gram negativos, el 12% a cocos Gram negativos y otro 12% a cocos Gram positivos. En relación con la actividad enzimática, el 51% exhibió actividad lipolítica, el 30% actividad proteolítica y el 18% actividad amilolítica. Los resultados obtenidos indican la posible presencia de géneros como *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Salinivibrio*, *Pseudomonas*, *Salinibacter*, *Paracoccus*, *Salinococcus* y *Staphylococcus*.

Ruiz (2020), aisló bacterias halófilas usando medios de cultivo adicionados con 5% de NaCl. De ello se identificaron un total de 88 cepas de bacterias halófilas, para ello se utilizó el gen ribosomal 16S ARNr, el cual le permitió agrupar los géneros: *Agromyces*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Oceanobacillus*, *Pseudomonas* y *Salinicola*, en cuanto al predominio de morfología

fue bacilos Gram negativos en el cual en el medio de cultivo formaron colonias con una variedad de tonalidades y formas, con capacidad de generar pigmentos y exopolisacáridos, en cuanto a la estadística el índice de Shannon-Weaver mostró una existencia de alta diversidad de especies halófilas en el manantial “Las Salinas”.

Rosas (2017), aisló 75 cepas en el ex Lago de Toxcoco (México) llegándose a identificar genéticamente por análisis de secuenciación del gen 16S rRNA, se identificaron las especies: *Salinicoccus roseus*; *Halomonas pantelleriensis*; *Nocardiopsis xinjiangensis* y *Nocardiopsis salina*, de las cuales observó cambios morfológicos en algunas cepas de bacterias halófilas debido a la presencia de metales pesados, en género del filo Actinobacterias.

Elshafey *et al.*, (2022), aisló bacterias, hongos y arqueas halófilas de los géneros *Halomonas* y *Brevibacillus*, detallando que el análisis molecular proporciona una relación filogenética, donde la mayoría de los aislados expresan importantes enzimas y fueron identificados por medio del gen ribosomal 16S rRNA, posteriormente secuenciadas y los exámenes de identificación se realizaron utilizando BLAST y el análisis de conglomeración utilizando software de MEGA XI. Magaña (2021) Aisló cepas bacterianas halófilas del suelo, para evaluar la potencialidad de biofertilizante *in vitro* en actividad de promoción de crecimiento vegetal como la fijación de nitrógeno, primeramente se caracterizó fenotípicamente seguido de ello la identificación molecular basada en el gen ribosomal ARN 16S, el cual se utilizaron para clasificar taxonómicamente, se realizó el análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA, revelando de los 64 aislados se encuentran en tres filos, el 95% Firmicutes, 3% Proteobacteria y 2% Actinobacteria, el género con más abundancia fue *Bacillus* 91%, las secuencias se analizaron con el algoritmo Blastn (BLAST/NCBI), así mismo para generar árboles filogenéticos se usaron las secuencias generadas por la base de datos del NCBI.

2.1.2 Nacionales

Las áreas extremadamente salinas en Perú se encuentran principalmente en las planicies desérticas a lo largo de la costa del Pacífico, en estos lugares, se forman pequeños lagos y lagunas donde la sal se acumula después de la evaporación gradual del agua, en todo el país, se identifican diversas zonas hipersalinas, como las Salinas de Huacho y Chilca en Lima, Otuma en Ica, Maras en Cusco, Pilluana en San Martín, Mórrope en Lambayeque, entre otros (Flores *et al.*, 2010).

Montes (2018), se aisló bacterias halófilas con actividad L-asparaginasa, el cual fueron cultivadas en medio M-9 modificado, obteniendo 106 cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron 24 con actividad L-asparaginasa, después se caracterizó fenotípicamente, obteniendo el 42 % como bacilos Gram negativos, 50 % bacilos Gram positivos y 8 % cocos Gram positivos, las bacterias productoras de L-asparaginasa hidrolizaron en mayor proporción *Skim milk*, almidón y CMC (Carboximetilcelulosa), los azúcares más empleados fueron glucosa y fructosa. Para la caracterización molecular, se amplificaron los genes ribosómicos 16S de 15 aislados con actividad L-asparaginasa y se secuenciaron parcialmente, para después desarrollar el análisis bioinformático, por medio de programación BLASTn, los géneros identificados fueron: *Bacillus*, *Enterobacter* y *Halomonas*.

García y Huaco (2018), aisló bacterias halófilas, para después caracterizar bioquímicamente, de forma molecular y evaluó su capacidad de captar NaCl *in vitro*, de las cuales se identificaron seis cepas distintas de bacterias halófilas a partir de muestras de agua recolectadas, todas exhibieron presentar características como: colonias mucosas y cremosas, morfología bacilar, cuatro de ellas fueron clasificadas como Gram positivas, mientras que las dos restantes fueron Gram negativas, la caracterización molecular de estas bacterias halófilas se llevó a cabo mediante el gen ARNr 16S, identificándose especies como: *Virgibacillus siamensis*, *Halobacillus sp.*, *Halobacillus hunanensis* y *Bacillus halophilus* en el caso de las bacterias Gram positivas, en cuanto a las bacterias Gram negativas, se identificaron *Salinicola zeshunii* y *Kushneria sp.*

Romoacca (2018), aisló bacterias halófilas y evaluó la capacidad enzimática de las bacterias halófilas aisladas de 3 zonas salinas (Maras, Huanoquite y Acos), aisló utilizando el medio de cultivo (*Sea Water*) enriquecido con NaCl a concentraciones de 5%, 10%, 15%, 20% y 33%, obteniendo 35 cepas bacterianas en el cual se determinó sus características morfológicas, bacilos cortos y largos, cocobacilos, diplococos, mediante la tinción de Gram, 31 cepas Gram negativas y 4 cepas Gram positivas. Seguidamente se determinó la identificación mediante el análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S, resultando identificar 5 géneros: *Halomonas* con un total de 6 especies, y 1 especie de los géneros: *Salinivibrio*, *Chromohalobacter*, *Halobacillus* y *Ralstonia*. Así mismo se evaluó la capacidad enzimática de proteasas, lipasas y amilasas del cual las cepas aisladas presentan actividad enzimática.

Castelán *et al.*, (2019), caracterizó dos ambientes en los andes del Perú, Maras y Acos de la región de Cusco, estudió la diversidad de comunidad de microorganismos, por medio de estudio metagenómico y *shotgun* se obtuvieron una diversidad y abundancia bacteriana de los filos: Proteobacteria, Bacterioidetes y Actinobacteria, seguida de arqueas de los filos: Euryarcheota, Thaumarchaeota y Crenarchaeota, así como también obtuvieron genomas virales como: *Enterobacteria lambda-like phage* y *Halomonas elongata.like phage* y 27 nuevos genomas virales halófilos parciales.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Hábitats extremos

Existen diversos tipos de ambientes extremos que albergan comunidades microbianas especializadas, entre estos, se encuentran lugares con bajas temperaturas, como el hielo polar, las elevadas cordilleras, los lagos en la Antártida y el lecho marino. Por otro lado, también hay entornos que presentan elevadas temperaturas, tales como los desiertos, lechos volcánicos, aguas termales y fumarolas, tanto en tierra como en el mar. Estas áreas extremas ofrecen condiciones particulares que favorecen la existencia de diversas comunidades microbianas (Burgess *et al.*, 2017).

En 1969, Brock clasificó los entornos hipersalinos dentro de los hábitats extremos debido a sus condiciones fisicoquímicas inusuales y extremas (Ward & Brock, 1978). Los ambientes salinos, tienden a componerse de concentraciones altas de sales que es muy diferente a el agua de mar, consistiendo estas en una disolución de depósito de minerales de origen continental, esta composición varía según la geografía del área, aunque en muchos de estos ambientes se observa que predominan sales como K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^+ , manteniendo un pH básico, generalmente igual o mayor a diez. Ejemplos comunes de estos entornos extremos incluyen las salinas y los lagos salados, como el Mar Muerto, situado en Israel, Jordania y Palestina, así como los lagos alcalinos en el Gran Valle del Rift Africano en Kenia. La composición iónica de estos ambientes varía según las condiciones topográficas, geológicas y climáticas a las que están expuestos (Oren, 2016). Como afirma (Madigan *et al.*, 2019) los ambientes salinos son escasos y la mayoría se encuentra en regiones secas y cálidas del planeta. Por otro lado, Moreno *et al.*, (2009) dan a conocer desde el punto de vista del origen de las grandes masas salinas, pueden estar clasificados en Atalasalino y Talasalino.

- Atalasalino: aquellos ambientes donde se originan por la evaporación del interior de las aguas superficiales continentales.
- Talasalino: se originan por la evaporación de agua de mar. (Moreno *et al.*, 2009).

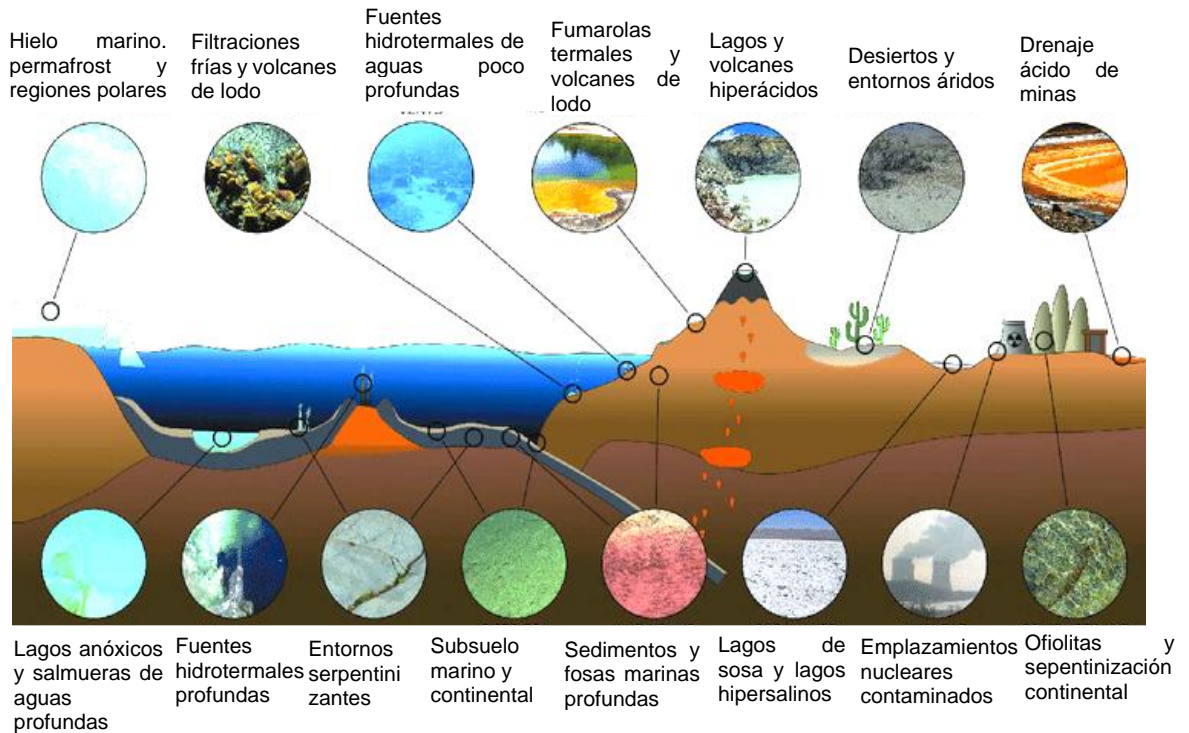


Figura 1. Representación de la corteza terrestre que muestra la diversidad de ambientes extremos y su ubicación aproximada. Adaptada de (Merino *et al.*, 2019).

2.2.2. Microorganismos de ambientes extremos

Los microorganismos que existen en diversos nichos ambientales extremos han sido clasificados como termófilos, psicrófilos, piezófilos, xerófilos, acidófilos, alcalófilos y halófilos. La capacidad de estas formas de vida para prosperar en entornos desafiantes ha despertado el interés de la comunidad científica (Abaramak *et al.*, 2020). Estos microorganismos extremófilos necesitan condiciones extremas en términos de factores físicos y sustancias químicas, que serían perjudiciales para la mayoría de los organismos. Estos valores pueden abarcar desde temperaturas por debajo de 10°C y superiores a 50°C, hasta presiones extremas superiores a 1 atm, pH por debajo de 5,0 y por encima de 8,0, o concentraciones salinas que superan los 30 g/L. Aunque la mayoría de los extremófilos identificados pertenecen al dominio Archaea, recientemente se han identificado diversos extremófilos dentro del dominio Bacteria (Van den Burg,

2003). La diversidad y capacidad de adaptación de estos microorganismos a condiciones extremas se refleja en su habilidad para colonizar diferentes ambientes (Stetter, 1999). Esto nos da a conocer la verosimilitud, tendencia de adaptación molecular y fisiológica mediante el desarrollo de diferentes enfoques para prosperar en condiciones extremas de salinidad, temperatura, pH y la baja disponibilidad de nutrientes utilizando su capacidad para producir diversas vías metabólicas en su entorno competitivo (Edbeib *et al.*, 2016).

2.2.3 Microorganismos halófilas

Los microorganismos halófilos son organismos que requieren la presencia de cloruro sódico (NaCl) para su crecimiento y desarrollo del cual son dependientes a lo que se encuentra en el medio (Kanekar *et al.*, 2012), estos organismos se encuentran distribuidos en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eucaria, así mismo están en una amplia gama de ambientes hipersalinos desde lagos salados, salinas costeras, salmueras, tapetes marinos y suelos salinos (Amoozegar *et al.*, 2019).

Se muestra el árbol universal de la vida el Dominio Bacteria es el que alberga mayor cantidad de géneros de microorganismos halófilos, seguido por los Arqueales, la caracterización de estos organismos sigue en constante expansión, lo que implica que su clasificación podría sufrir cambios en los próximos años, para aquello se han basado en el análisis comparativo de secuencias del gen ribosomal 16S, ha sido una herramienta clave para trazar la filogenia de los microorganismos (Figura 2), revelando la existencia de grupos que incluyen exclusivamente a procariotas halófilos. Este enfoque permite identificar relaciones evolutivas específicas y establecer vínculos filogenéticos dentro de un contexto taxonómico más amplio. (Hug *et al.*, 2016).

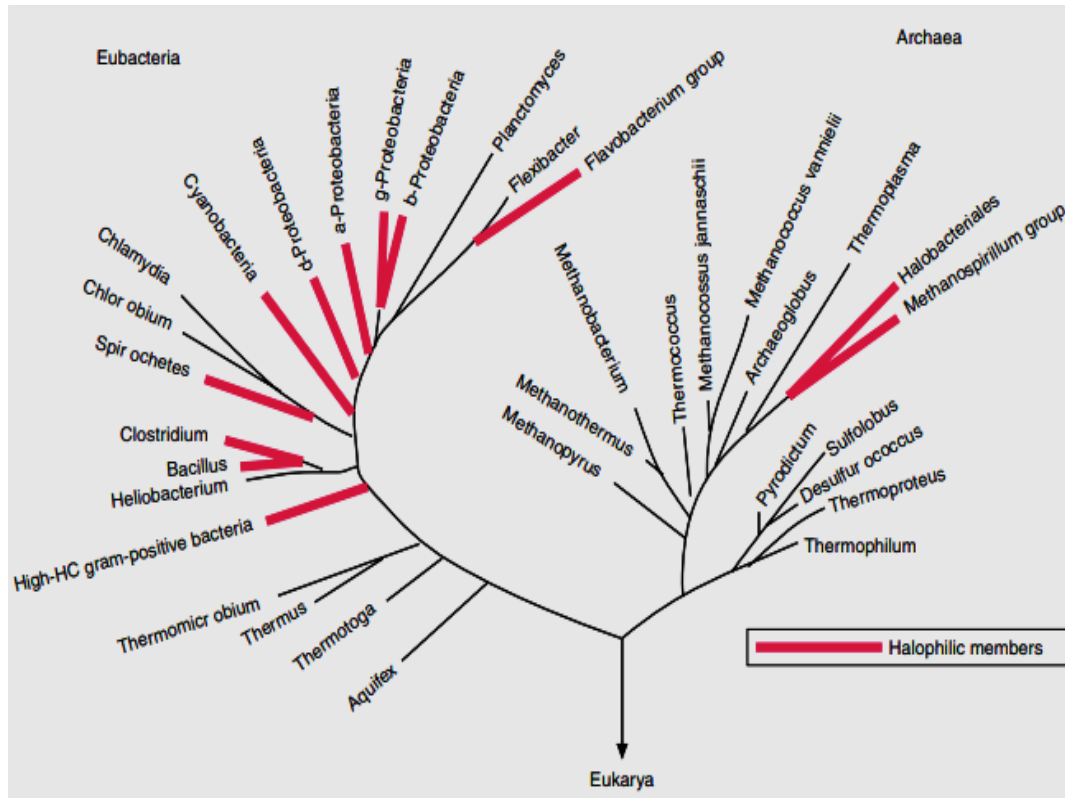


Figura 2. Árbol filogenético de Archaea y Bacterias halófilas, basado en comparaciones de secuenciación del gen ARNr 16S. Las líneas en rosa indican que tiene miembros halófilos, según (Ventosa *et al.*, 1998), adaptada por (Warren, 2016).

2.2.4 Bacterias halófilas

La denominación "halófilo" proviene del griego, donde "halo" significa "sal" y "filo" significa "amante de". Las bacterias halófilas son abundantes en entornos como lagos salados, suelos con altas concentraciones de sal y productos alimenticios salados. Estas bacterias están adaptadas a niveles elevados de sal y a la considerable presión osmótica de su entorno (Kanekar *et al.*, 2012). Según Oren (2009), las bacterias halófilas emplean dos estrategias para mantener el equilibrio osmótico entre su citoplasma y su entorno. En 1993, se propuso una clasificación de los halófilos en cinco grupos según su tolerancia a la sal. Las halófilos tienen diferentes características dependiendo de la concentración de cloruro de sodio que pueden tolerar. Según la clasificación se dividen en bacterias halófilas débiles, moderadas y extremas. (Kushner 1992).

Tabla 1. Clasificación de los organismos halófilos en base a la concentración óptima de NaCl para su crecimiento.

Categoría	Descripción	Ejemplo
No halófilos	Crecimiento óptimo: NaCl inferior a 0,2 M (1% p/v)	La mayoría de bacterias de agua fresca
Halófilos débiles	Crecimiento óptimo: NaCl > 0,2-0,5 M (>1-3% p/v)	Generalmente bacterias marinas
Halófilos moderados	Crecimiento óptimo: NaCl > 0,5-2,5 M (>3-15% p/v)	<i>Salinivibrio costicola</i>
Halófilos extremos	Crecimiento óptimo: NaCl > 2,5-5,2 M (>15-32% p/v)	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halotolerantes	Crecen en presencia y ausencia de altas concentraciones de NaCl	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Adaptada de (Kushner, 1992)

Las bacterias halófilas débiles, también conocidas como "bacterias marinas", se aíslan principalmente de suelos marinos y marismas. Estas bacterias crecen en bajas concentraciones de sal, entre 1% y 3% (p/v). Entre los microorganismos de este grupo se encuentran *Marinomonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, y *Pseudomonas* (Mata, 2006).

Por otro lado, las bacterias halófilas moderadas y extremas se ven afectadas no solo por la concentración de sal, sino también por la temperatura de crecimiento y la naturaleza de los nutrientes disponibles (Fourçans *et al.*, 2006; Amoozegar *et al.*, 2016). Las bacterias moderadamente halófilas son dominantes en ambientes hipersalinos, constituyendo la mayor parte de la población microbiana total y desempeñando un papel ecológico importante. Estas bacterias crecen en concentraciones de sal entre 3% y 15% (p/v) e incluyen una gran variedad de especies bacterianas Gram positivas y halófilos moderados, como Proteobacteria (*Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Rhodospirillum*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Rhodovibrio*, *Halovibrio* y *Alcaligenes*), Firmicutes (*Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Gracilibacillus*, *Clostridium*, *Pontibacillus*, *Sporosarcina* y *Planococcus*), Actinobacteria (*Kocuria*, *Streptomyces*, *Rubrobacter*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Streptomonospora*, *Actinopolyspora* y *Nesterenkonia*) y Bacteroidetes (*Flavobacterium*, *Salinibacter* y *Polaribacter*) (Stan-Lotter & Fendrihan, 2013).

Finalmente, las bacterias halófilas extremas crecen en concentraciones de sal superiores al 15% hasta 32% (p/v), aunque su crecimiento es generalmente lento (Stan-Lotter & Fendrihan, 2013). Muchas de estas bacterias contienen una variedad de carotenoides, que ayudan a la estabilización de la membrana en especies como *Thermus thermophilus* y *Rubrobacter radiotolerans*, y permiten tolerar el alto estrés osmótico en *Halobacterium spp.* (Amoozegar *et al.*, 2016; Sasaki *et al.*, 2012). La presencia de carotenoides en muchas bacterias Gram positivas aisladas de ambientes hipersalinos, como lagos salados, minas de sal y marismas, sugiere su papel crucial en la osmoregulación de estas bacterias (Mukhtar *et al.*, 2020).

2.2.5 Osmorregulación de bacterias halófilas

El agua es uno de los principales elementos responsables de la vida. Los organismos vivos tienen la capacidad de adaptarse a los cambios del entorno externo, como la presión osmótica, para sobrevivir en condiciones adversas. En entornos hipersalinos, el agua suele salir de las células microbianas a lo largo del gradiente osmótico, lo que lleva a los halófilos a desarrollar diferentes mecanismos de osmoadaptación para sobrevivir (Youssef *et al.*, 2014; Mukhtar *et al.*, 2018).

Las bacterias halófilas utilizan generalmente dos mecanismos de adaptación a los ambientes hipersalinos:

1. La primera estrategia implica la acumulación de concentraciones molares de KCl. Esta estrategia requiere la adaptación de la maquinaria enzimática intracelular, ya que las proteínas deben mantener su conformación y actividad adecuadas a concentraciones de sal casi saturantes, es más común halófilas extremas aerobias y algunas bacterias halófilas anaerobias (Rekadwad & Khobragade, 2017).
2. La segunda estrategia es excluir la sal del citoplasma y sintetizar y/o acumular solutos orgánicos "compatibles" de bajo peso molecular, altamente solubles en agua y cuyas propiedades fisicoquímicas lo hacen compatibles con la fisiología y bioquímica celular que no interfieran con la actividad enzimática (Widderich *et al.*, 2014), Algunos de estos son la glicina betaína, la ectoína, la hidroxiectoína, carbohidratos como la trehalosa y la sacarosa, aminoácidos como prolina, glutamina, polioles como glicerol y arabitol y muchos otros (Edbeib *et al.*, 2016).

Estos mecanismos de osmorregulación son utilizados por las bacterias halófilas, como *Halobacillus spp.* La mayoría de las bacterias halófilas tienen sistemas reguladores de dos componentes, que incluyen proteínas osmosensoras y osmorreguladoras para reconocer el equilibrio osmótico. Las proteínas reguladoras se unen al ADN y regulan las expresiones genéticas, mientras que las proteínas sensoras (histidina quinasa) detectan las señales. Este sistema controla los cambios de presión osmótica a ambos lados de la membrana celular (Foo *et al.*, 2015).

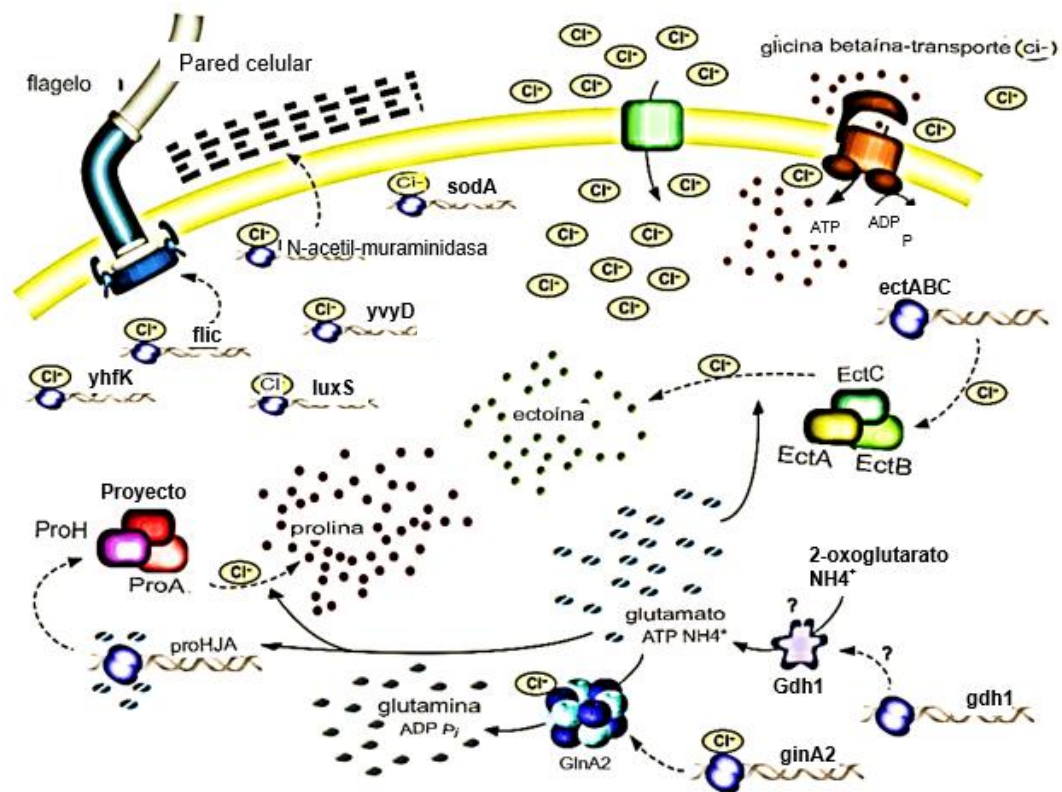


Figura 3. Visión general de la osmorregulación en bacterias y arqueas halófilas, Adaptada por (Mukhtar *et al.*, 2020).

2.2.6 Estrategias de solutos compatibles

La mayoría de las bacterias halófilas equilibran su citoplasma con la elevada concentración salinas del medio mediante la acumulación de osmolitos (solutos compatibles), estos solutos son excretados en el citoplasma por la propia célula bacteriana o pueden tomarse del medio, se puede clasificar en dos grupos principales: solutos orgánicos (trehalosa, ectoína, betaína y prolina), y solutos inorgánicos (K^+ , Mg^{2+} y Na^+) (Nath, 2016; Anbu & Hur, 2014), la mayoría de las bacterias carecen de sistemas intracelulares de transporte activo de agua para

hacer frente al estrés osmótico externo, por lo tanto, equilibran su medio interno mediante el transporte o la síntesis de solutos orgánicos sin afectar la función metabólica de las células. Estos solutos compatibles pueden clasificarse según su naturaleza química en tres categorías: solutos aniónicos, zwitteriónicos y no cargados (Petrovic *et al.*, 2002; Moghaddam *et al.*, 2016).

2.2.7 Estrategia de salinización (*Salt – in*)

Esta estrategia se basa en la utilización de iones inorgánicos como K^+ , Mg^{2+} y Na^+ para contrarrestar el estrés osmótico generado por altas concentraciones de sal en el entorno. La maquinaria celular está adaptada a estas condiciones salinas extremas (Figura 3) (DasSarma & DasSarma, 2015; Karan *et al.*, 2012), ajustando la composición y concentración de iones inorgánicos tanto entre diferentes especies como dentro de la misma especie, mediante mecanismos de síntesis y transporte. En particular, el KCl desempeña un papel clave en la regulación del equilibrio salino intracelular (Srivastava & Kowshik, 2013; Fernández *et al.*, 2014).. Las enzimas y proteínas celulares han desarrollado adaptaciones estructurales, caracterizadas por un alto contenido de aminoácidos ácidos y una menor proporción de aminoácidos hidrofóbicos, lo que les permite mantener la funcionalidad en ambientes con alta salinidad (Oren, 2015; Kumar *et al.*, 2016).

2.2.8 Actividades biológicas de las bacterias halófilas

Las bacterias halófilas constituyen un grupo homogéneo de microorganismos con características biotecnológicas e industriales específicas (Ventosa *et al.*, 1998). Estas bacterias tienen la capacidad de producir polímeros, pigmentos, antimicrobianos, solutos compatibles y enzimas hidrolíticas que mantienen su actividad en condiciones adversas de temperatura, pH, fuerza iónica y salinidad (Margesin & Schinner, 2001). A pesar de que su uso biológico aún no se comprende completamente, los halófilos se han convertido en una alternativa cada vez más valiosa, segura y eficiente en diversos campos como la biomedicina.

Los halófilos son utilizados en acuicultura, control de bacterias patógenas, germinación de semillas, controladores biológicos, y en la biorremediación de ambientes salinos contaminados y aguas residuales, la farmacología, la biomedicina y la astrobiología (Sekar & Kim, 2020). En la biorremediación, estos microorganismos son efectivos para mitigar la contaminación por metales pesados como el mercurio, arsénico, cadmio, y compuestos organofosforados, contribuyendo además a los ciclos biogeoquímicos (Le Borgne *et al.*, 2008). Un

ejemplo notable es el halófilo *Marinobacter sp.*, que degrada el tolueno, benceno, etilbenceno y xilenos, convirtiendo el benceno en CO₂ (Berlendis *et al.*, 2010). Los halófilos tienen un profundo impacto en los seres humanos y el medio ambiente, extendiendo su influencia más allá de sus hábitats extremos (Sekar & Kim, 2020).

2.2.9 Aislamiento de microorganismos halófilos

Citando a Ramírez *et al.*, (2006), indican que el aislamiento de microorganismos halófilos requiere medios de cultivo con concentraciones adecuadas de sal. Los medios varían según el tipo de halófilo que se desea aislar. Por ejemplo, en los medios para halófilos extremos o tolerantes a la sal, las eubacterias pueden interferir en el aislamiento de halófilos moderados. Cada grupo de halófilos tiene necesidades nutricionales particulares, como la adición de vitaminas y minerales. El medio halófilo específico (SH), con un bajo contenido de Mg²⁺, es adecuado para halófilos moderados, pero no es propicio para el crecimiento de halófilos extremos, que requieren mayor concentración de Mg²⁺ y K⁺. Los microorganismos también necesitan nutrientes como biotina, tiamina y riboflavina, esenciales para su metabolismo.

Además, en algunos casos se agregan fuentes de nitrógeno como peptona o extracto de levadura para estimular el crecimiento. Por otro lado, algunos microorganismos halófilos, como los del género *Halobacillus*, prosperan en medios con suplementos de calcio (Ca²⁺) y hierro (Fe²⁺), los cuales facilitan la formación de enzimas esenciales. Un criterio clave es ajustar el pH a 7 para asegurar la proliferación óptima de los halófilos.

A continuación, se muestran las composiciones de dos medios para el aislamiento de microorganismos halófilos.

- Medio salino (HS) (g/l): NaCl (178), KCl, MgSO₄ 7H₂O (1), CaCl₂ 2H₂O (0,36), NaBr (0,23) NaHCO₃ (0,06), FeCl₃, extracto de levadura, glucosa, agar y agua destilación (1000 ml).
- Sea Water Solution (solución madre) (g/l): NaCl (240), MgCl₂6H₂O (30), MgSO₄7H₂O, KCl (7), NaBr (0,8), NaHCO₃ (0,2), añadir el doble de agua destilada cerca del volumen final requerido y disolver completamente la sal finalmente, agregue lentamente 5 ml de CaCl₂2H₂O 1M estéril ajuste el pH a 7,5 (Delgado *et al.*, 2006).

2.2.10 Condiciones de cultivo para bacterias halófilas

Las bacterias halófilas necesitan una serie de factores que proporcionen el medio óptimo para su aislamiento y crecimiento. Estos factores incluyen la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH y la disponibilidad de oxígeno. Un medio de cultivo esencial debe ofrecer los nutrientes en proporciones adecuadas para favorecer el crecimiento y la producción de metabolitos por los microorganismos. La mayoría de los estudios con bacterias halófilas se han realizado en el marco de proyectos de investigación que tienen como objetivo el aislamiento y crecimiento de estas bacterias mediante técnicas dependientes del cultivo. Hay varios tipos de medios de cultivo específicos (Schneegurt, 2012), y es importante señalar que el NaCl es una de las sales en mayor proporción en estos medios (Newman & Cragg, 2020). Además del NaCl, se necesitan concentraciones más bajas de magnesio, potasio, sulfuros, fosfatos, nitrógeno y sales traza para mantener el equilibrio osmótico en medios salinos (Schneegurt, 2012).

2.2.11 Características de bacterias halófilas

Estos microorganismos pueden exhibir diversas morfologías, como cocos, bacilos y formas poco convencionales. En su mayoría, son anaerobios quimioorganótrofos que utilizan la luz para la producción de energía. Su desarrollo óptimo se produce en entornos con pH alcalinos y neutros. Algunas especies presentan bacteriorrodopsina, mientras que otras muestran coloración debido a los carotenoides que producen. Además, dentro de este grupo se encuentran tanto especies Gram positivas como Gram negativas (Abbes *et al.*, 2013).

2.2.12 Caracterización fenotípica

La tipificación fenotípica de las bacterias consiste inicialmente en la descripción de sus caracteres microscópicos y macroscópicos de las cepas aisladas, considerando el medio de cultivo y los caracteres morfológicos (Pluzhnik *et al.*, 2014).

La microscopía en fresco y la técnica de tinción permiten observar la forma, el grupo, la estructura y el tamaño de las células. La tinción más empleada para su detección es la tinción Gram (Pluzhnik *et al.*, 2014). De esta manera, se pueden diferenciar las características microbianas, tales como:

- **Forma:** cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, bacilos curvos, etc.
- **Tamaño:** cortos, largos, etc.

- **Disposición:** parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.

Para el estudio macroscópico, se realizará una observación de sus características culturales en medio sólido, determinando aspectos como los bordes (irregular, rugoso o liso), la forma (puntiaguda o plana), la consistencia (mucosa, viscosa o seca), la elevación (cóncava o convexa), el color y el tamaño de la colonia (Garzón, 2016).

2.2.13 Extracción de ADN

En la mayoría de los casos, el primer paso en la ejecución de una técnica molecular consiste en la extracción del ADN de los microorganismos estudiados. La extracción del ADN es muy esencial, ya que el éxito de los siguientes pasos de amplificación y secuenciación depende en gran medida de la cantidad y representatividad del ADN que se haya obtenido al inicio del proceso. En caso de muestras procedentes de ambientes salinos, el procedimiento de extracción puede afrontar problemas como pH bajo, pH alto y altas concentraciones de metales pesados, entre otros. Por lo tanto, se deben saber los principios básicos del proceso, los posibles problemas que se pueden encontrar y cómo resolverlos (Martin-Laurent *et al.*, 2001).

2.2.14 Cuantificación del ADN

La cuantificación del índice de pureza del material genético purificado se realiza utilizando un espectrofotómetro y un volumen de muestra de 1 μ l. Según la ecuación de Beer-Lambert, la concentración molar de una muestra se obtiene dividiendo la absorbancia medida de una solución de muestra por su coeficiente de extinción molar. En otras palabras, la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida por las moléculas disueltas (Mayerhöfer *et al.*, 2020). Por otro lado. Teniendo en cuenta a (Cornejo *et al.*, 2014), mencionan que una característica del ADN es su capacidad de absorber luz ultravioleta (UV) a 260 nm, lo que permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Para determinar la interferencia de contaminantes, se calcula un "cociente". Para estimar la pureza del ADN, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} . Los cocientes respectivos del ADN puro son aproximadamente 1,8 y 2,0; un valor entre 1,6 y 1,8 se considera aceptable. Proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de los ácidos nucleicos es la proporción 260/230. Los valores aceptados de pureza se encuentran en el rango de 2,0 a 2,2; si la relación es menor, indica la presencia

de contaminantes como carbohidratos, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias.

2.2.15 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional es una técnica fundamental en la biología molecular, diseñada para amplificar selectivamente una región específica de ADN, permitiendo la obtención de millones de copias de esa secuencia particular a partir de una pequeña cantidad inicial de material genético. Desarrollada por Kary Mullis en 1986, la PCR ha revolucionado múltiples campos científicos, desde la investigación genética hasta la medicina forense y el diagnóstico de enfermedades infecciosas y estudios de diversidad microbiana (Bartlett & Stirling, 2003). Mullis desarrolló su técnica basándose en el mecanismo natural de replicación del ADN, en el cual el ADN polimerasa juega un papel crucial. Esta enzima sintetiza nuevas hebras de ADN en dirección 5' a 3', utilizando una hebra sencilla como molde. Para iniciar la síntesis, se requiere una región de doble cadena, creada mediante cebadores (*primers*), que se diseñan para ser complementarios a las regiones 3' de la secuencia de ADN objetivo. Estos cebadores permiten la amplificación específica del fragmento deseado durante la PCR (Mullis & Faloona, 1987; Hassan & Khan, 2024).

El proceso de duplicación del ADN bicatenario puede repetirse cíclicamente, utilizando como molde las moléculas generadas en la replicación anterior, lo que resulta en un incremento en la cantidad de ADN. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se basa en la repetición de un ciclo que consta de tres etapas.

1. **Desnaturalización:** en esta fase, las dos cadenas de ADN se separan, siendo común realizar esta etapa a una temperatura de 94-95 °C.
2. **Hibridación de los cebadores:** durante esta etapa, los cebadores se unen a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello, la temperatura se reduce a un rango de 40 - 68 °C durante 20 a 40 segundos, lo que permite el alineamiento adecuado. La polimerasa luego se une al híbrido formado por la cadena molde y el cebador, comenzando así la síntesis de ADN. Los cebadores establecen los límites de la región que será amplificada
3. **Extensión o elongación de la cadena:** durante esta fase, la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde, añadiendo los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) complementarios en la

dirección de 5' a 3'. Esto ocurre mediante la unión del grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del extremo de la hebra de ADN en crecimiento, lo que permite que esta se extienda. La temperatura óptima para la Taq polimerasa se encuentra entre 75 y 95 °C (Mullis & Faloona, 1987; Hassan & Khan, 2024).

Además, hay una etapa final de extensión que se realiza a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos después del último ciclo de PCR. Esta fase garantiza que cualquier ADN de cadena simple que haya quedado sea completamente amplificado (Bartlett & Stirling, 2003).

2.2.16 Primers

Kumar y Chordia, (2015) explican que los *primers*, también conocidos como cebadores u oligos, son secuencias cortas de nucleótidos que sirven como punto de partida para la síntesis de una nueva cadena de ADN, para la amplificación de genes específicos. Estos oligos deben estar alineados y no muy distanciados entre sí, ya que delimitan la región del ADN que se desea amplificar. En otras palabras, corresponden a los nucleótidos que marcan los extremos de la secuencia que se pretende replicar. El diseño de los *primers* es un aspecto crucial en la PCR, ya que un diseño deficiente puede resultar en la amplificación de fragmentos de ADN no deseados (amplificación inespecífica).

2.2.17 El gen ribosomal ARN 16S

La evaluación de la diversidad microbiana y la identificación de especies bacterianas, así como su clasificación en grupos por características de secuencia compartidas, es factible gracias al alto nivel de conservación del gen 16S ARNr en los dominios Bacteria y Archaea. Las secuencias comparadas de ARNr 16S han facilitado en gran medida la clasificación de las bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, y la determinación de sus parentescos biológicos. Esto permite establecer vínculos taxonómicos entre especies con pocas interrelaciones en su ADN. Inicialmente, se comenzaron los estudios de secuenciación del ARNr 16S, y más adelante, estos estudios se ampliaron al ARNr 23S (Uzman, 2001).

2.2.18 Regiones del Gen Ribosomal 16S

El ARNr 16S es un polirribonucleótido que se encuentra en los ribosomas de los procariotas en la región 30S. Tiene una longitud de aproximadamente 1500

nucleótidos, este ARNr es codificado por el ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Este gen está conformado por 9 regiones variables, las cuales están flanqueadas por regiones conservadas. Las regiones conservadas son normalmente utilizadas para realizar estudios *in silico* e *in situ* utilizando técnicas moleculares como la PCR (Van de Peer *et al.*, 1999). Como se muestra en la (Figura 4) las regiones en celestes, representan secuencias que tienen un alto grado de conservación en todos los microorganismos. Estos sitios son ideales para el uso de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de manera que todos los genes 16S en una muestra son amplificados. En cambio, las regiones verdes, corresponden a secuencias con menor grado de similitud y son específicas a nivel de especie, éstas permiten a los científicos ver qué especies están presentes en una comunidad (Teach the Microbiome, 2017).

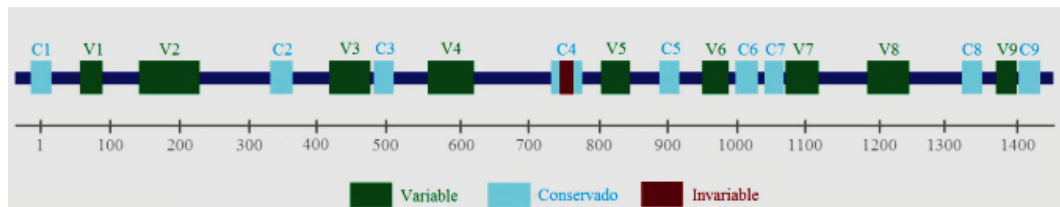


Figura 4. Representación esquemática del gen de 16S ARNr, indicando las regiones variables (V1-V9), y conservadas (C1-C9). Citado de (Altarejos, 2015).

Metodológicamente, el ARNr 16S se secuenciar mediante una adaptación de la técnica dideoxinucleotídica de Sanger de 1977. En esta técnica, los cebadores conocidos para regiones conservadas del ARNr 16S se elongan utilizando una transcriptasa inversa. Luego, las hebras pequeñas de ADN resultantes se amplifican mediante PCR o clonación y se secuencian automáticamente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Kress & Erickson, 2012).

Como afirma Yarza *et al.*, (2014), entre las metodologías más empleadas y extendidas para la obtención e identificación de microorganismos se encuentra la secuenciación del gen que codifica la subunidad menor del ARNr 16S, cuando dos cepas presentan alrededor del 98,7% de similitud de secuencia en el ARNr 16S respecto a su vecino más cercano, se puede señalar que no pertenecen a las mismas especies. Por el contrario, si presentan una similitud superior al 98,7%, se deben utilizar metodologías alternativas para determinar con mayor precisión su clasificación taxonómica. Sin embargo, en las bacterias halófilas, ese criterio

puede verse alterado en función del género, para afirmar el descubrimiento de una nueva especie de bacterias halófilas, es conveniente considerar las peculiaridades fenotípicas, quimiotaxonómicas y filogenéticas para aclarar la similitud entre las cepas.

2.2.19 Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para separar moléculas biológicas, como ADN, proteínas o ARN, basándose en su tamaño. En este proceso, las biomoléculas se someten a un campo eléctrico a través de una matriz de gel, que puede ser de agarosa o acrilamida. Estas matrices forman una red con poros a través de los cuales las moléculas biológicas cargadas negativamente migran hacia el polo positivo, debido a la carga negativa de las moléculas de ADN, originada por la presencia de grupos fosfatos (P-). Durante la electroforesis, los fragmentos más pequeños se moverán más rápido y llegarán a la parte inferior del gel, mientras que los fragmentos más grandes se quedarán en la parte superior. Así, los fragmentos de tamaños similares se agruparán y formarán bandas visibles en el gel (Cornejo *et al.*, 2014; Slater *et al.*, 2002). Para llevar a cabo esta técnica, es fundamental contar con un transiluminador de luz ultravioleta, una cámara de electroforesis, una fuente de poder y un tampón de electroforesis con un pH entre 8 y 8,3. Este tampón debe contener los iones necesarios para que fluya la corriente y el ADN pueda migrar (Stellwagen, 2009). En cuanto a la preparación de geles de agarosa, es esencial considerar el tamaño de los fragmentos que se espera obtener y ajustar la concentración de agarosa en consecuencia (Birren & Lai, 2012). Esto permite obtener una matriz de gel con poros de tamaño adecuado y una mejor resolución de las bandas. Sin embargo, si no se conoce el tamaño de los fragmentos, se puede empezar con agarosa al 1%.

2.2.20 Secuenciación Sanger

La secuenciación de ADN es un método que permite determinar el orden de las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina) que componen un gen o un genoma completo (Mardis, 2008). Esta técnica se ha convertido en una herramienta fundamental en el análisis de muestras provenientes de microorganismos, animales, plantas y otros organismos. Su utilidad radica en que proporciona información detallada para identificar especies ambientales que no pueden ser cultivadas en microbiología, además de tener aplicaciones en diversas áreas de la biología y la salud (Shendure & Ji, 2008).

En este contexto, la metodología de secuenciación Sanger, desarrollada en 1977 por Frederick Sanger, marcó un avance significativo en el campo. Este método se basa en el uso de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP), que actúan como análogos fluorescentes de los nucleótidos normales (dNTP), lo que permite interrumpir la síntesis de ADN de manera controlada (Faveri *et al.*, 2015). Gracias al desarrollo de equipos automatizados y herramientas bioinformáticas, es posible determinar la secuencia de un fragmento de ADN mediante un proceso que incluye cuatro reacciones separadas. Estas reacciones requieren una plantilla de ADN, ddNTP fluorescentes y la amplificación mediante PCR para obtener las secuencias objetivo (Kraková *et al.*, 2016).

Posteriormente, las cadenas de ADN resultantes se separan y se analizan con secuenciadores automáticos, generando cromatogramas que representan cada base del ADN con picos de colores específicos. Los datos obtenidos se procesan mediante programas informáticos que ensamblan las secuencias y permiten su análisis detallado, abarcando diversas características (Men *et al.*, 2008). Durante varias décadas, la secuenciación Sanger fue el método predominante en el campo, hasta la introducción de la secuenciación de próxima generación (NGS) a principios de los años 2000, que amplió significativamente las posibilidades y aplicaciones de esta tecnología (Deharvengt *et al.*, 2020).

Actualmente, se dispone de bases de datos como el Ribosomal Database Project, GenBank y el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL). Estas bases de datos albergan cientos de secuencias de ARNr correspondientes a un amplio número de microorganismos. Permiten comparar estadísticamente las secuencias extraídas de un aislado con las ya publicadas, generando dendrogramas que determinan la localización del microorganismo recién identificado. Además, existen numerosos métodos y programas informáticos para reconstruir filogenias a partir de las secuencias extraídas (Kress & Erickson, 2012).

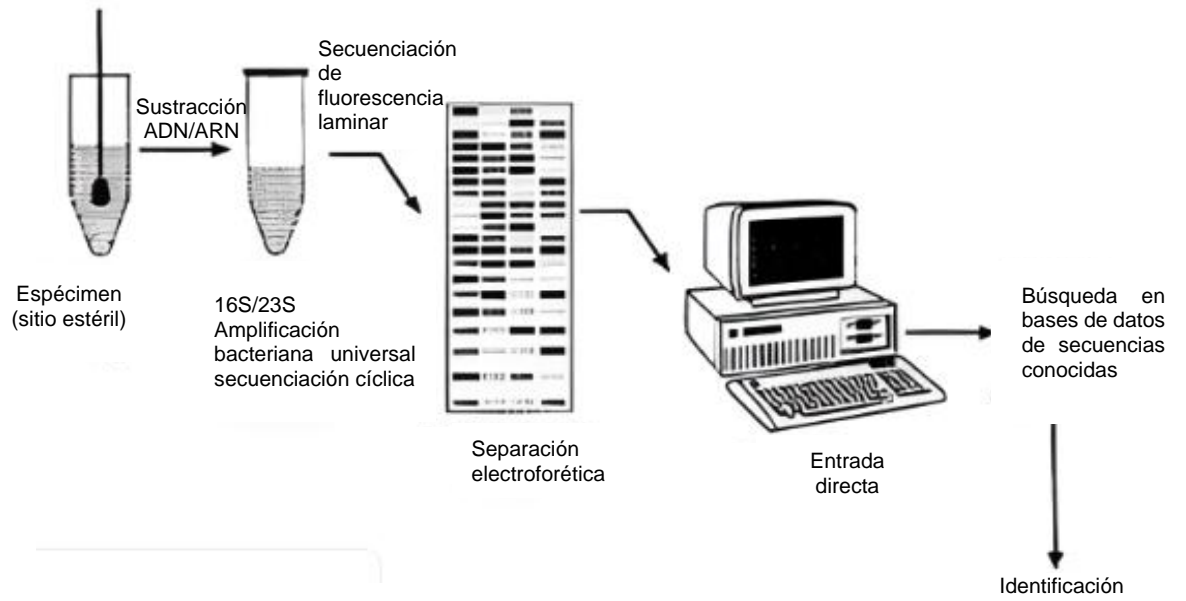


Figura 5. Secuenciación por el método Sanger (Claverie, 2007), adaptada por (Romoacca, 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la zona de estudio

3.1.1. Ubicación política

La zona de estudio tiene la siguiente ubicación política.

Comunidad : Cachipata

Distrito : Hualla

Provincia : Víctor Fajardo

Región : Ayacucho

3.1.2. Ubicación geográfica

El manantial salado de Cachipata, se encuentra ubicada en el distrito de Hualla, provincia de Víctor Fajardo, Ayacucho, siendo las coordenadas geográficas las siguientes, (-13.914207° latitud, -74.068779° longitud) y una altitud de 4285 m.s.n.m.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Unidad de análisis

Muestra de agua del manantial de la zona de selección Cachipata, de la comunidad perteneciente al distrito de Hualla, provincia Víctor Fajardo, región de Ayacucho.

3.2.2. Población

La totalidad de bacterias halófilas filtradas de la fuente acuática salina Cachipata.

3.3 Metodología y recolección de datos

3.3.1 Zona de muestreo

Ambiente acuático salinos está ubicado en lugar denominado Cachipata (Anexo 1), es un manantial que el agua emana del subsuelo. En cuanto, a su descripción

geográfica (-13,914207° latitud, -74,068779° longitud) y una altitud de 4285 m.s.n.m. el cual se encuentra en la zona de vida puna, en su alrededor la vegetación son los pastizales alpinos adaptados a condiciones de alta radiación solar y bajas temperaturas, ubicado en el distrito de Hualla, perteneciente a la provincia de Víctor Fajardo, región de Ayacucho.

3.3.2 Toma de muestra

Con el propósito de favorecer el aislamiento de bacterias halófilas el muestreo se realizó acorde a la metodología que describe (Roohi *et al.*, 2012). Roohi hace estudios de aislamiento de microorganismos halófilos de diversos ecosistemas salinos, en el cual se hallan salineras y lagos.

Primeramente, se desarrolló el muestreo en el mes de abril de 2024 en la zona de estudio "Cachipata" en la Provincia de Víctor Fajardo.

Como primer paso se tomaron 7,5 litros de muestra de agua salada utilizando botellas de plástico de boca ancha, con capacidad de 10 litros, previamente esterilizadas, por consiguiente, en la zona de muestreo se llenaron las botellas con ayuda de una jarra de plástico estériles, del cual se tomó la muestra de 5 - 20 cm de profundidad del borde del ojo de agua y del centro del manantial, finalmente en cada botella se llenó $\frac{3}{4}$ partes de su totalidad (Anexo 2).

3.3.3 Etiquetado, preservación y almacenamiento de la muestra

Para el etiquetado de los recipientes se elaboró un rotuló con los siguientes datos. primeramente, el lugar de muestreo, la fecha y hora de recolección. Posteriormente se trasladó las botellas de plástico hasta el laboratorio de Salud Ambiental de la Dirección Regional de Salud (DIRESA) a donde se procesaron de inmediato, finalmente se llevó para incubar los cultivos a 37°C, al laboratorio de Biología Celular y Molecular, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Escuela Profesional de Biología.



Figura 6. Muestras de agua en botellas.

3.3.4 Medición de salinidad del agua de la zona salina

La medición de salinidad y parámetros físico/químicos del agua de la zona salina se midió *in situ* en caso del pH, con un peachimetro portátil (PH – 009(I)A); no obstante, del punto de muestreo se llevó 1 L de muestra de agua, el cual se envió a procesar en el Laboratorio Agrolab para su posterior análisis fisicoquímico (Anexo 3).

3.3.5 Medio de cultivo para aislamiento de bacterias halófilas

El medio de cultivo se adaptó al método aplicado por Romoacca (2018), para así mantener las condiciones químicas apropiadas a la zona de estudio, en este caso el medio de cultivo para estas bacterias es el medio *Sea Water* al cual se adicionó NaCl, en concentraciones de 10% y 15 % respectivamente. El medio de cultivo se mantiene salado para su desarrollo óptimo de bacterias halófilas por las diferentes sales que presenta.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo.

Compuesto	cantidad
NaCl	10%
	15%
Cloruro de magnesio hexahidratado	5,0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	5,83 g
Cloruro de potasio	1,17 g

Extracto de levadura	0,5%
Bicarbonato de sodio	0,03 g
Cloruro de calcio hidratado	0,083 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	8

Fuente: Adaptada de Romoacca (2018)

3.3.6 Método de siembra y aislamiento

Para el aislamiento de las bacterias halófilas se desarrolló el método de filtración de membrana en el laboratorio de Salud Ambiental de la Diresa, y el método adaptado de (Selvarajan *et al.*, 2017) que hace el aislamiento de bacterias halófilas. Se detalla los pasos bajo el siguiente orden:

1. Se filtró 1 L de la muestra de agua en un filtro de membrana de nitrocelulosa con una porosidad de 0,22 μm , el cual se adicionó a la rampa de filtración.
2. Se sembró los filtros de membrana en agar SW a concentraciones de (10% y 15%) de NaCl por triplicado, a un tiempo de 24 a 168 horas y se incubaron a una temperatura de 37°C, cada placa se rotuló como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 3. Rótulo de las muestras cultivadas

2MF(15)(2) [7]
2: Número de muestra.
M: Muestra.
F: Inicial del lugar de muestreo.
(15): Concentración de sal.
(2): Repetición.
[7]: Número de repetición en tubos.

Fuente: Elaboración propia, los códigos siguen el patrón establecido en la tabla y su significancia para los resultados obtenidos.

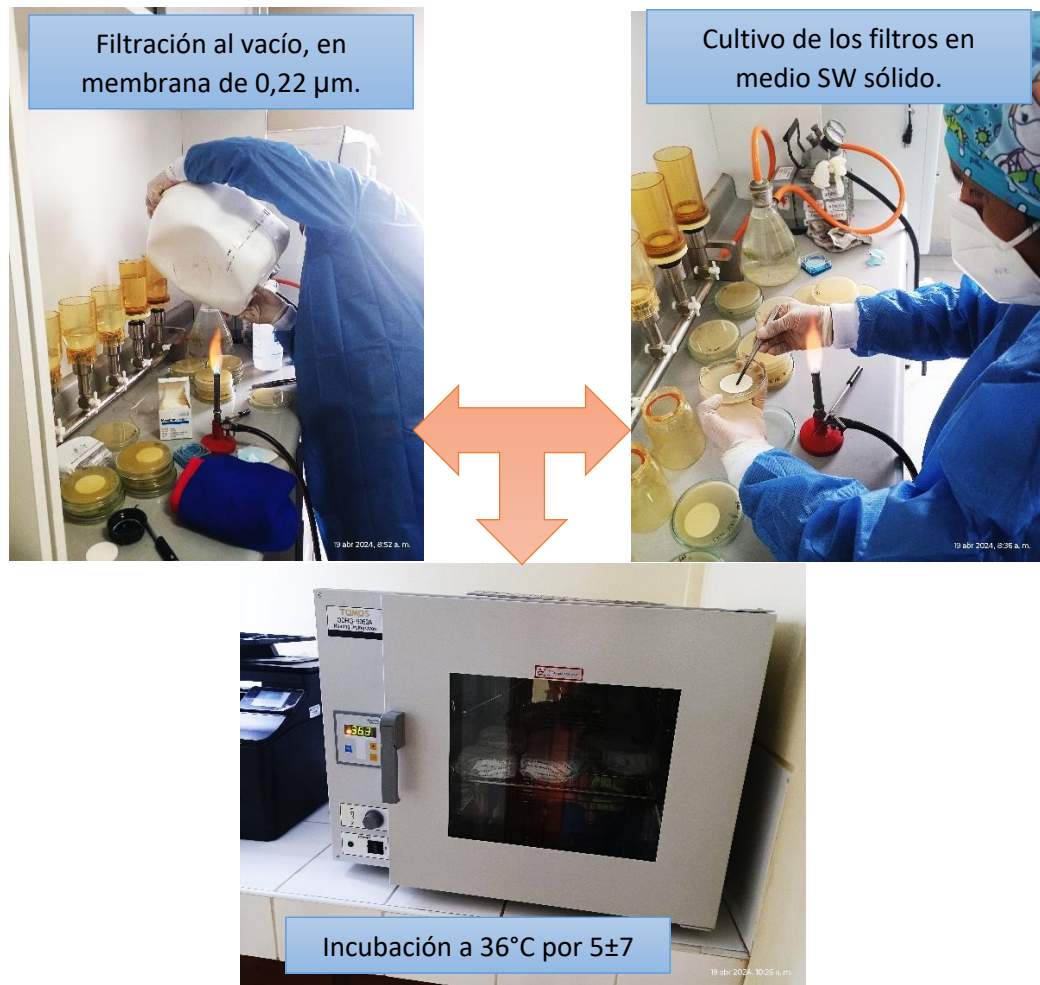


Figura 7. Procedimiento de filtración, siembra de las muestras, e incubación.

3. Los cultivos con crecimiento positivos se resembraron en tubos con 1 ml de medio SW líquido a concentraciones correspondientes de NaCl, con ayuda de agujas de siembra, para ello se escogieron un aproximado de 6-16 colonias de cada filtro, seguidamente se incubaron por 24 a 336 horas en una temperatura de 37°C.

El grado de crecimiento de las bacterias en el medio de cultivo SW líquido se definió por lo siguiente: crecimiento negativo (-); crecimiento tenue (+); muy buen crecimiento (++) (+++).

4. Los tubos con un muy buen crecimiento (++) (+++), se cultivaron por agotamiento en superficie, en placas con medio de cultivo (SW) sólido a las diferentes concentraciones correspondientes, finalmente se recultivaron en SW líquido para una segunda purificación, se eligieron aquellas colonias que crecieron solas o apartadas, esto con ayuda de una aguja de siembra para así optimizar un aislamiento de una cepa pura.

5. Como penúltimo paso, los tubos con un buen crecimiento (++) (+++), se cultivó colocando una asada de del medio líquido a un medio sólido (SW) al 10% y 15% de NaCl, el cual se incubaron a 37°C. posteriormente se seleccionaron las colonias apartadas y con caracteres preferentemente diferentes macroscópicamente, con crecimiento de positivo se determinó las características macroscópicas (caracteres culturales) y microscópicas (tinción Gram), para finalmente se depositaron en una cadena de frío 4°C, hasta el momento de la extracción de ADN bacteriano (Romoacca, 2018).

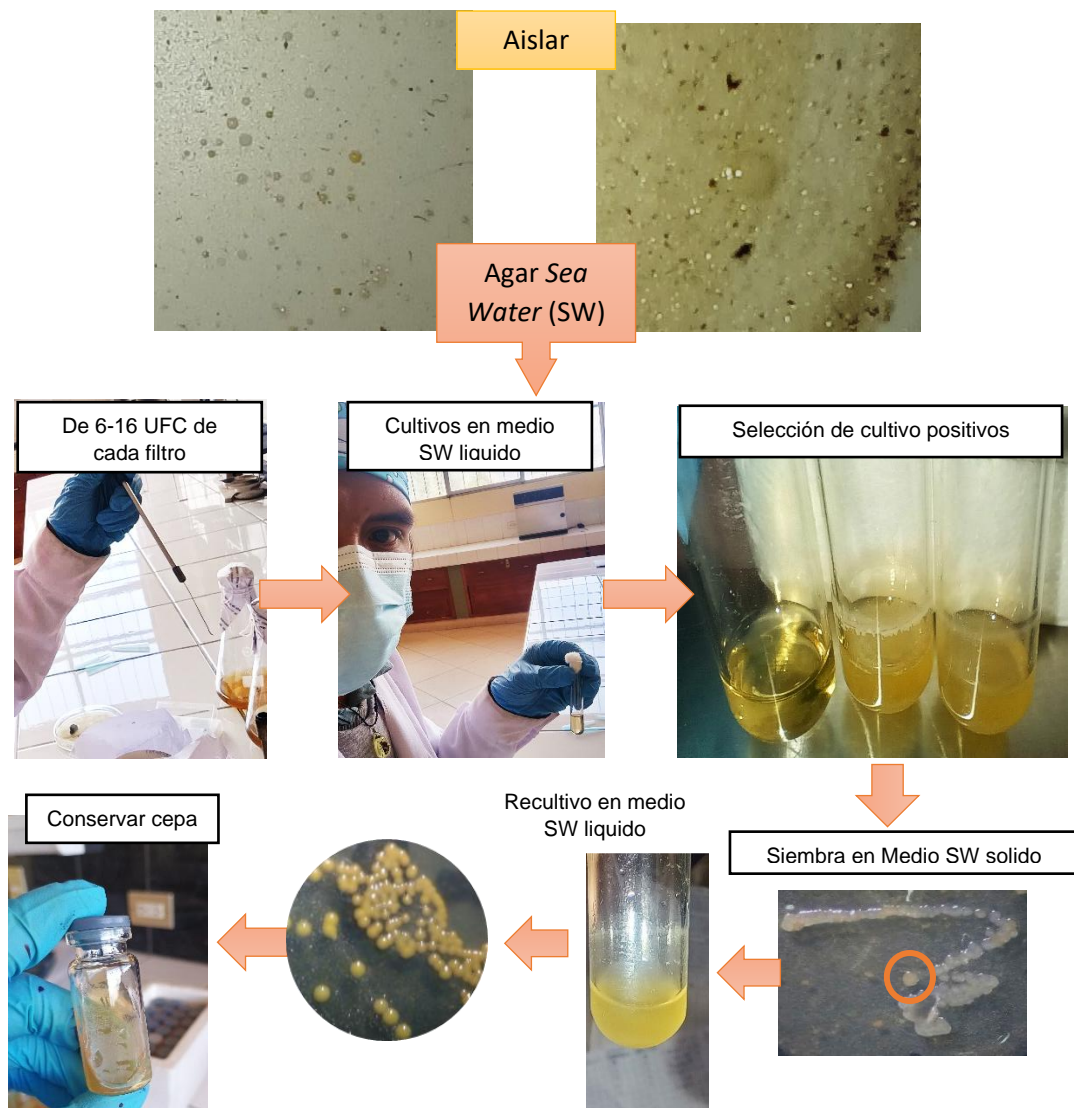


Figura 8. Resiembra de las cepas con buen crecimiento en medio de cultivo sólido

3.3.7 Caracterización fenotípica de las bacterias halófilas

Se realizó las observaciones fenotípicas (características culturales) que presentan las colonias según su forma, tamaño, pigmentación superficie, elevación consistencia (Anexo 5) ya que cada microorganismo tiene características peculiares en lo que respecta a la formación de colonias y la determinación en la composición que presentan en cuanto a su pared celular bacteriano por medio de la tinción Gram (Anexo 4), (Garzón, 2016).

3.3.8 Cultivo de cepas puras en medio líquido *Sea Water*

Se cultivaron las cepas de los viales incubados en la cadena de frío en tubos Eppendorf con medio SW líquido e incubados a 30°C de 5 a 6 días estos para la extracción de ADN.

3.3.9 Extracción de ADN de cepas aisladas

La extracción del ADN microbiano se realizó utilizando un kit comercial de extracción, "Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit" (Anexo 6) del cual se siguió la metodología que describe, siendo este el siguiente:

Protocolo

Para obtener un rendimiento óptimo agregar beta-mercaptoetanol (suministrado por el usuario) al tampón lisis genómico hasta una dilución final de 0,5% (v/v) es decir 500 µl por 100 ml.

1. Se agregó de 50-100 mg (peso húmedo) de células bacterianas que se hayan resuspendido en hasta 200 µl de agua destilada estéril, a un tubo de lisis ZR Bashin Bead (0.1mm y 0,5mm). Agregué 750 µl del tampón Bashin Bead al tubo.
2. Se agregó en un batidor de perlas equipado con un conjunto de soportes para tubos de 2 ml y procesé a la velocidad máxima durante 5 min.
3. Se centrifugó el tubo de lisis ZR Bashin Bead en una microcentrífuga a 10 000 g durante un minuto.
4. Se transfirió 400 µl de sobrenadante con un filtro Zymo Spin III-F en un tubo de recolección y centrifugué a 8000 g por un minuto.
5. Se agregó 1200 µl de tampón de lisis genómico al filtrado en un tubo de recolección del paso 4.

6. Se transfirió 800 μ l de la mezcla del paso 5 a una columna Zymo Spin II-CR en un tubo de recolección y centrifugué a 10 000 g durante un minuto.
7. Se desechó el flujo que sale del tubo de recolección y repetí el paso 6.
8. Se agregó 200 μ l de tampón de prelavado de ADN a la columna Zymo Spin II-CR en un tubo de recolección nuevo y centrifugué a 10 000 g durante un minuto.
9. Se agregó 500 μ l de tampón de lavado de ADN a la columna Zymo Spin II-CR y centrifugué a 10 000 g durante un minuto.
10. Se transfirió a la columna Zymo Spin II-CR a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y agregué 100 μ l de tampón de elución de ADN directamente a la matriz de la columna, centrifugué a 10 000 g durante 30 segundos para la elución de DNA.
11. El ADN ultrapuro ya está listo para utilizar en el experimento.

3.3.10 Determinación de la concentración del ADN de las cepas aisladas

La determinación para la concentración de ADN es muy importante, ya que de esta depende el producto de la PCR, es recomendable que la concentración óptima sea de 5 ng/ μ l – 10 ng/ μ l, ya que valores por debajo y/o encima podrían afectar el proceso de la amplificación, así como el resultado. Los valores por encima del óptimo fueron diluidos con el buffer de elución del kit de extracción de ADN, para obtener una concentración de \pm 10 ng/ μ l aproximadamente (Naranjo *et al.*, 2013).

Procedimiento:

1. Se encendió el espectrofotómetro y permita que se caliente según las instrucciones del fabricante.
2. Se limpió la superficie del soporte con 1 μ l de muestra de agua destilada estéril, más un paño limpio sin pelusa para asegurar que no haya residuos de la medición anterior.
3. Se pipeteó 1 μ l de la solución de blanco (buffer Bushin Bead) sobre el soporte de muestra. Se cerro el soporte y tome la medida del blanco. Esto calibra el espectrofotómetro y ajustará la línea base.
4. Se limpió nuevamente el soporte de muestra con un paño limpio sin pelusa para remover la solución de blanco.
5. Se midió la concentración de ADN, se pipeteó 1 μ l de la muestra de ADN sobre el soporte de muestra, cierre el soporte y tome la medida.

6. El Nanoespectrofotómetro NABI mostró la absorbancia a 260 nm, así como otras longitudes de onda relevantes para la pureza del ADN (A_{260} y A_{230}) (Anexo 7).
7. Después de la medición, se limpia el soporte de muestra con un paño limpio sin pelusa para asegurar que no queden residuos de ADN (Mamani, 2022)

La concentración de ADN se calcula automáticamente en función de la absorbancia a 260 nm. La ecuación de Beer-Lambert se utiliza para esta finalidad. **Pureza del ADN:** los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} son indicadores de la pureza del ADN. Un ratio A_{260}/A_{280} de aproximadamente 1,8 - 2,0 indica ADN/ARN sin contaminantes, mientras que un ratio A_{260}/A_{230} en el rango de 2,0 - 2,2 es indicativo de una buena pureza sin contaminantes de carbohidratos o proteínas (Lucena *et al.*, 2016; Shen, 2019)

3.3.11 Amplificación del gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR

Para la amplificación del gen ARNr 16S mediante de la técnica de PCR, se empleó el termociclador Eppendorf Mastercycler, utilizando los cebadores universales 27F y 1492R (Tabla 4), el kit de amplificación (KAPA Taq PCR Kit) y 2µl de ADN molde para cada reacción de PCR, para finalmente obtener medidas de bandas de 1500 pb aproximadamente. El ciclo de amplificación fue 4 minutos de denaturación inicial a 94°C, seguido de 31 ciclos de 30 segundos a 94°C, 15 segundos de hibridación a 65°C y 30 segundos de extensión a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C, como se muestra (Figura 9).

Tabla 4. Cebador universal utilizado

Cartillas	secuencias	Gen diana
Cebador universal bacteriano	27F (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') 1492R (5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3')	16SrRNA

Fuente: Tomada de (Weisburg *et al.*, 1991), adaptado por Faz (2018).

Tabla 5. Sistema mix de PCR (KAPA Taq PCR Kit-Merck) para volumen de 25 μ l.

Reactivo	Cinicial	Cfinal	Vinicial
Buffer	10 X	1 X	2,5 μ l
MgCl₂	25mM	1,5mM	1,5 μ l
dNTPs	2mM	0,2mM	2,5 μ l
Primer 27F	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Primer 1492R	10 pmol/ μ l	10 pmol	1 μ l
Taq DNA	5U/ μ l	0.1U	0,02 μ l
polimerasa			
ADN	5-10 ng/ μ l	10-20ng	2 μ l
H₂O	-	-	14,48 μ l
Vfinal			25 μ l

Fuente: elaboración con datos de experimentación. (Anexo 8)

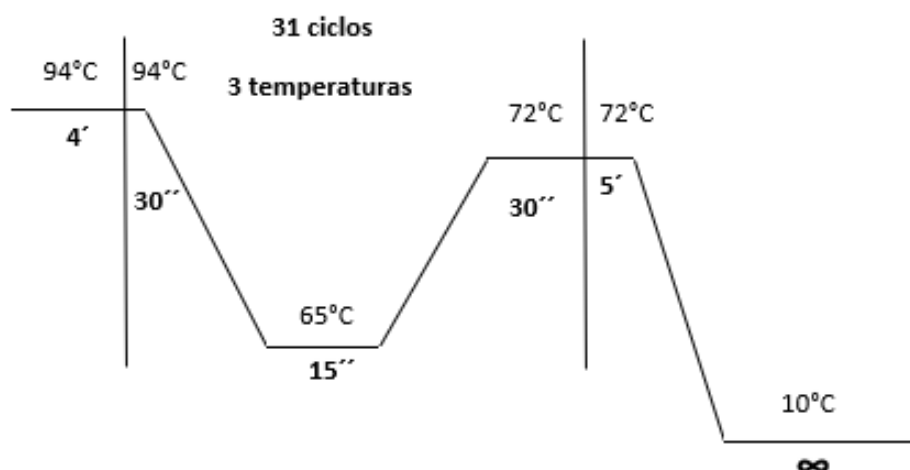


Figura 9. Programación para amplificación del gen ARNr 16S en el termociclador.

3.3.12 Electroforesis para ver la integridad del gen amplificado

Para evaluar los productos de PCR del gen 16S amplificado, se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa, para lo cual primero se alistó el equipo de electroforesis, el producto de PCR, el marcador de peso molecular (100 bpDNA Ladder de PROMEGA), el tampón de carga ADN 6 X y finalmente el tampón TBE 0,5 X (Anexo 9), así mismo un colorante de cianina, la solución Sybr Safe (Invitrogen), que es el componente que intercala con las bases nitrogenadas emitiendo una fluorescencia bajo la luz ultravioleta (Mamani, 2022).

Procedimiento

1. Se preparó el gel de agarosa al 1% con 1 µl de Sybr Safe (Anexo 10)
2. Se vertió la mezcla del gel con cuidado en el molde para electroforesis con el peine bien puesto y se dejó solidificar 20 minutos.
3. Se sumergió el gel en la cámara electroforética que contenía tampón TBE 0,5 X y se retiró cuidadosamente el peine para que queden libres los pocillos para las muestras.
4. Después se preparó las muestras mezclando tanto las muestras del producto amplificado de 2 µl, el tampón de carga ADN 6 X de 2 µl y con 8 µl de agua destilada para un volumen final de 12 µl, para así sembrar en los pocillos del gel de agarosa.
5. Se conectó los cables a la fuente de poder y se aplicó un voltaje de 90V durante una hora.
6. Para la visualización el producto del gen amplificado se utilizó el lector de imágenes ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) donde se colocó el gel en el transiluminador y se encendió la lámpara de luz ultravioleta ($\lambda \approx 300$ nm), la imagen se observa mediante el programa Imagen Lab TM (Bio-Rad Laboratories, Inc.) Adaptada de Mamani (2022) (Anexo 13).

3.3.13 Secuenciación del gen ribosomal ARN 16S

Los productos PCR (amplicones) de 68 muestras fueron enviados a la empresa MACROGEN para su secuenciación parcial del gen ARNr 16S con el cebador 27F, cada una de las muestras se envió en un volumen de 20 µl.

3.3.14 Análisis bioinformático de las secuencias del gen ARNr 16S

Los datos obtenidos en formato FASTA de las secuencias parciales del gen ARNr 16S del estudio, fueron comparadas con la base de datos del NCBI, usando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para obtener la aproximación de identidad de las cepas bacterianas por comparación de secuencias (Anexo 12) (Romoacca, 2018).

IV. RESULTADOS

Tabla 6. Resultados de cultivo y aislamiento de bacterias halófilas, por método filtro de membrana en medio *Sea Water*. Ayacucho, 2024.

	Código de filtro	% NaCl	24H (UFC)	48H (UFC)	72H (UFC)	96H (UFC)	120H (UFC)	144H (UFC)	160H (UFC)	Total UFC
MUESTRA 1	1MF(10)(1)	10	0	15	31	50	68	84	84	84
	1MF(10)(2)	10	0	16	27	56	70	87	87	87
	1MF(10)(3)	10	0	21	33	42	54	70	71	71
	1MF(15)(1)	15	0	0	0	0	5	10	16	16
	1MF(15)(1)	15	0	0	0	0	2	6	15	15
	1MF(15)(1)	15	0	10	20	40	50	75	90	90
MUESTRA 2	2MF(10)(1)	10	0	6	15	30	50	80	80	80
	2MF(10)(2)	10	0	9	20	42	60	75	75	75
	2MF(10)(3)	10	0	7	23	40	70	90	90	90
	2MF(15)(1)	15	0	1	5	10	20	30	36	36
	2MF(15)(2)	15	0	0	0	6	15	40	50	50
	2MF(15)(3)	15	0	0	0	5	20	30	40	40

Fuente: Elaboración propia con datos de experimentación.

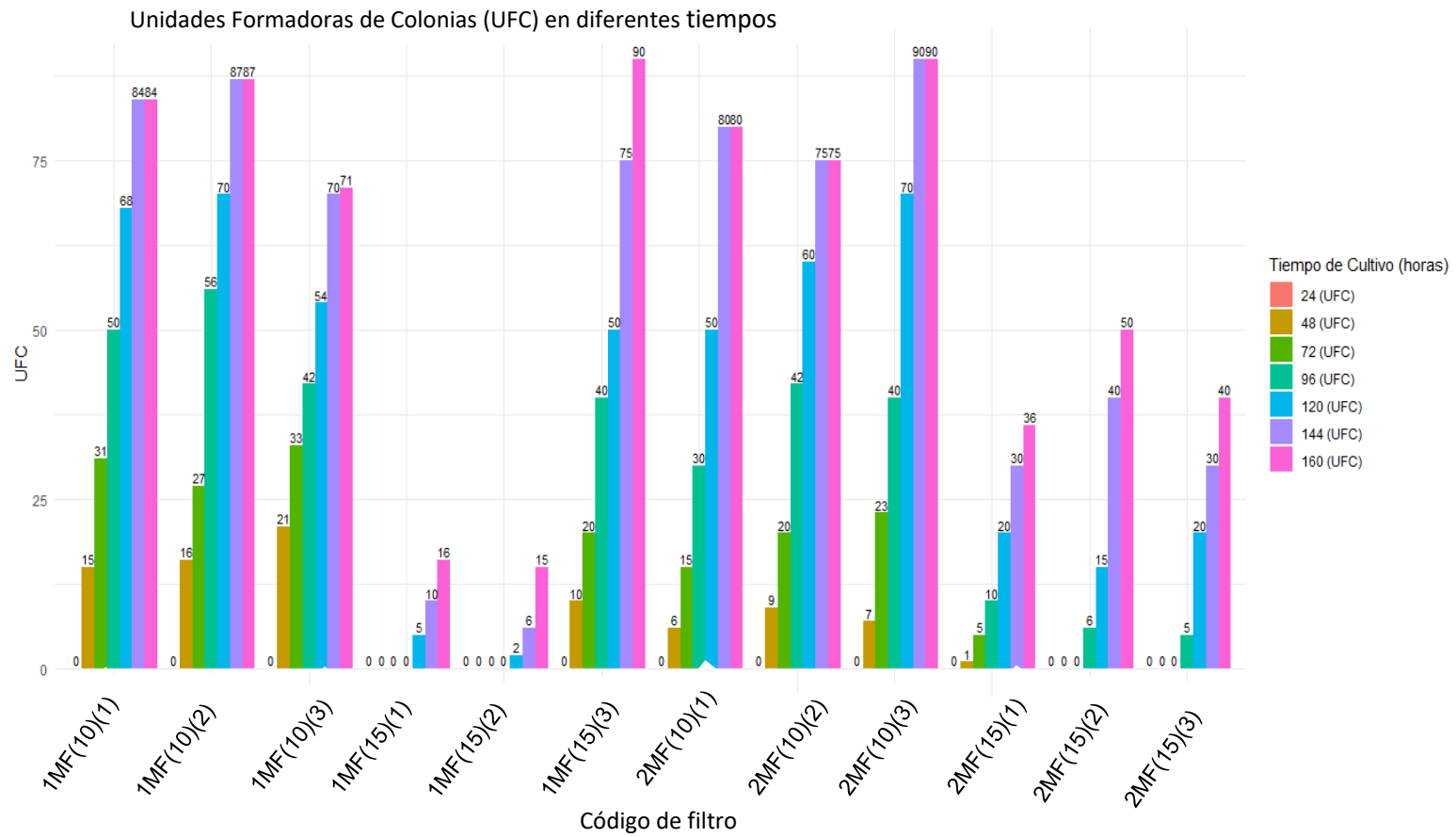


Figura 10. Muestra el número y abundancia de bacterias que crecieron en relación a horas (24-160) en incubación a 36°C. Ayacucho, 2024.

Tabla 7. Los resultados del análisis fisicoquímico de la muestra de agua de la fuente salina de Cachipata. Ayacucho, 2024.

Parámetro	Método analítico	Unidades	Resultado
Salinidad		%	24,31
C.E	(EAA)	(Ds/m)	379,20
Calcio	(EAA)	(meq/L)	72,50
Magnesio	(EAA)	(meq/L)	3,00
Potasio	(EAA)	(meq/L)	1,18
Nitratos,	(EAA)	(meq/L)	1,90
Carbonatos	(EAA)	(meq/L)	0,00
Bicarbonatos	(EAA)	(meq/L)	9,63
Cloruros	(EAA)	(meq/L)	5530
Sulfatos	(EAA)	(meq/L)	28,14
Fosfato	(EAA)	(ppm)	0,04
pH			5,9 – 6,4

Fuente: Elaboración propia con datos de experimentación.

Tabla 8. Resultado de resiembras para la purificación de cepas en medio líquido de SW, Ayacucho, 2024.

	Código	N° de Colonias por placa recultivadas	Lugar de aislamiento	% NaCl	1° Resiembra: tubos positivos (++ y +++)	2° Resiembra: tubos positivos (++ y +++)
MUESTRA 1	1MF(10)(1)	10	Cachipata	10	2	2
	1MF(10)(2)	10	Cachipata	10	7	5
	1MF(10)(3)	12	Cachipata	10	6	4
	1MF(15)(1)	9	Cachipata	15	6	5
	1MF(15)(2)	7	Cachipata	15	5	2
	1MF(15)(3)	18	Cachipata	15	9	8
MUESTRA 2	2MF(10)(1)	16	Cachipata	10	15	7
	2MF(10)(2)	14	Cachipata	10	11	6
	2MF(10)(3)	13	Cachipata	10	13	9
	2MF(15)(1)	8	Cachipata	15	5	3
	2MF(15)(2)	8	Cachipata	15	3	3
	2MF(15)(3)	16	Cachipata	15	14	14
TOTAL					96	68

Fuente: Elaboración propia con datos de experimentación.

Tabla 9. Resultados de características macroscópicas y microscópicas de bacterias halófilas aisladas (Anexo 5). Ayacucho, 2024.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS COLONIAS DE LAS CEPAS AISLADAS												
Código de cepa	(%) NaCl	Características de crecimiento en medio líquido			Morfología de las colonias					Morfología de la célula		
		Turbiedad	Película	Sedimento	Forma	Pigmentación	Elevación	Superficie	Consistencia	Forma de borde	Reacción Gram	Forma
1MF(10)(1) [3]	10	(2+)	(+)	(+)	Irregular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
1MF10(1) [9]	10	(2+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos
1MF(10)(2) [2]	10	(2+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(10)(2) [3]	10	(2+)	(+)	(+)	Irregular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
1MF(10)(2) [5]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos
1MF(10)(2) [8]	10	(2+)	(+)	(+)	Irregular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(+)	Cocos
1MF(10)(2) [10]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(10)(3) [6]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [1]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [3]	10	(2+)	(+)	(+)	Irregular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [6]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [8]	10	(2+)	(+)	(+)	Irregular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [11]	10	(3+)	(+)	(+)	Irregular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [12]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(1) [15]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(10)(2) [1]	10	(2+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(2) [2]	10	(2+)	(-)	(+)	Circular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(2) [5]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(2) [10]	10	(2+)	(-)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(2) [11]	10	(3+)	(-)	(+)	Irregular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Rizado	G(-)	Bacilos
2MF(10)(2) [13]	10	(3+)	(-)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos

2MF(10)(3) [1]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [2]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Amarillo	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [5]	10	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [6]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Amarillo	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [7]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [8]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos
2MF(10)(3) [10]	10	(3+)	(+)	(+)	Irregular	Blanco	Convexa	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [12]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(10)(3) [13]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(10)(3) [4]	10	(3+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(10)(3) [5]	10	(3+)	(-)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(10)(3) [6]	10	(3+)	(-)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	bacilos
1MF(10) (3) [7]	10	(3+)	(-)	(+)	Circular	Crema	Convexa	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	bacilos
1MF(15)(1) [1]	15	(3+)	(+)	(+)	Circular	Amarilla	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Diplococos
1MF(15)(1) [2]	15	(3+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(1) [3]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Amarilla	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(1) [7]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(1) [9]	15	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(2) [1]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos
1MF(15)(2) [2]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [2]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [6]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [8]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [10]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [12]	15	(3+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos

1MF(15)(3) [13]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [15]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
1MF(15)(3) [17]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(1) [1]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(1) [6]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(1) [7]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Transparente	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(2) [2]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos
2MF(15)(2) [7]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Amarilla	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Diplococos
2MF(15)(2) [8]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [2]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [3]	15	(2+)	(-)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [5]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Rojo	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(+)	Cocos
2MF(15)(3) [7]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Blanco	Convexo	Lisa	Cremosa	Filamentoso	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [8]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [9]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [10]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Rojo	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [11]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [12]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [13]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [14]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Rojo	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [15]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos
2MF(15)(3) [16]	15	(2+)	(+)	(+)	Circular	Crema	Convexo	Lisa	Cremosa	Entero	G(-)	Bacilos

Fuente: Elaboración propia con datos de experimentación.

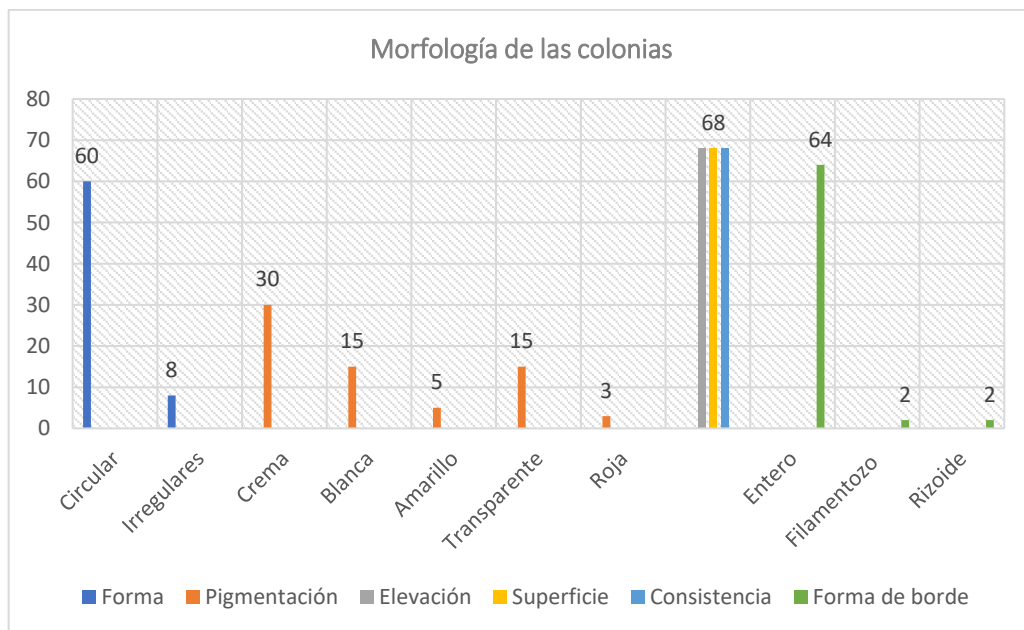


Figura 11. Resultado de caracterización macroscópica de bacterias halófilas aisladas. Ayacucho, 2024.

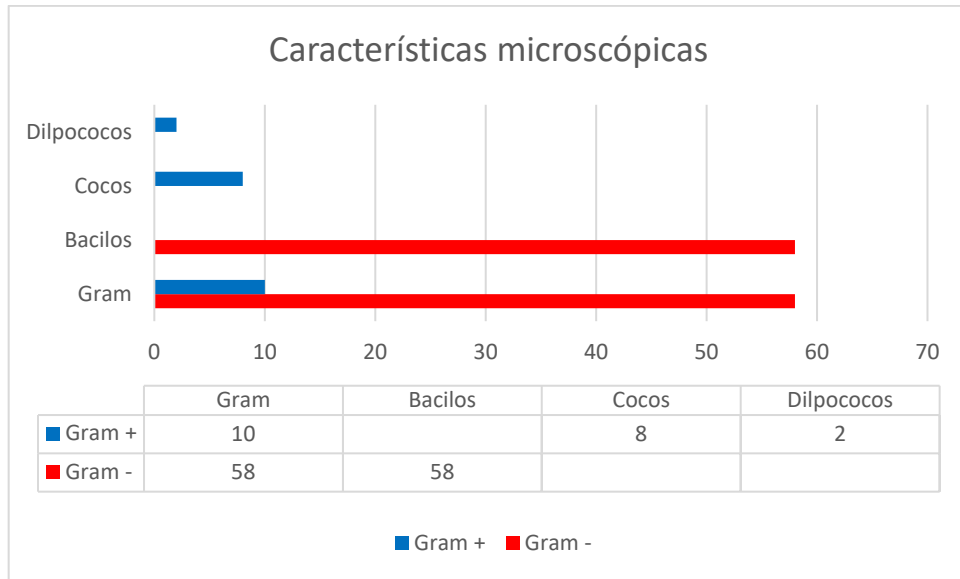


Figura 12. Resultado de las características microscópicas de bacterias halófilas, aisladas. Ayacucho, 2024.

Tabla 10. Resultados de cuantificación de ADN extraído de las cepas bacterianas. Ayacucho, 2024.

Código de cepa	Lugar de aislamiento	(% NaCl	Cuantificación de ADN		
			[]ng/μl	260/280	260/230
1MF(15)(1) [1]	Cachipata	15	8,9	1,933	0,039
1MF(15)(1) [2]	Cachipata	15	8,816	1,758	0,567
1MF(15)(1) [3]	Cachipata	15	20,433	2,604	0,513
1MF(15)(1) [7]	Cachipata	15	15,429	1,803	0,346
1MF(15)(1) [9]	Cachipata	15	9,098	2,289	0,244
1MF(15)(2) [1]	Cachipata	15	7,637	1,917	0,16
1MF(15)(2) [2]	Cachipata	15	11,228	1,957	0,181
1MF(15)(3) [2]	Cachipata	15	27,813	1,91	1,144
1MF(15)(3) [6]	Cachipata	15	10,174	1,845	0,349
1MF(15)(3) [8]	Cachipata	15	10,158	1,941	0,367
1MF(15)(3) [10]	Cachipata	15	16,421	1,772	0,029
1MF(15)(3) [12]	Cachipata	15	10,691	1,88	0,533
1MF(15)(3) [13]	Cachipata	15	11,73	1,812	0,233
1MF(15)(3) [15]	Cachipata	15	20,269	2,142	0,815
1MF(15)(3) [17]	Cachipata	15	9,984	2,263	0,037
2MF(15)(1) [1]	Cachipata	15	7,659	2,147	0,077
2MF(15)(1) [6]	Cachipata	15	18,709	2,811	0,442
2MF(15)(1) [7]	Cachipata	15	13,746	2,03	0,412
2MF(15)(2) [2]	Cachipata	15	17,24	2,055	0,556
2MF(15)(2) [7]	Cachipata	15	20,116	2,623	0,344
2MF(15)(2) [8]	Cachipata	15	15,83	1,896	0,365
2MF(15)(3) [2]	Cachipata	15	18,073	2,066	0,681
2MF(15)(3) [3]	Cachipata	15	7,627	2,155	0,286
2MF(15)(1) [5]	Cachipata	15	10,998	2,087	0,294
2MF(15)(3) [7]	Cachipata	15	30,658	2,026	0,462
2MF(15)(3) [8]	Cachipata	15	15,995	2,014	0,233
2MF(15)(3) [9]	Cachipata	15	28,311	2,026	0,334
2MF(15)(3) [10]	Cachipata	15	12,439	2,16	0,704
2MF(15)(3) [11]	Cachipata	15	22,813	1,911	0,49
2MF(15)(3) [12]	Cachipata	15	20,826	2,123	1,187
2MF(15)(3) [13]	Cachipata	15	20,935	2,152	1,007
2MF(15)(3) [14]	Cachipata	15	26,854	1,929	0,651
2MF(15)(3) [15]	Cachipata	15	12,919	1,98	0,201
2MF(15)(3) [16]	Cachipata	15	12,696	1,93	0,415
1MF(10)(1) [3]	Cachipata	10	10,683	2,176	0,096
1MF(10)(1) [9]	Cachipata	10	14,392	1,96	0,398
1MF(10)(2) [2]	Cachipata	10	8,248	2,142	0,407
1MF(10)(2) [3]	Cachipata	10	9,644	2,13	0,196
1MF(10)(2) [5]	Cachipata	10	16,347	2,014	0,543
1MF(10)(2) [8]	Cachipata	10	12,42	2,022	0,36
1MF(10)(2) [10]	Cachipata	10	23,479	1,96	0,845
1MF(10)(3) [6]	Cachipata	10	14,912	2,012	0,595
2MF(10)(1) [1]	Cachipata	10	40,477	1,961	1,157
2MF(10)(1) [3]	Cachipata	10	15,846	2,014	0,515
2MF(10)(1) [6]	Cachipata	10	20,213	1,99	1,08
2MF(10)(1) [8]	Cachipata	10	16,827	1,285	0,023

2MF(10)(1) [11]	Cachipata	10	20,579	1,958	0,912
2MF(10)(1) [12]	Cachipata	10	11,96	1,93	0,157
2MF(10)(1) [15]	Cachipata	10	14,417	2,004	0,725
2MF(10)(2) [1]	Cachipata	10	29,671	1,956	0,44
2MF(10)(2) [2]	Cachipata	10	8,658	1,818	0,253
2MF(10)(2) [5]	Cachipata	10	32,28	1,958	1,302
2MF(10)(2) [10]	Cachipata	10	64,558	1,959	0,994
2MF(10)(2) [11]	Cachipata	10	13,998	2,013	0,693
2MF(10)(2) [13]	Cachipata	10	37,1	1,969	0,616
2MF(10)(3) [1]	Cachipata	10	21,235	1,965	0,615
2MF(10)(3) [2]	Cachipata	10	14,441	1,839	0,061
2MF(10)(3) [5]	Cachipata	10	60,307	2,141	0,702
2MF(10)(3) [6]	Cachipata	10	27,269	1,937	0,83
2MF(10)(3) [7]	Cachipata	10	13,998	1,97	0,609
2MF(10)(3) [8]	Cachipata	10	15,511	1,938	0,211
2MF(10)(3) [10]	Cachipata	10	32,611	1,919	0,324
2MF(10)(3) [12]	Cachipata	10	24,656	1,869	0,307
2MF(10)(3) [13]	Cachipata	10	20,859	1,862	0,216
1MF(10)(3) [4]	Cachipata	10	7,637	1,788	0,086
1MF(10)(3) [5]	Cachipata	10	21,162	2,65	0,303
1MF(10)(3) [6]	Cachipata	10	13,986	1,911	0,566
1MF(10)(3) [7]	Cachipata	10	8,777	1,875	0,374

Fuente: elaboración propia a base de datos experimentales.

Nota.

Código de cepas: M (muestra), 1 (número de muestra), F (inicial del lugar de muestreo), (10) (concentración de NaCl), (3) (repetición) y [7] (Numero de repetición de tubos)

[]ng/μl: Concentración de ADN (nanogramo por microlitros)

Abs 260: Absorbancia a 260 nanómetros

Ratio 260/230: Pureza de la muestra

Ratio 260/280: Pureza de la muestra



Figura 13. Los resultados de la amplificación del gen ARNr 16S, por técnica de la PCR y visualizadas por electroforesis. Ayacucho, 2024.

Nota: marcador molecular.

E1: 100 pb DNA Ladder

E2: ADN Lambda HindIII

Nota: código de cepas.

1: 1MF(10)(2) [2]

2: 1MF(10)(2) [3]

3: 2MF(10)(1) [12]

4: 2MF(15)(1) [5]

5: 1MF(15)(3) [17]

6: 2MF(15)(1) [7]

7: 2MF(15)(3) [3]

8: 2MF(15)(3) [12]

9: Blanco

Tabla 11. Resultados de pares de base del amplicón, analizado por el software (Image Lab versión 6.1, Bio-Rad Laboratories) para medir la distancia recorrida (anexo 11). Ayacucho 2024.

Código de cepa	pb	Código de cepa	pb
1MF(15)(1) [1]	1696	1MF(10)(1) [3]	1773
1MF(15)(1) [2]	1610	1MF(10)(1) [9]	1569
1MF(15)(1) [3]	1596	1MF(10)(2) [2]	1562
1MF(15)(1) [7]	1590	1MF(10)(2) [3]	1596
1MF(15)(1) [9]	1478	1MF(10)(2) [5]	1579
1MF(15)(2) [1]	1582	1MF(10)(2) [8]	1585
1MF(15)(2) [2]	1604	1MF(10)(2) [10]	1518
1MF(15)(3) [2]	1616	1MF(10)(3) [6]	1762
1MF(15)(3) [6]	1478	1MF(10)(1) [1]	1467
1MF(15)(3) [8]	1529	2MF(10)(1) [3]	1569
1MF(15)(3) [10]	1559	2MF(10)(1) [6]	1451
1MF(15)(3) [12]	1556	2MF(10)(1) [8]	1540
1MF(15)(3) [13]	1639	2MF(10)(1) [11]	1540
1MF(15)(3) [15]	1643	2MF(10)(1) [12]	1616
1MF(15)(3) [17]	1626	2MF(10)(1) [15]	1543
2MF(15)(1) [1]	1643	2MF(10)(2) [1]	1459
2MF(15)(1) [6]	1519	2MF(10)(2) [2]	1751
2MF(15)(1) [7]	1616	2MF(10)(2) [5]	1460
2MF(15)(2) [2]	1707	2MF(10)(2) [10]	1618
2MF(15)(2) [7]	1485	2MF(10)(2) [11]	1480
2MF(15)(2) [8]	1685	2MF(10)(2) [13]	1629
2MF(15)(3) [2]	1622	2MF(10)(3) [1]	1629
2MF(15)(3) [3]	1626	2MF(10)(3) [2]	1639
2MF(15)(1) [5]	1636	2MF(10)(3) [5]	1696
2MF(15)(3) [7]	1580	2MF(10)(3) [6]	1587
2MF(15)(3) [8]	1450	2MF(10)(3) [7]	1543
2MF(15)(3) [9]	1707	2MF(10)(3) [8]	1660
2MF(15)(3) [10]	1478	2MF(10)(3) [10]	1597
2MF(15)(3) [11]	1685	2MF(10)(3) [12]	1562
2MF(15)(3) [12]	1762	2MF(10)(3) [13]	1704
2MF(15)(3) [13]	1623	1MF(10)(3) [4]	1545
2MF(15)(3) [14]	1660	1MF(10)(3) [5]	1728
2MF(15)(3) [15]	1491	1MF(10)(3) [6]	1498
2MF(15)(3) [16]	1762	1MF(10)(3) [7]	1590

Fuente: elaboración propia a base de datos experimentales.

Tabla 12. Resultados de identidad aproximada de familias, de grupos bacterianos halófilos mediante herramienta BLASTn.

Código de cepas	% S	% QC	Identidad de Familia	Código de cepas	% S	% QC	Identidad de Familia
1MF(15)(1)[1]	90.43%	91%	Bacillaceae	1MF(15)(2)[1]	83.56%	90%	Halomonadaceae
1MF(15)(1)[3]	92.32%	91%		1MF(15)(2)[2]	86.30%	87%	
1MF(15)(1)[7]	85.40%	87%		1MF(15)(3)[6]	88.12%	90%	
1MF(15)(3)[12]	85.60%	86%		1MF(15)(3)[8]	86.45%	88%	
2MF(15)(1)[6]	85.30%	91%		2MF(15)(2)[8]	85.12%	89%	
2MF(15)(2)[2]	83.60%	90%		2MF(15)(3)[10]	87.55%	86%	
2MF(15)(3)[3]	83.70%	89%		1MF(10)(1)[3]	88.10%	89%	
2MF(15)(1)[5]	84.40%	91%		1MF(10)(2)[2]	83.55%	90%	
1MF(10)(2)[5]	85.23%	88%		2MF(10)(1)[11]	89.20%	89%	
1MF(10)(2)[8]	83.54%	86%		2MF(10)(2)[5]	84.10%	86%	
2MF(10)(1)[1]	84.50%	91%		2MF(10)(2)[11]	85.10%	89%	
2MF(10)(1)[3]	85.20%	86%		2MF(10)(3)[2]	84.80%	86%	
2MF(10)(3)[5]	85.50%	86%		2MF(10)(3)[10]	85.70%	89%	
1MF(10)(3)[6]	85.10%	86%		2MF(10)(3)[12]	83.70%	88%	
1MF(15)(1)[9]	87.20%	88%	1MF(10)(3)[4]	87.80%	92%	Ectothiorhodospiraceae	
2MF(10)(1)[6]	90.00%	90%	1MF(10)(3)[7]	83.76%	90%		
2MF(10)(1)[12]	85.40%	86%	2MF(10)(2)[10]	84.40%	92%	Carnobacteriaceae	
1MF(15)(3)[2]	83.50%	87%	2MF(10)(3)[13]	83.65%	91%		
2MF(10)(1)[15]	91.10%	86%	2MF(10)(2)[13]	87.10%	93%	Carnobacteriaceae	
2MF(15)(3)[8]	84.20%	86%	2MF(10)(3)[8]	90.11%	92%		

Fuente: Elaboración a base de datos experimentales obtenidos.

Nota.

Los códigos de cepas que no están presente en la tabla 12, no tuvieron ningún índice de similitud.

% S: Porcentaje de similitud

%QC: Porcentaje de Query Cover

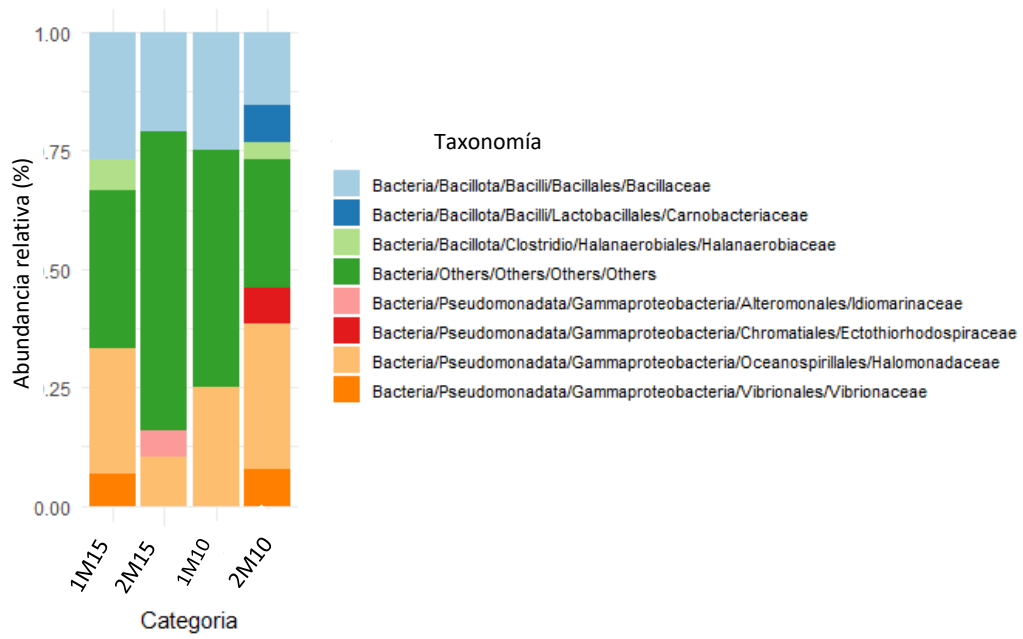


Figura 14. Abundancia relativa de presencia de familia de bacterias halófilas encontradas, en relación al % de NaCl. Ayacucho 2024.

Nota: Los códigos debajo de la barra indican las concentraciones de NaCl a las que fueron cultivados.

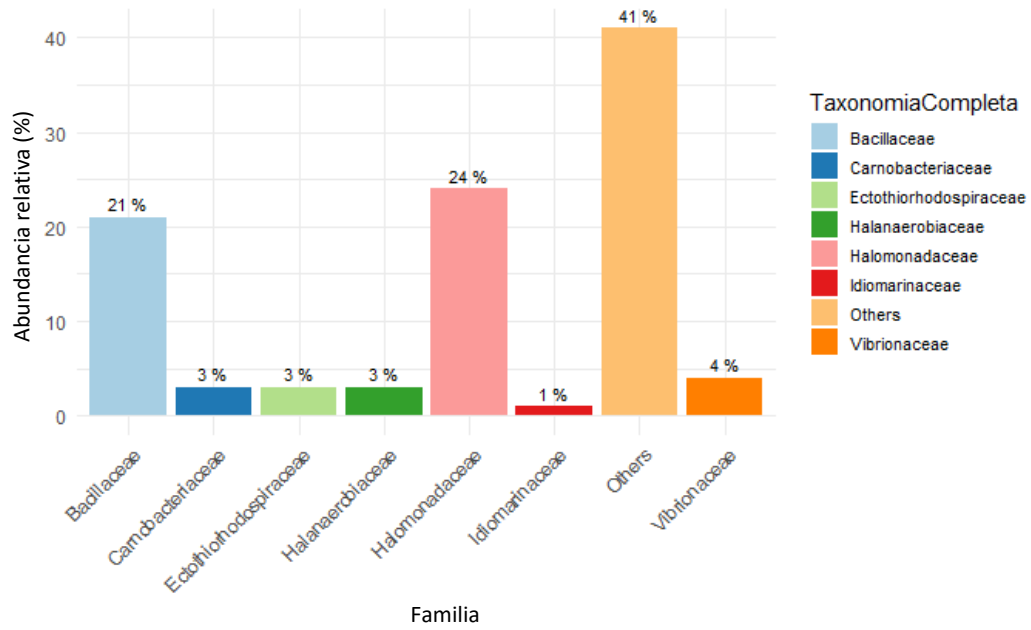


Figura 15. Porcentaje de abundancia de aproximaciones en familia de bacterias halófilas encontradas. Ayacucho 2024.

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 6 y Figura 10, muestra los resultados de aislamiento de bacterias halófilas, se utilizó el método de filtro de membrana, con una membrana de medida 0,22 μm , para la filtración de bacterias. Se filtraron 1L de muestra de agua del cual se cultivaron los filtros en medio SW sólido suplementado con 10 y 15% de NaCl. Se incubó a 36°C una duración de 24 a 160 horas, donde el crecimiento de mayor número de bacterias se dió en concentraciones de 10%.

Los resultados del estudio, fueron confirmado por Romoacca (2018) detallando que aisló bacterias halófilas de 3 ambientes salinos acuáticos, para ello uso el método filtro de membrana al vacío a una porosidad 0,22 μm de filtro para 1 litro de muestra de agua, los cuales fueron cultivados en el medio SW en diferentes concentraciones de NaCl (5%,10%,15%,25% y 33%), e incubados durante 7 días a 37°C. de los cuales obtuvo mayor número de crecimiento a concentraciones de 3 a 10%. Así mismo, citando a Castelán *et al.*, (2019) aisló microorganismos halófilos por método de filtro de membrana (Millipore, 0,22 μm), Rossel *et al.*, (2020) mencionan la determinación y recuento de bacterias por el método; filtro de membrana, consideran que esta metodología permite evaluar volúmenes variados de agua con un resultado directo en cuanto a la concentración de número de bacterias presentes.

Desde la posición de Elshafey *et al.*, (2022), para aislar bacterias y arqueas halófilas, utilizó como muestras agua y suelo salado, luego se hizo diluciones seriadas de muestras de agua y suelo, finalmente cultivaron en medio halófilo (MH) sólido a concentraciones significativas (3% - 30%), luego se incubaron a 40°C de 7-15 días, dando resultados que el crecimiento del mayor número de bacterias se dio a concentraciones del 15%.

En la Tabla 7, la investigación se centra en el estudio de microbiota bacteriana de la fuente salina Cachipata, para ello es necesario saber los parámetros fisicoquímicos naturales del lugar para así conocer las condiciones de hábitat de

las bacterias, se usó el método de espectrofotometría de absorción atómica (EAA) para el análisis se tomó 1 L de muestra de agua, mientras tanto el pH fue medido *in situ* dando resultados de 5,7 a 6,4.

Los resultados fueron confirmados por Romoacca (2018), donde obtuvo por (método normalizado de APHA), la concentración de salinidad del 26,3% en Maras, así mismo C.E de 590ms/cm, cloruro 154mg/L, sulfatos 3,2g/L, nitratos 0,2g/L, fosfato 0,15mg/L, carbonato de calcio 1,8g/L, carbonato de magnesio 0,2g/L y un pH de 7,5, mostrando en estos resultados por encima de nuestra investigación. Así mismo, Garzón (2016) en su caracterización fisicoquímica por métodos (electrométrico, turbidímetro, espectrofotométrico, colorimétrico) mostrando, una concentración de salinidad de C.E mayor a 200us/cm, y un pH de 6,03, pero diferenciando sus resultados en cloruros 452mg/L, sulfatos 378mg/L, nitratos 0,059mg/L, calcio 3080mg/L, magnesio 1350mg/L, potasio 1570mg/L.

Los resultados del estudio fueron comparados por Jácome (2018), donde caracterizó fisicoquímicamente el agua por método (PE-LSA, STANDARD METHODS) de donde aisló bacterias halófilas, mostrando un pH 8.7, C.E de 30800 (us/cm), nitratos 5,5 (mg/L), sulfatos 130 (mg/L), calcio 74,61 (mg/L), cloruros 11344 (mg/L), magnesio 48,31 (mg/L), potasio 32,8 (mg/L). De acuerdo a la diferencia de resultados se muestra en relación a los métodos usado para su análisis. Es importante de igual manera la presencia de las sales en el medio acuático teniendo en cuenta a Garzón (2016), destaca que el magnesio y el potasio son cruciales para el crecimiento de las bacterias halófilas, ya que ayudan a gestionar la presión osmótica en entornos con alto contenido en sal. Además, los nitratos, nitritos, sulfatos y calcio son esenciales para las vías metabólicas de las bacterias. Por otro lado, la materia orgánica sirve como fuente de nutrientes para estas bacterias, proporcionándoles una variedad de nutrientes necesarios. Todo estos procesos de diferencia en los resultados, menciona Boros y Kolpakova (2018) son por factores que influyen como la presencia o acumulación de elementos trazas, de acuerdo a su origen, la diversidad de procariontas y eucariotas halófilos presentes, el equipo usado, los cambios ambientales y climáticos, así mismo la intervención antropogénica.

En la Tabla 8, resultado de la purificación de colonias para obtener cultivos puros. En este procedimiento se tomó criterios de exclusión e inclusión de las colonias, de acuerdo a la pigmentación, tamaño, forma y la consistencia, de cada filtro se seleccionaron un promedio de 7 – 16 colonias para el cultivo en medio líquido de

1 ml de SW, a las dos concentraciones con ayuda de una punta de cultivo, estas se incubaron a 36°C de 24 a 336 horas, finalmente se obtuvieron un total de 96 cepas con crecimiento (++) y (+++) de turbidez, estas se cultivaron para después hacer otra resiembra por selección de colonias, así se llegó a obtener un total de 68 cepas como resultado final.

Los resultados del estudio, fueron comparados por Jácome (2018), donde procedió seleccionar las bacterias que sean diferentes en sus características macroscópicas como su forma, color y consistencia, se realizó la selección de colonias con ayuda de un asa de siembra así transferirlas a una nueva placa con las mismas concentraciones y fueron incubados a una temperatura de 30°C hasta que se observe crecimiento en las placas. Este procedimiento se puede repetir hasta obtener la pureza en los aislados bacterianos, llegando a un total de 125 cepas aisladas.

Desde la posición de Garzón (2016), desarrolla su método para purificar las cepas bacterianas, realizando una purificación de hasta 5 veces, para esto se basó en las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, así obtener cepas puras. Mientras tanto Romoacca (2018), con ayuda de puntas de siembra desechables recultivo, también tomando criterios macroscópicos, así obteniéndose 242 cepas, de lo cual la selección 35 cepas para continuar con el trabajo, tomando prioritariamente las cepas que crecieron en mayores concentraciones de salinidad de 25% y 33% por la alta probabilidad de encontrar bacterias halófilas extremas.

En la Tabla 9, Figura 11 y 12, resultados obtenidos que muestran las características macroscópicas y microscópicas con el tiempo de crecimiento y las concentraciones de NaCl, de la caracterización de 68 cepas de bacterias halófilas aisladas en agar SW, en cuanto a su forma el 90% (58) presentan colonias circulares, el 10% (10) presentan colonias irregulares, mientras de pigmentación 8% (5) son amarilla, el 22% (15) son blancas, el 44% (30) son cremas, el 22% (15) son transparentes y 4% (3) son de color rojas. Por otro lado; en su forma de borde un 88% (60) son de borde entero, 11% (8) de borde filamentosos y 1% (2) con borde rizado, finalmente las características de elevación, consistencia y superficie todos presentan similitudes en su totalidad. Los resultados de las características microscópicas, se desarrolló por coloración Gram, de lo cual hubo un elevado número de cepas Gram negativas en forma de bacilo y cocos de ello el 90% (58) son bacilos, y el 10% (10 cepas) fueron bacilos Gram positivos cocos y diplococos.

Los resultados del estudio, fueron confirmados por Ruiz (2020), donde muestra del total que son 16 bacterias halófilas identificadas, de ello se caracterizó la pigmentación encontrada 5 de color crema, 4 amarillas, 4 blancas, 1 fucsia, 1 melón y 1 nuez claro, la forma; en su totalidad circular y una textura, mucosa, cremosa y seca. La morfología microscópica indica que 13 son Gram negativas y la morfología dominante son los bacilos y en algunos casos, están en cadenas como estreptobacilos, mientras como Gram positivos solo hubo 3 de lo cual todos fueron cocos.

Por otro lado, Jácome (2018) detalla de las características fenotípicas que el 100% presentan forma circular; el 88% bordes enteros y el 12 % bordes ondulados. En pigmentación el 60% son de color crema, 16% melón y el 8% presentan colores blancos, naranjas y amarillos respectivamente. El 96% presenta superficie lisa brillante y el 4% erizada. En cuanto a consistencia, el 72% fue viscosa y el 28% cremosa y a luz transmitida, el 68% fueron opacas y el 32% translucidas. Las características macroscópicas el 89% son bacilos y el 5% cocos Gram negativos. Mientras el 1% bacilos y el 5% cocos son Gram positivos. Así mismo Garzón (2016) resalta que las bacterias halófilas moderadas en su mayoría son Gram negativas es porque presentan alteraciones en la membrana por un aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos ya que estos ácidos grasos proporcionan estabilidad a las membranas celulares bajo estrés ambiental, lo que ayuda a las bacterias a mantener la integridad de sus membranas en condiciones de alta salinidad y temperaturas extremas. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Ramírez (2004) y Ventosa (2007), donde las bacterias aisladas de muestras de aguas hipersalinas en su mayoría son bacterias Gram negativas aerobias. Desde la posición de Rosas (2017), reporta los cambios morfológicos de las bacterias halófilas, están dadas por la presencia de metales en el medio de cultivo y la abundancia de estas, donde ve variaciones de acuerdo en medio sin metales y con presencia de estas, viendo resultados de colonias blancas, redondas, rugosas, convexas y presentan micelio aéreo, como algunas de las cepas que se observaron en la presente investigación.

En la Tabla 10, los resultados de la concentración y pureza de ADN genómico de las muestras aisladas medido en el NanoDrod (Nabi MicroDigita 2 µl) esta prueba tiene como objetivo cuantificar el ADN extraído, usando el nanoespectrofotómetro a 260nm de longitud de onda. Los valores $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ son ratios utilizados para evaluar la pureza del ADN, comparan la absorbancia de la muestra para

determinar la presencia de contaminantes que podrían interferir con los análisis posteriores del ADN. Los resultados obtenidos van desde los 7,637 ng/μl hasta los 64,558ng/μl. De las muestras con concentración superiores a 13 ng/μl, se realizó diluciones para obtener una concentración final de 10 ng/μl, para realizar una PCR. Los resultados fueron confirmados por Faz (2018), menciona que en su obtención de ADN genómico lo desarrollo por el método tradicional bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), obteniendo en sus resultados una pureza de ADN aceptable, $A_{260/280}$ de 1,6 – 2,05, en cuanto a la concentración de ADN, obtuvo algunos valores por encima de 40 ng/μl, a ello para disminuir la concentración fue necesaria realizar diluciones con agua ultra pura, ya que los niveles por encima o muy por debajo podrían afectar el rendimiento de PCR. Al igual que Magaña (2021), para su extracción de ADN utilizó el método de (CTAB) al 2%, midió las concentraciones en espectrofotometría mediante la lectura de absorbancia ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) utilizando Nanodrop 2000C (Thermo Scientific). Citando a Romoacca (2018), observó que todas las cepas bacterianas presentan una concentración ideal de muestra de ADN, presentan valores óptimos (relación $A_{260/280}$, entre 1,6 – 2,0), así mismo menciona que si están valores por encima de 2,0 determina que hay presencia de ácidos nucleicos (ARN), si están inferiores a 1,6, hay presencia de proteínas.

Los resultados del estudio, fueron comparados por García y Huaco (2018), realiza una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, para evidenciar la presencia del ADN genómico extraído de bacterias halófilas, el cual se encuentra íntegro y de buena calidad, sin presencia de *smears* (banda difusa), dando resultado de 6 cepas, H1 pureza del ADN 260/280 1;850, concentración ADN 370 ng/μl, H2 pureza del ADN 1,786, concentración ADN 250 ng/μl, H3 pureza del ADN 1,867, concentración ADN 280 ng/μl. H4 pureza del ADN 1,824, concentración ADN 310 ng/μl, H5 pureza del ADN 1,895, concentración ADN 360 ng/μl. H6 pureza del ADN 1,875, concentración ADN 300 ng/μl. Los resultados determinan el método usado para la extracción.

En la Tabla 11, los resultados de la amplificación del gen ribosomal 16S de las muestras fueron constatados en el gel de agarosa 1%, por medio del marcador molecular (100 bp DNA Ladder de PROMEGA), así como fueron analizados por el Software (Imaje Lab versión 6.1 BioRad laboratorio) mediante una curva de calibración con el marcador de peso molecular (Lambda DNA HindIII Marker), así

nos permitió dar una aproximación cuanto más precisa de los amplicones. Dando resultados de 1451 hasta 1773 pb, como muestra en la Tabla 11 y Anexo 8.

Los resultados del estudio, fueron confirmados por García y Huaco (2018), se procedió a amplificar el gen ARNr 16S, condiciones de amplificación, utilizó un termociclador (Perkin Elmer 2400) donde realizó una primera desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos con las siguientes etapas: desnaturalización a 94 °C por 45s, hibridación 55 °C por 1 min y extensión, 72 °C por 45s. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C por 7 min, los fragmentos obtenidos se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para poder ver la integridad de la amplificación y determinar los pb, dando resultados de 1550 pb aproximadamente. Los resultados de la preparación del master mix es afirmada por Lopes (2021) obtuvo un volumen final de 25 µl, y su electroforesis de 90V por 60 min visualizó el gel expuesto a un transiluminador Chemidoc MP UV de fotodocumentación (LAMEB), para leer las fotografías utilizó el software ImageLab para poder cuantificar y medir lo pb obtenidos, así como también cuantificados en el NanoDrop para obtener un mínimo de 30 ng. Así mismo Faz (2018), amplificó el ADN con cebadores universales DE 27F y1492R obteniendo bandas de aproximadamente 1400 y 1500 bp según el marcado molecular 1 kb Ladder DNA Markers. Para visualizar los productos de PCR obtenidos analizó en gel de agarosa al 1%, mostrando valores de 1500 pb, indicando que el gel muestra las bandas de amplicón perteneciente a la región del gen 16S ARNr.

Mientras tanto Pal *et al.*, (2020), sus productos de amplicones mostrados en el gel de agarosa al 1%, los extirpó y purificó utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR (Promega), y comprobó la purificación en el fluorómetro (Qubit), así determinar la concentración y la calidad de ADN, para recién mandar a secuenciar, Por otro lado nuestras secuencias fueron afirmadas por Mapelli *et al.*, (2013) que realizó una PCR con los cebadores 27F y 1942R, y las amplificaciones positivas fueron parcialmente secuenciadas por Macrogen Inc., utilizando un solo cebador el 27F.

En la Tabla 12, Figura 14 y Figura 15, resultados de identificación de grupos bacterianos halófilos encontradas, se determinó de las secuencias parciales usando el algoritmo BLASTn del GenBank, se obtuvo la aproximación de familias presentes como: Bacillaceae con 14 cepas (21%), Halomonadaceae con 16 cepas (24%), Vibrionaceae con 3 cepas (4%), Carnobacteriaceae con 2 cepas (3%), Ectothiorhodospiraceae con 2 cepas (3%), Halanaerobiaceae con 2 cepas (3%) y

Idiomarinaceae con 1 cepa (2%), y finalmente un total de 28 cepas (41%) no presentan similitud ninguna.

Los resultados del estudio, fueron confirmados por (Flores *et al.*, 2010) encontró la presencia de la familia Idiomarinaceae y halomonadaceae, mientras Romoacca (2018), halló a la familia Vibrionaceae todas en salinas de maras, por otro lado los resultados de Garzon (2016), afirmó la presencia de familias como Halomonadaceae y Bacillaceae provenientes de las minas de sal Zipaquira (Colombia), tal como afirman, Ruiz (2020), Elshafey *et al.*, (2022) y Montes (2018). Por otro lado en sus estudios de caracterizar ambientes salino Ishikawa *et al.*, (2009), halló la familia Carnobacteriaceae aisladas de algas marinas en descomposición en las costas de Japón, mientras Xia *et al.*, (2017) en su estudio de diversidad microbiana en mares halló, la presencia de la familia Ectothiorhodospiraceae, de igual manera Ravot *et al.*, (2005), encontraron la familia Halanaerobiaceae (Francia). Así afirmamos las familias encontradas en nuestros resultados, pertenecen al grupo de bacterias halófilas, como muestran las investigaciones nacionales e internacionales.

Desde otro punto de vista Pal *et al.*, (2020) detalla en su resultados de identificación con el gen ARNr 16S, solo hasta la clasificación de Orden, porque la alineación y comparación de secuencias con la base de datos no sobrepasan el porcentaje para determinadas especies. Así como reporta en clase y género Menasria *et al.*, (2018).

Las secuencias con similitudes nulas, fueron comparados con Romoacca (2018), al igual que nuestros resultados no llegó a identificar todas las cepas bacterianas, analizadas con el gen ARNr 16S, así como Garzón (2016) detalla que hay en ocasiones donde hay implicaciones en la secuenciación, como errores en amplificación, también afirma que son secuencias no almacenadas en la base de datos, mientras tanto Al-Shuhaib y Hashim, (2023), en su estudio detalla que si la amplificación no es purificada, hay posibilidad de errores de secuenciación por presencia de reactivos y/o aditivos químicos, así como las contaminaciones cruzadas, mala amplificación y manipulación etc.

VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron bacterias halófilas del medio acuático salino Cachipata, del distrito de Hualla, provincia de Víctor Fajardo, región Ayacucho, utilizando el método de filtro de membrana, y se cultivaron en medio de cultivo *Sea Water* en dos concentraciones 10% y 15%.
2. Las bacterias halófilas aisladas de la zona acuática Cachipata se caracterizaron macroscópicamente coloración (crema, blanca, transparente, amarilla, roja), forma de borde (entero, filamentosos), elevación (convexa) y consistencia (cremosa), y los caracteres microscópicamente utilizando la tinción Gram reportando en un 90% Gram (-) y un 10% Gram (+).
3. Se amplificó el gen 16S ARNr, de las bacterias halófilas aisladas, mediante técnicas moleculares. Se extrajo de ADN utilizando kit comercial, se amplificó el gen de interés mediante PCR, y se verificó su integridad y calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, se realizó una secuencia parcial y a través de base de datos bioinformáticas se llegó a determinar 7 aproximaciones familiares, como: Halomonadaceae, Halanaerobiaceae, Bacillaceae, Carnobacteriaceae, Vibrionaceae, Idiomarinaceae y Ectothiorhodospiraceae, todas estas pertenecientes a grupo bacteriano.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar el cultivo de bacterias halófilas en *Sea Water* a concentraciones más elevadas de NaCl, mayores a 20%, ya que así evidenciamos bacterias halófilas extremas, el cual son las menos estudiadas, así también poder aislar arqueas.
2. Los cultivos microbianos incubar en cámaras húmedas así poder mantener el cultivo más días y evitar se evaporen y se sequen, ya que el medio está compuesto en su mayoría por sales, las bacterias halófilas en algunos casos se desarrollan y tienden a crecer y/o adaptarse pasando una semana, así poder obtener el mayor número de bacterias.
3. Realizar secuenciación completa, con ambos cebadores, para así poder obtener secuencias en pares y poder determinar especímenes exactos de bacterias halófilas, así mismo poder hacer un trabajo de *metabarcoding*, para poder encontrar todas las bacterias y arqueas disponibles en ese hábitat o un estudio metagenómico.
4. A los docentes y alumnos de ciencias biológicas a incentivar a desarrollar temas novedosos e innovadoras, así mismo continuar con estudios de otros ambientes extremos de la región de Ayacucho.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaramak, G., Kirtel, O., & Toksoy Öner. (2020). *Halófilos fructanogénicos: Una nueva perspectiva sobre los extremófilos—ScienceDirect*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00009-5>
- Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., & Ammar, E. (2013). Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 255. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-255>
- Al-Shuhaib, M. B. S., & Hashim, H. O. (2023). Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00587-6>
- Altarejos, P. I. (2015). *Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms*. [Proyecto/Trabajo fin de carrera/grado, Universitat Politècnica de València]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/56314>
- Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Makhdoumi, A., Nikou, M. M., Fazeli, S. A. S., Schumann, P., Spröer, C., Sánchez-Porro, C., & Ventosa, A. (2016). *Oceanobacillus halophilus* sp. Nov., a novel moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1317-1322. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000952>
- Amoozegar, M. A., Safarpour, A., Noghabi, K. A., Bakhtiary, T., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01895>
- Anbu, P., & Hur, B. K. (2014). Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium *Bacillus licheniformis* PAL05 that is able to secrete solvent-stable lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(5), 528-534. <https://doi.org/10.1002/bab.1202>
- Azahara Pérez, D. (2014). *Microorganismos halófilos en ambientes salinos de Andalucía: Estudio taxonómico numérico y molecular*. Universidad de Granada.
- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 226, 3-6. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Berlendis, S., Cayol, J.-L., Verhé, F., Laveau, S., Tholozan, J.-L., Ollivier, B., & Auria, R. (2010). First Evidence of Aerobic Biodegradation of BTEX Compounds by Pure Cultures of *Marinobacter*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), 1992-1999. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8746-1>
- Birren, B., & Lai, E. (2012). *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide*. Academic Press.
- Boros, E., & Kolpakova, M. (2018). A review of the defining chemical properties of soda lakes and pans: An assessment on a large geographic scale of Eurasian inland saline surface waters. *PLOS ONE*, 13(8), e0202205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202205>
- Burgess, S. A., Flint, S. H., Lindsay, D., Cox, M. P., & Biggs, P. J. (2017). Insights into the *Geobacillus stearothermophilus* species based on phylogenomic principles. *BMC Microbiology*, 17(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1047-x>

- Castelán-Sánchez, H. G., Elorrieta, P., Romoacca, P., Liñan-Torres, A., Sierra, J. L., Vera, I., Batista-García, R. A., Tenorio-Salgado, S., Lizama-Uc, G., Pérez-Rueda, E., Quispe-Ricalde, M. A., & Dávila-Ramos, S. (2019). Intermediate-Salinity Systems at High Altitudes in the Peruvian Andes Unveil a High Diversity and Abundance of Bacteria and Viruses. *Genes*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/genes10110891>
- Cornejo Amelia, Beatriz Rend Romero, Alejandra Serrato Díaz, & ón Aguilar, Martha Graciela Rocha Munive. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (Prmera edición). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC SEMARNAT).
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current opinion in microbiology*, *25*, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>
- Deharvengt, S. J., Petersen, L. M., Jung, H.-S., & Tsongalis, G. J. (2020). Chapter 13—Nucleic acid analysis in the clinical laboratory. En W. Clarke & M. A. Marzinke (Eds.), *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)* (pp. 215-234). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00013-2>
- Delgado, O., Márquez, M. C., & Ventosa, A. (2006). Isolation and characterization of moderately halophilic bacteria from saline environments in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(5), 848-856.
- Diba, H., Cohan, R. A., Salimian, M., Mirjani, R., Soleimani, M., & Khodabakhsh, F. (2021). Isolation and characterization of halophilic bacteria with the ability of heavy metal bioremediation and nanoparticle synthesis from Khara salt lake in Iran. *Archives of Microbiology*, *203*(7), 3893-3903. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02380-w>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *32*(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
- Elshafey, N., Hamedo, H., Mansour, M., & Awny, A. (2022). Molecular identification of Halophilic Microorganisms producing Exo-Halozymes by a culture-dependent approach from the North Sinai Solar saltern. *THE EGYPTIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY (Botany)*. <https://doi.org/10.5455/egyjebb.20220726105555>
- Faveri, M., Figueiredo, L. C., Shibli, J. A., Pérez-Chaparro, P. J., & Feres, M. (2015). Microbiological diversity of peri-implantitis biofilms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *830*, 85-96. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11038-7_5
- Faz Tapia, V. J. (2018). *Aislamiento e identificación de bacterias termófilas provenientes de la fuente geotermal Papallacta ubicada en la provincia de Napo* [bachelorThesis, Quito: Universidad de las Américas, 2018]. <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10618>
- Fernández, A. B., Ghai, R., Martín-Cuadrado, A.-B., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F., & Ventosa, A. (2014). Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology*, *88*(3), 623-635. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12329>
- Flores, M. L., Zavaleta, A. I., Zambrano, Y., Cervantes, L., & Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*, *13*(1), 42-46. <https://doi.org/10.15381/ci.v13i1.3224>

- Foo, Y. H., Gao, Y., Zhang, H., & Kenney, L. J. (2015). Cytoplasmic sensing by the inner membrane histidine kinase EnvZ. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(3), 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.04.005>
- Fourçans, A., Solé, A., Diestra, E., Ranchou-Peyruse, A., Esteve, I., Caumette, P., & Duran, R. (2006). Vertical migration of phototrophic bacterial populations in a hypersaline microbial mat from Salins-de-Giraud (Camargue, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 57(3), 367-377. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00124.x>
- García Hennings Téllez, E. D., & Huaco Alamo, H. S. (2018). *Aislamiento, Caracterización Bioquímica, Molecular y Evaluación de la Capacidad de Captar NAFL In Vitro de Bacterias Halófilas Provenientes de las Lagunas de Mejía, Arequipa—2017*. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/8004>
- Garzón Rubiano, V. M. (2016). Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia [masterThesis, Universidad de La Sabana]. En *Intellectum Repositorio Universidad de La Sabana*. <https://intellectum.unisabana.edu.co/handle/10818/22883>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hassan, Z., & Khan, G. (2024). PCR-Based Techniques. En Z. Hassan & G. Khan (Eds.), *Molecular Techniques for Studying Viruses: Practical Notes* (pp. 25-31). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-99-8097-0_4
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., Hershendorf, A. W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D. A., Finstad, K. M., Amundson, R., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, 1(5), 1-6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>
- Ishikawa, M., Tanasupawat, S., Nakajima, K., Kanamori, H., Ishizaki, S., Kodama, K., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, Y., Yamamoto, Y., & Yamasato, K. (2009). *Alkalibacterium thalassium* sp. Nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. Nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp. Nov. And *Alkalibacterium kapii* sp. Nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(5), 1215-1226. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65602-0>
- Jácome Albán, S. A. (2018). *Caracterización de bacterias halófilas de la mina de sal en la parroquia Salinas del cantón Guaranda*. [bachelorThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/9765>
- Kanekar, P., Kanekar, S., Kelkar, A., & Dhakephalkar, P. (2012). Halophiles – Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications. En *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment* (pp. 1-34). https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_1
- Karan, R., Capes, M. D., & DasSarma, S. (2012). Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-4>
- Kraková, L., Šoltys, K., Budiš, J., Grivalský, T., Ďuriš, F., Pangallo, D., & Szemes, T. (2016). Investigation of bacterial and archaeal communities: Novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional

- DGGE-cloning. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 20(5), 795-808. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0855-5>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). *DNA Barcodes: Methods and Protocols* (W. J. Kress & D. L. Erickson, Eds.; pp. 3-8). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Kumar, A., & Chordia, N. (2015). In Silico PCR Primer Designing and Validation. En C. Basu (Ed.), *PCR Primer Design* (pp. 143-151). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_10
- Kumar, V., Saxena, J., & Tiwari, S. K. (2016). Description of a halocin-producing *Haloferax larsenii* HA1 isolated from Pachpadra salt lake in Rajasthan. *Archives of Microbiology*, 198(2), 181-192. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1175-3>
- Kushner, D. J. (1992). Crecimiento y nutrición de bacterias halófilas. En *La biología de las bacterias halófilas* (1ra ed).
- Le Borgne, S., Paniagua, D., & Vazquez-Duhalt, R. (2008). Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(2-3), 74-92. <https://doi.org/10.1159/000121323>
- Lopes, J. C. (2021). Prospecção de proteínas anticongelantes (AFP) em microrganismos da antártica visando aplicações biotecnológicas. Universidade Federal De Santa Catarina Centro De Ciências Biológicas.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Madigan Michael T., Daniel H. Buckley, David A. Stahl, Kelly S. Bender, & Matthew Sattley. (2019). *Brock Biology of Microorganisms – Michael T. Madigan – 15th Edition* (15ava ed.).
- Magaña Tzuc, M. C. (2021). *Potencial biofertilizante de bacterias halófilas aisladas de suelos salinos obtenidos de la reserva de la biósfera de los Petenes*. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/4606>
- Mamani Morales, J. I. (2022). *Descripción de enzimas proteolíticas y obtención de una proteasa recombinante a partir del análisis de datos del genoma de Chromohalobacter salexigens MP25462* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. Repositorio Institucional UNSAAC. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/6710>
- Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., & Borin, S. (2013). Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with Salicornia Growing in Tunisian Hypersaline Soils. *BioMed Research International*, 2013(1), 248078. <https://doi.org/10.1155/2013/248078>
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387-402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Martínez-Cánovas, M. J., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Páez, R., & Quesada, E. (2004). *Idiomarina fontislapedosi* sp. Nov. And *Idiomarina ramblicola* sp. Nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1793-1797.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63172-0>
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2354-2359. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2354-2359.2001>
- Mata Gómez, J. A. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger* [Doctoral thesis, Granada: Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/973>
- Mayerhöfer, T. G., Pahlow, S., & Popp, J. (2020). The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem*, 21(18), 2029-2046. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>
- Men, A. E., Wilson, P., Siemering, K., & Forrest, S. (2008). Sanger DNA Sequencing. En *Next Generation Genome Sequencing* (pp. 1-11). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527625130.ch1>
- Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Si Bachir, A., Dekak, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2018). Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 207, 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011>
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Moghaddam, J. A., Boehringer, N., Burdziak, A., Kunte, H.-J., Galinski, E. A., & Schäberle, T. F. (2016). Different strategies of osmoadaptation in the closely related marine myxobacteria *Enhygromyxa salina* SWB007 and *Plesiocystis pacifica* SIR-1. *Microbiology*, 162(4), 651-661. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000250>
- Montes, J. Z. (2018). *Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Moreno, M. de L., García, M. T., Ventosa, A., & Mellado, E. (2009). Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 59-71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00651.x>
- Mukhtar, S., Malik, D. K. A., & Mehnaz, S. (2020). *Osmoadaptation in halophilic bacteria and archaea*. <http://digitalrepository.fccollege.edu.pk/handle/123456789/1076>
- Mukhtar, S., Mehnaz, S., Mirza, M. S., Mirza, B. S., & Malik, Kauser Abdulla. (2018). Diversity of *Bacillus*-like bacterial community in the rhizospheric and non-rhizospheric soil of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*), and characterization of osmoregulatory genes in halophilic *Bacilli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(8), 567-579. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0544>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Síntesis específica de ADN *in vitro* a través de una reacción en cadena catalizada por polimerasa. En *Methods in Enzymology* (Vol. 155, pp. 335-350). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)

- Naranjo, E., Otero, A., & Martínez-Zubiaur, Y. (2013). Optimización de la amplificación por PCR del gen de la endoglucanasa de *Ralstonia solanacearum*. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3), 211-214.
- Nath, A. (2016). Insights into the sequence parameters for halophilic adaptation. *Amino Acids*, 48(3), 751-762. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2123-x>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Oren, A. (2009). Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3), 193-204. <https://doi.org/10.3354/ame01297>
- Oren, A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.005>
- Oren, A. (2016). Life in Hypersaline Environments. En C. J. Hurst (Ed.), *Their World: A Diversity of Microbial Environments* (pp. 301-339). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28071-4_8
- Pal, S., Biswas, R., Misra, A., Sar, A., Banerjee, S., Mukherjee, P., & Dam, B. (2020). Poorly known microbial taxa dominate the microbiome of hypersaline Sambhar Lake salterns in India. *Extremophiles*, 24(6), 875-885. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01201-0>
- Petrović, U., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitas, A. (2002). Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular Microbiology*, 45(3), 665-672. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03021.x>
- Pluzhnik, E., Nikulchev, E., & Payain, S. (2014). Laboratory Test Bench for Research Network and Cloud Computing. *International Journal of Communications, Network and System Sciences*, 07(07), 243-247. <https://doi.org/10.4236/ijcns.2014.77026>
- Ramirez Ninfa José Antonio Serrano R., 2 Horacio Sandoval T. (2006). *Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México*. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>
- Ravot, G., Casalot, L., Ollivier, B., Loison, G., & Magot, M. (2005). *rdIA*, un nuevo gen que codifica una proteína similar a la rodanasa en *Halanaerobium congolense* y otros anaerobios reductores de tiosulfato. *Research in Microbiology*, 156(10), 1031-1038. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.05.009>
- Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R. S., Joshi, K., Padhiyar, S., Bhalani, H., Kheni, J., Vyas, U. M., & Parakhia, M. V. (2024b). Extremozymes and compatible solute production potential of halophilic and halotolerant bacteria isolated from crop rhizospheric soils of Southwest Saurashtra Gujarat. *Scientific Reports*, 14(1), 15704. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63581-z>
- Rekadwad, B. N., & Khobragade, C. N. (2017). Morphotypes and pigment profiles of halophilic bacteria: Practical data useful for novelty, taxonomic categorization and for describing novel species or new taxa. *Data in Brief*, 13, 609-619. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.06.039>
- Romoacca Hanco, P. (2018). Identificación molecular mediante el gen ribosomal 16s y evaluación de las capacidades enzimáticas de bacterias halófilas aisladas en zonas salinas del departamento del Cusco. *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*. <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/4428>

- Roohi, A., Ahmed, I., Iqbal, M., & Jamil, M. (2012). *Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of karak, pakistan.*
- Rosas Ramirez, J. R. (2017). *Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados.* <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/79794>
- Ruiz Ríos, L. (2020). *Bacterias halófilas como una fuente de recursos bióticos: Una visión de lo evolutivo a lo biotecnológico.* Universidad De Ciencias Y Artes De Chiapas.
- Sasaki, T., Razak, N. W. A., Kato, N., & Mukai, Y. (2012). Characteristics of Halorhodopsin–Bacterioruberin Complex from *Natronomonas pharaonis* Membrane in the Solubilized System. *Biochemistry*, *51*(13), 2785-2794. <https://doi.org/10.1021/bi201876p>
- Schneegurt, M. A. (2012). Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. En R. H. Vreeland (Ed.), *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* (pp. 35-58). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5539-0_2
- Sekar, A., & Kim, K. (2020). Halophilic Bacteria in the Food Industry. En *Encyclopedia of Marine Biotechnology* (pp. 2061-2070). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119143802.ch91>
- Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H., & Meddows-Taylor, S. (2017). Diversity Analysis and Bioresource Characterization of Halophilic Bacteria Isolated from a South African Saltpan. *Molecules*, *22*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules22040657>
- Shen, C.-H. (2019). Chapter 7—Detection and Analysis of Nucleic Acids. En C.-H. Shen (Ed.), *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 167-185). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1135-1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Slater, G. W., Guillouzic, S., Gauthier, M. G., Mercier, J.-F., Kenward, M., McCormick, L. C., & Tessier, F. (2002). Theory of DNA electrophoresis (~ 1999 –2002 ½). *ELECTROPHORESIS*, *23*(22-23), 3791-3816. <https://doi.org/10.1002/elps.200290002>
- Srivastava, P., & Kowshik, M. (2013). Mechanisms of Metal Resistance and Homeostasis in Haloarchaea. *Archaea*, *2013*, 732864. <https://doi.org/10.1155/2013/732864>
- Stan-Lotter, H., & Fendrihan, S. (2013). Survival Strategies of Halophilic Oligotrophic and Desiccation Resistant Prokaryotes. En J. Seckbach, A. Oren, & H. Stan-Lotter (Eds.), *Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress* (pp. 233-248). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_9
- Stellwagen, N. C. (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *ELECTROPHORESIS*, *30*(S1), S188-S195. <https://doi.org/10.1002/elps.200900052>
- Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, *452*(1-2), 22-25. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00663-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00663-8)
- Teach the Microbiome. (2017). *Sequencing the microbiome.* Teach the Microbiome. <https://teachthemicrobiome.weebly.com/sequencing-the-microbiome.html>
- Uzman, A. (2001). *Molecular Cell Biology* (4th edition) Harvey Lodish, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and James Darnell; Freeman & Co., New York, NY, 2000, 1084 pp., list price

- \$102.25, ISBN 0-7167-3136-3. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Van de Peer, Y., E, R., S, de H., A, C., P, D. R., & R, D. W. (1999). Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, 27(1). <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.179>
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213-218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504-544. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.2.504-544.1998>
- Ward, D. M., & Brock, T. (1978). *Biodegradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos | Microbiología Aplicada y Ambiental*. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.35.2.353-359.1978>
- Warren, J. K. (2016). Halotolerant Life in Feast or Famine: Organic Sources of Hydrocarbons and Fixers of Metals. En J. K. Warren, *Evaporites* (pp. 833-958). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13512-0_9
- Widderich, N., Höppner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S. H. J., & Bremer, E. (2014). Biochemical Properties of Ectoine Hydroxylases from Extremophiles and Their Wider Taxonomic Distribution among Microorganisms. *PLOS ONE*, 9(4), e93809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093809>
- Williams, W. D. (2002). Environmental threats to salt lakes and the likely status of inland saline ecosystems in 2025. *Environmental Conservation*, 29(2), 154-167. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000103>
- Xia, J., Zhao, J.-X., Sang, J., Chen, G.-J., & Du, Z.-J. (2017). Halofilum ochraceum gen. Nov., sp. Nov., a gammaproteobacterium isolated from a marine solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 932-938. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001718>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Youssef, N. H., Savage-Ashlock, K. N., McCully, A. L., Luedtke, B., Shaw, E. I., Hoff, W. D., & Elshahed, M. S. (2014). Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the Halobacteriales. *The ISME Journal*, 8(3), 636-649. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.165>

X. ANEXOS

Anexo 1: Lugar de toma de muestra



Anexo 2: Recolección de muestras del manantial Cachipata

Fotografía 1: Parque del Distrito de Hualla.



Fotografía 2 y 3: Equipo e EPPs para toma de muestra.



Fotografía 4 y 5: Manantial salino de Cachipata. **Fotografía 6:** medición de pH del agua.



Anexo 3: Análisis fisicoquímico del agua



MULTISERVICIOS AGROLAB
INGENIEROS TRABAJANDO POR UN AGRO SOSTENIBLE
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES

ASESORÍA Y CAPACITACIÓN EN:
 - EVALUACIÓN Y MUESTREO DE SUELOS. - INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS AGRÍCOLA.
 - USO, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE SUELOS. - ESTUDIOS DE IMPACTO AMBIENTAL.
 - AGRICULTURA SUSTENTABLE

ANÁLISIS DE AGUA **1150869**

SOLICITANTE: Sr. Edison Palomino Guerrero

PROYECTO: Bacterias halófilas de un ambiente acuático salino identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024.

FUENTE: Manantial Hualla **ALTITUD:** 4285 m.s.n.m. **COORDENADAS:** 13°54'51"S; 74°41'16"W

REGIÓN: Ayacucho **PROVINCIA:** Víctor Fajardo **DISTRITO:** Hualla

FECHA DE INGRESO: 19-04-24 **FECHA DE RESULTADOS:** 22-04-24

RESULTADOS FISICO – QUÍMICOS

Nº Laboratorio	A01350
Nº Campo	Manantial Hualla
C.E. (dS/m)	379.20
Calcio (meq/L)	72.50
Magnesio (meq/L)	3.00
Potasio (meq/L)	1.18
Nitratos (meq/L)	1.90
Carbonatos (meq/L)	0.00
Bicarbonatos (meq/L)	9.63
Cloruros (meq/L)	5530
Sulfatos (meq/L)	28.14
Fosfatos (ppm)	0.04
Salinidad (%)	24.31



Ph.D. Marhleni Cerda Gómez
Responsable de Laboratorio

22-04-2024



Anexo 5: Características culturales y microscópicas



M2C15(2) [7]



M1C15(3) [17]



M2C10(3) [10]



M2C10(2) [11]



M1C10(2) [8]



M1C15(1) [1]



M2C15(3) [5]

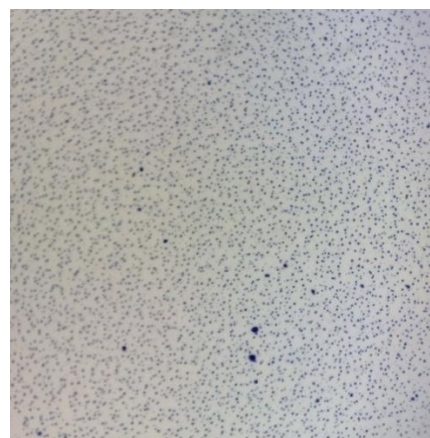
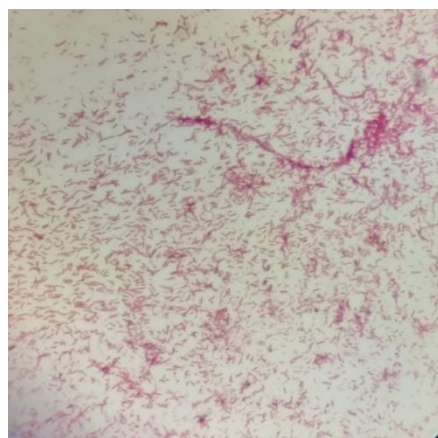


M2C15 (3) [14]



M1C10(1) [3]

Fotografía 1. Caracteres culturales de cultivos, de pigmentación, consistencia, forma, borde.

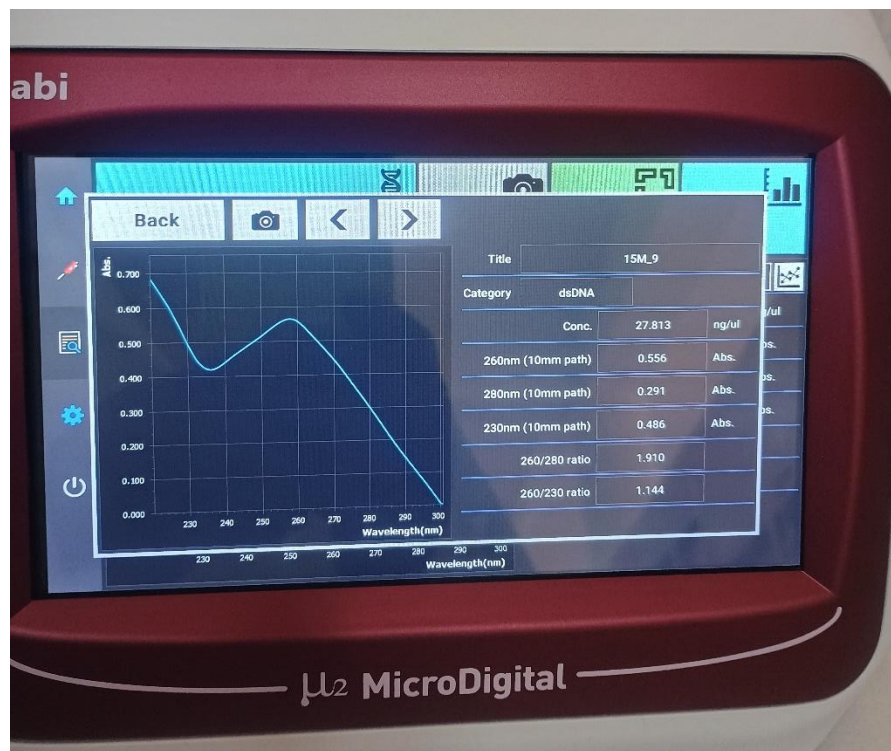


Fotografía 2. Tinción Gram, observación al microscopio a 100X, de Gram positivos y Gram negativos.

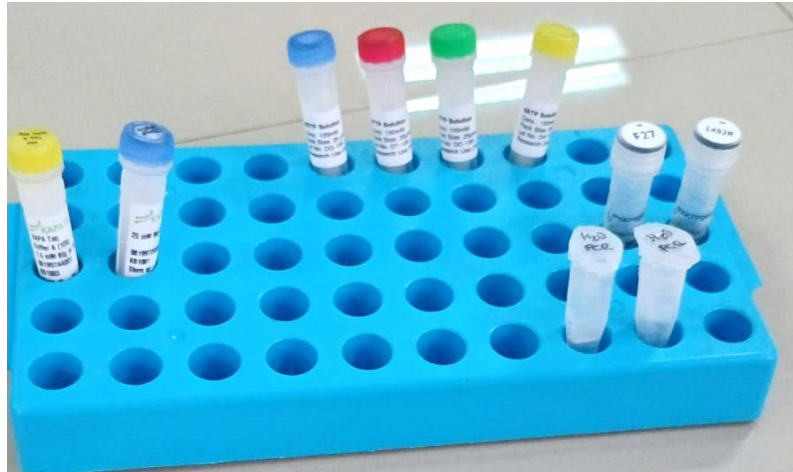
Anexo 6: El kits de extracción de ADN “Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit”



Anexo 7: Equipo de Nanoespectrofotómetro, midiendo la longitud de onda y la absorbancia a 260nm.



Anexo 8. kits para la amplificación del gen ARNr 16S.



Anexo 9: Preparación del tampón de carga Buffer TBE (0,5X) 1L

Tris base, 54 g; ácido bórico, 27.5 g; 0.5 M EDTA pH 8, 20 ml. Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada así se obtiene buffer TBE 5X, a partir de lo preparado se extrae 10ml DE TBE 5X más 90ml de agua destilada, así obtener buffer TBE 0,5X. El EDTA debe estar preparado previamente: Se añade al agua destilada o desionizada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad adecuada de EDTA para obtener una concentración final de 0.5 M. Se ajusta el pH con NaOH hasta que el EDTA se disuelva y llegue la solución a un pH de 8. Se ajusta el volumen, se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente (Green & Sambrook, 2012).

Anexo 10: Preparación de gel de Agarosa al 1%

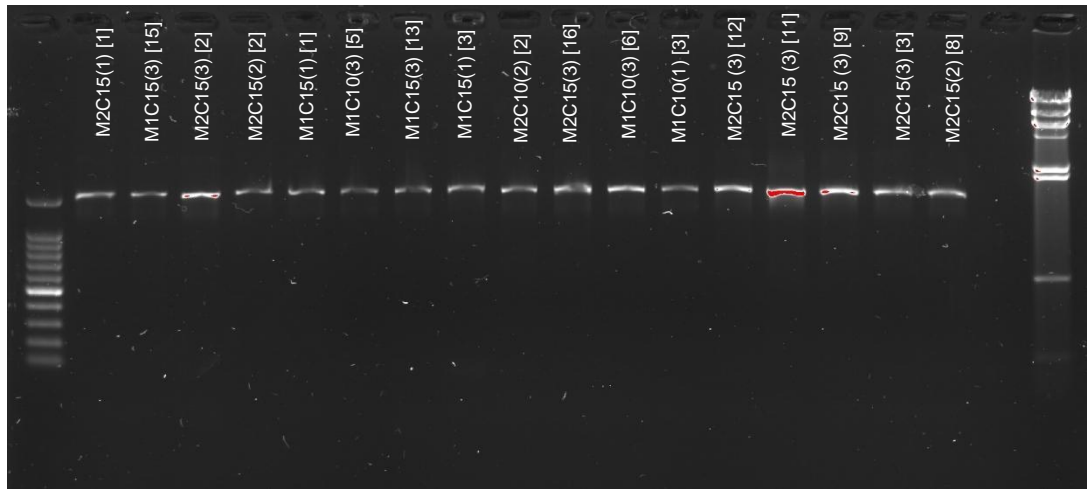
Componentes:

- 1g agarosa (Bioline)
- 100ml de Buffer TBE 0,5X
- 1µl Syber Safe (Invitrogen)

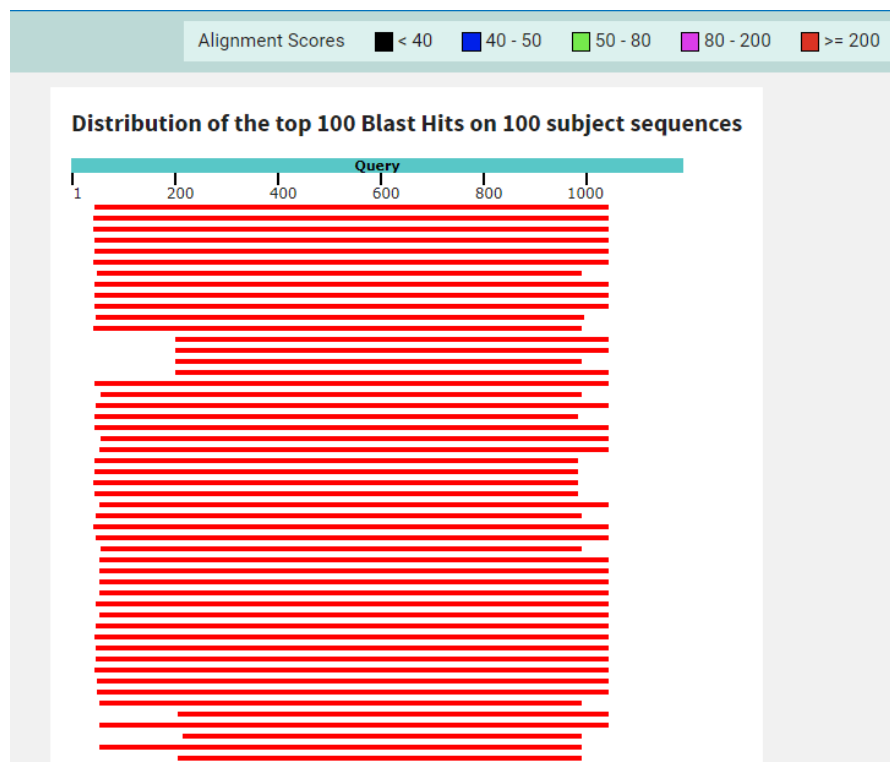
Preparación:

- Pesar 1g de agarosa y mezclar con 100ml de tampón TBE 0,5X, homogenizar.
- Disolver y llevar a ebullición.
- Añadir 1µl de Syber Safe a la mezcla de agarosa y homogenizar.
- Verter la mezcla de agarosa a la cubeta con el peine puesto y dejar gelificar aproximadamente de 15 a 30 minutos.
- Colocar el gel en la cámara electroforética y cubrir con TBE 0,5X, después quitar con suavidad el peine, adaptada de (Green & Sambrook, 2012).

Anexo 11: Producto del gen ribosomal 16S, en gel de agarosa 1%.

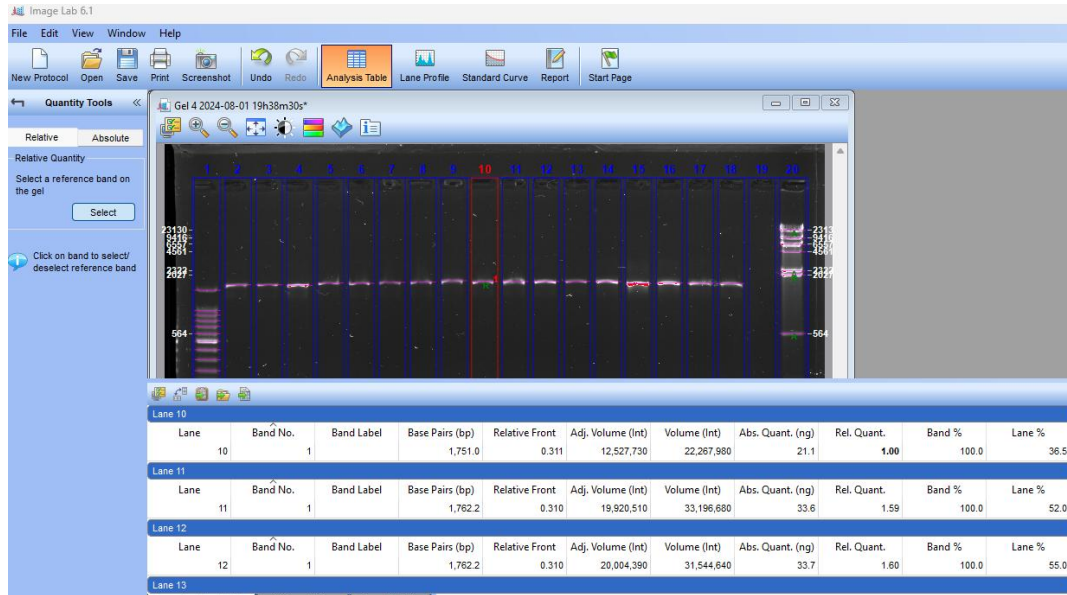


Anexo 12. Resultado del algoritmo Blast.



Anexo 13: Software Image Lab para medir los resultados de pares de base.

<https://www.bio-rad.com/es-pe/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z>



Anexo 14: Matriz de consistencia

Título: Bacterias halófilas de un ambiente salino acuático, identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024.					
PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>Problema ¿Qué grupo de bacterias halófilas existirán en el ambiente acuático salino “Cachipata” de la provincia de Víctor Fajardo?</p>	<p>Objetivo general: Identificar mediante el gen ribosomal 16S bacterias halófilas aisladas de un ambiente acuático salino.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Aislar bacterias halófilas del ambiente acuático “Cachipata”. ● Caracterizar pruebas orientativas de bacterias aisladas del ambiente acuático “Cachipata”. ● Usar técnica molecular para amplificar el gen ribosomal 16S de las bacterias halófilas. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hábitats extremos. ● Microorganismos de ambientes extremos. ● Microorganismos halófilos. ● Bacterias halófilas. ● Osmoadaptación de bacterias halófilas. ● Actividad biológica de las bacterias halófilas. ● Aislamiento de microorganismos halófilos. ● Condiciones de cultivo de bacterias halófilas. ● Características de bacterias halófilas. ● Extracción y cuantificación de ADN. ● PCR. ● Gen ARNr 16S. ● Electroforesis. ● Secuencia Sanger. 	<p>Existen diversidad de grupos bacterianos halófilos en el ambiente salino de “Cachipata” ubicado en la provincia de Víctor Fajardo.</p>	<p>Variable Bacterias halófilas</p> <p>Indicador -Identificación molecular con el gen ribosomal 16S. -Características de pruebas orientativas.</p>	<p>Diseño de investigación Descriptivo</p> <p>Tipo de Investigación Aplicada descriptiva</p> <p>Unidad de análisis Muestras de agua a concentración de 7,5 L</p> <p>Población La totalidad de bacterias halófilas capturadas de la fuente acuática salina.</p> <p>Técnica Método microbiológico, identificación por método molecular y bioinformático mediante el gen ribosomal 16S.</p> <p>Análisis estadístico Diseño completamente al Azar</p>

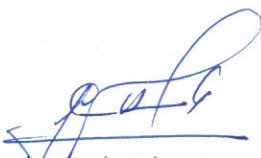
**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Edison PALOMINO GUERRERA
RESOLUCIÓN DECANAL N° 096-2025-UNSCH-FCB-D


En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día viernes once de abril del año dos mil veinticinco; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente encargado el Dr. Pedro Ayala Gómez con memorando N° 063-2025-UNSCH-FCB con fecha once de abril del año dos mil veinticinco, el Dr. Jesús Javier Ñaccha Urbano (miembro – jurado), la Dra. Nilda Aurea Apayco Espinoza (miembro – jurado), el Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe (miembro – jurado), la Dra. Vidalina Andía Ayme (miembro – asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel Moscoso García; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Bacterias halófilas de un ambiente salino acuático, identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024**, presentado por el Bach. Edison PALOMINO GUERRERA; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Jesús Javier Ñaccha Urbano	16	15	16
Dra. Nilda Aurea Apayco Espinoza	17	17	17
Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe	17	15	16
PROMEDIO			16

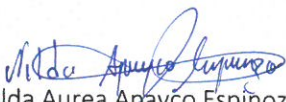
El sustentante alcanzó el promedio de 16 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis de la tarde con treinta minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.



Dr. Pedro Ayala Gómez
Presidente (e)



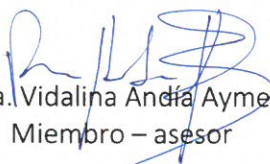
Dr. Jesús Javier Ñaccha Urbano
Miembro - jurado



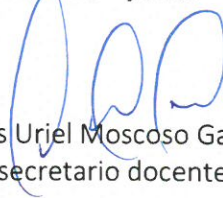
Dra. Nilda Aurea Apayco Espinoza
Miembro – Jurado



Mg. Rilder Nemesio Gastelú Quispe
Miembro – jurado



Dra. Vidalina Andía Ayme
Miembro – asesor



Mg. Luis Uriel Moscoso García
secretario docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

N° 021-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Bacterias halófilas de un ambiente salino acuático, identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024**, por EDISON PALOMINO GUERRERA; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 11%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 08 de mayo de 2025.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología
Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Bacterias halófilas de un ambiente salino acuático, identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024

por EDISON PALOMINO GUERRERA

Fecha de entrega: 07-may-2025 07:46p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2669684641

Nombre del archivo: PALOMINO_GUERRERA-Edison-pregrado-2025_TURNITIN_PDF_1.pdf (1.49M)

Total de palabras: 15808

Total de caracteres: 82942

Bacterias halófilas de un ambiente salino acuático, identificados con el gen ribosomal 16S. Ayacucho, 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%	11%	1%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	5%
2	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	2%
3	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1%
7	colposdigital.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	<1%
8	repository.javeriana.edu.co Fuente de Internet	<1%
9	Submitted to Universidad de Guayaquil Trabajo del estudiante	<1%
10	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo