



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Caracterización taxonómica de nuevas bacterias alcalófilas

Tesina de Grado

Licenciatura en Bioquímica

Valentina Machin

Tutor: Dr. Javier Menes

***Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental-Cátedra
de Microbiología (Unidad Asociada a Facultad de Ciencias)***

Índice

Resumen.....	4
1. Introducción	5
1.1 Lagos alcalinos.....	6
1.2 Microorganismos extremófilos	7
1.3 Importancia de bacterias alcalófilas a nivel industrial	8
1.4 Taxonomía bacteriana.....	10
1.4.1 Rangos taxonómicos procariotas existentes.....	10
1.4.2 Análisis fenotípicos.....	11
1.4.3 Quimiotaxonomía.....	12
1.4.4 Análisis genotípicos	12
1.4.5 Relación de bases de ADN (% en moles de G+C).....	12
1.4.6 Hibridación ADN-ADN	13
1.4.7 Comparación de secuencia de genes individuales.....	14
1.4.8 Análisis filogenético.....	15
2. Objetivo	16
3. Materiales y métodos	17
3.1 Aislamiento.....	18
3.2 Tinción Gram	18
3.3 Tinción de esporas.....	18
3.4 Microscopía electrónica	18
3.5 Movilidad.....	18
3.6 Caracterización genotípica	19
3.6.1 Extracción de ADN genómico	19
3.6.2 Electroforesis en gel de agarosa	19
3.6.3 Amplificación del gen 16S ARNr	19
3.6.4 Amplificación del gen de la subunidad beta de la girasa (<i>gyrB</i>)	20
3.7 Construcción de árboles filogenéticos	20
3.8 Caracterización fisiológica	20
3.8.1 Crecimiento en condiciones anaerobias	20
3.8.2 Rango de cloruro de sodio	20
3.8.3 Rango de temperatura de crecimiento.....	21

3.8.4 Rango de tolerancia de pH	21
3.9 Caracterización bioquímica	21
3.9.1 Oxidación-fermentación de glucosa y otros carbohidratos	22
3.9.2 Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía	22
3.9.3 Utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno y energía	23
3.9.4 Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía	24
3.9.5 Utilización de sistemas estandarizados para la determinación de características fenotípicas adicionales (API)	24
3.10 Caracterización quimiotaixonómica.....	24
4. Resultados y discusión	25
4.1 Descripción macroscópica de las cepas M30 y M8	26
4.2 Descripción microscópica de las cepas M30 y M8	27
4.3 Caracterización genómica	28
4.3.1 Comparación de secuencia del gen 16S del ARNr de las cepas M30 y M8 con secuencias en bancos de datos públicos.....	28
4.3.2 Análisis filogenético de la secuencia del gen 16S del ARNr	28
4.3.3 Análisis de secuencia del gen <i>gyrB</i>	30
4.4 Caracterización bioquímica de la cepa M30	30
4.5 Caracterización quimiotaixonómica de la cepa M30	34
4.6 Caracterización bioquímica de la cepa M8	37
5. Conclusiones y perspectivas.....	41
Referencias.....	44
Agradecimientos	47

Resumen

Los lagos de soda o lagos alcalinos, son ambientes fuertemente alcalinos con valores de pH que van desde 9 hasta 12 aproximadamente, cuya alcalinidad se debe a las altas concentraciones de sales de carbonato. También se puede encontrar cloruro de sodio en concentraciones relativamente elevadas por lo que además de caracterizarse por su alcalinidad, se caracterizan por su salinidad. A pesar de las condiciones extremas que presentan los lagos de soda, son una notable fuente de biodiversidad que se encuentra predominada por microorganismos procariotas. Aquellos microorganismos que habitan los lagos de soda tienen que tener necesariamente la capacidad de tolerar tales condiciones y son denominados alcalófilos. Estos microorganismos tienen importantes aplicaciones industriales debido a su capacidad de producir enzimas alcalinas extracelulares que resultan ser interesantes ya que pueden funcionar a altos pH, temperaturas y/o concentraciones de sal. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar desde el punto de vista taxonómico dos cepas bacterianas, las cuales fueron aisladas del sedimento de un lago alcalino localizado en el Valle del Rift (Tanzania) denominado lago Magadi.

La utilización de diversas fuentes de carbono se ensayó con el kit API50CH (bioMérieux) y con un medio basal mínimo suplementado con las diferentes fuentes de carbono y/o nitrógeno. El perfil enzimático se realizó con el kit APIZYM (bioMérieux) y con diversos medios de cultivo. Para M30 se estudió además la composición de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas de la membrana (estudios quimiotaxonómicos).

M30 es un bacilo gram positivo formador de esporas, aerobio estricto, catalasa positivo, oxidasa negativo y no móvil. Posee una diversidad de enzimas alcalófilas: gelatinasa, amilasa, esculinasa, proteasa (de caseína), celulasas, xilanasas, pectinasas, fosfatasa alcalina, esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, α -quimotripsina, β -galactosidasa y α -glucosidasa. Los lípidos polares detectados fueron fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol. En base al análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, la cepa M30 fue identificada como perteneciente al género *Bacillus* y la especie cercana más relacionada (96,8%) fue *Bacillus aurantiacus*. El resultado de los ensayos filogenéticos, quimiotaxonómicos y bioquímicos revelan una clara diferenciación con el resto de otras especies tipo del género *Bacillus*, por lo cual se propone como una nueva especie del género.

M8 es un coco gram positivo, aerobio estricto, catalasa positivo, oxidasa negativo y no móvil. De las enzimas ensayadas solo se detectó la presencia de leucina arilamidasa. En base al análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, fue clasificado dentro del género *Nesterenkonia* (filo *Actinobacteria*) y si bien posee muchas diferencias fenotípicas con especies tipo cercanas, su clasificación como nueva especie requiere la realización de ensayos adicionales para verificarlo.

1. Introducción

1.1 Lagos alcalinos

Los lagos alcalinos o lagos de soda, son ambientes fuertemente alcalinos con valores de pH que van desde 9 hasta 12 aproximadamente.

La alcalinidad de dichos lagos se debe a las altas concentraciones de sales de carbonato. El cloruro de sodio también se puede encontrar en elevadas concentraciones en estos lagos por lo que además de caracterizarse por su alcalinidad también se caracterizan por su salinidad (Horikoshi, 2011).

La distribución de estos lagos es amplia, se pueden encontrar en varias partes del mundo pero suelen desarrollarse en áreas subtropicales y con presencia de actividad tectónica (Schagerl, 2016). Los lagos de soda más estudiados son los que se ubican en el Valle de Rift en Kenia y Tanzania (África Oriental). En estas áreas la actividad tectónica crea depresiones superficiales que son a menudo cuencas sin salida (figura 1B) donde el agua subterránea y aguas que fluyen de tierras próximas circundantes quedan estancadas. Por las características climáticas, estas zonas se caracterizan por presentar altas tasas de evaporación que exceden el flujo de entrada, por lo que las sales presentes tienden a acumularse (Horikoshi, 2011).

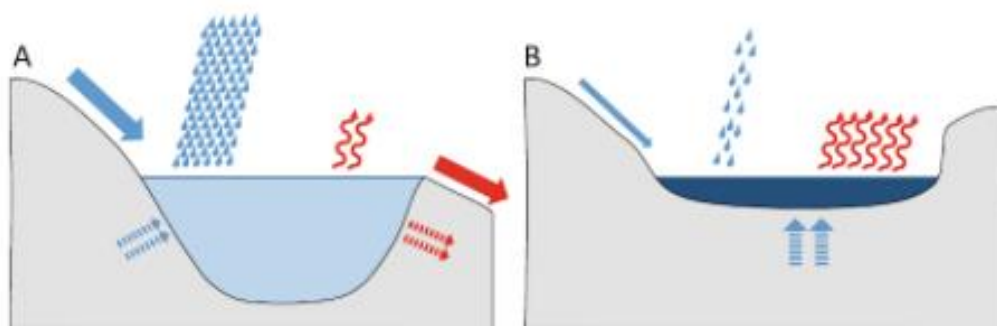


Figura 1. Lago abierto vs. Lago cerrado. A: Lago abierto; en azul se muestra el total de agua que reciben estos lagos (lluvia, ríos y manantiales subterráneos) y en rojo se observa las formas de salida que puede tener el agua en estos tipos de lagos (filtración, evaporación, etc.). B: Lago cerrado; estos lagos reciben menor cantidad de lluvias y la tasa de evaporación es mayor al flujo de entrada, lo que hace que las sales presentes en el agua se concentren. Extraído y adaptado de Schagerl, 2016.

Como se mencionó, la composición del agua en estos lagos alcalinos está caracterizada por altas concentraciones de sodio (Na^+) y especies de carbonatos ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$), éstas aguas también tienen (comúnmente) altas concentraciones de iones Cl^- y fluoruro (F^-) y variable concentración de SO_4^{-2} y K^+ , pero bajas concentraciones de sales Mg^{+2} y Ca^{+2} (Horikoshi, 2011). El hecho de que estas aguas contengan concentraciones mínimas de magnesio y calcio es muy importante ya que influyen en el valor del pH. En lagos donde dichas sales se encuentran en grandes cantidades se producen lagos hipersalinos neutros o en casos con muy alto contenido de magnesio se produce un lago hipersalino con una leve acidez.

Estas aguas con alto contenido de Na^+ , Cl^- y $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ se evaporan (al ubicarse en zonas áridas tropicales, donde se produce grandes procesos de evaporación) y si la concentración de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ supera ampliamente las cantidades de sales de calcio y magnesio, estos cationes precipitan dando como resultado un lago con propiedades alcalinas por la formación de soda (Na_2CO_3) con valores de pH aproximados a 10-11 (Horikoshi, 2011).

1.2 Microorganismos extremófilos

A pesar de las condiciones extremas que presentan los lagos de soda son una notable fuente de biodiversidad. En estos ambientes se pueden encontrar flamencos, peces y abundante vida microbiana dominada por procariotas (Schagerl, 2016). El alto pH y salinidad de los lagos de soda excluye muchos otros organismos pero aquellos que son capaces de adaptarse o tolerar tales condiciones y que por lo tanto pueden prosperar en un ambiente extremo son comúnmente denominados **extremófilos** y dependiendo de las condiciones específicas a las que puede adaptarse, es su clasificación (Figura 2). Aquellos microorganismos que habitan los lagos de soda tienen que tener necesariamente la capacidad de tolerar el medio que los rodea y sus características. Estos microorganismos que requieren un pH cercano a 9 o más para su crecimiento y que tienen un crecimiento óptimo a pH 10 aproximadamente y que además muestran un muy bajo crecimiento (o nulo) a pH neutros o cercanos a neutro, son denominados **alcalófilos** (Horikoshi, 1999). A su vez, algunos microorganismos alcalófilos son también "halófilos" ya que requieren grandes cantidades de cloruro de sodio (NaCl), éstos son conocidos como "haloalcalófilos", es decir, además de requerir condiciones alcalinas, necesitan concentraciones altas de NaCl para su crecimiento (Horikoshi, 2011).

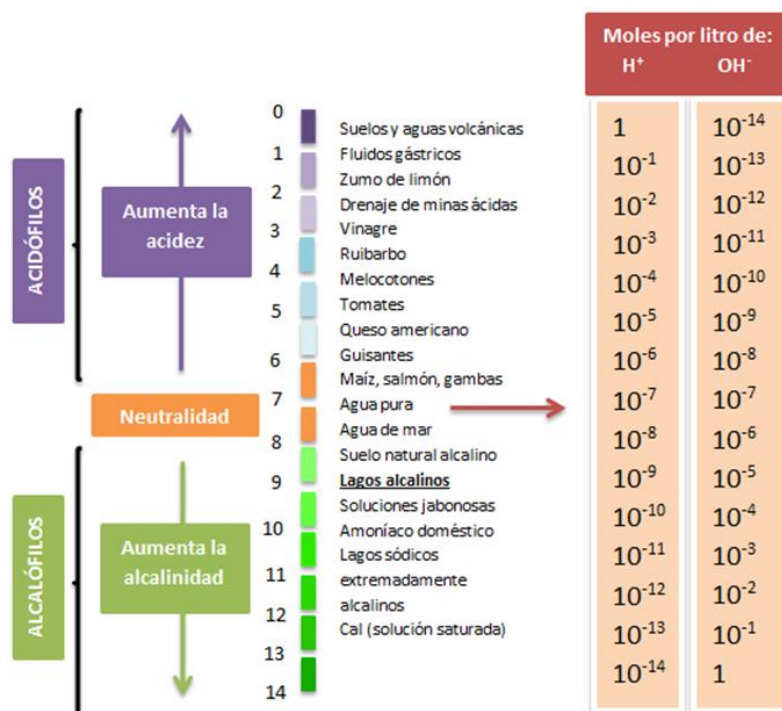


Figura 2. pH correspondiente a diferentes ambientes. Clasificación de microorganismos según la condición a la que se adaptan. Extraído y adaptado de Madigan *et al.*, (2009).

1.3 Importancia de bacterias alcalófilas a nivel industrial

La biotecnología puede definirse como el uso de organismos vivos o derivados para aplicaciones tecnológicas o industriales con el fin de modificar o generar productos y procesos para usos específicos. En este sentido, la biotecnología representa una vía alternativa viable para el desarrollo de aplicaciones industriales de manera sustentable, ya que provee herramientas adecuadas para adaptar y modificar organismos, productos y procesos naturales mejorando el servicio industrial, haciéndolo más diverso, económico y con menos impacto ambiental con respecto a los procesos industriales (químicos y físicos) utilizados tradicionalmente (Oliart-Ros *et al.*, 2016).

Las enzimas, uno de los principales productos de la biotecnología industrial, son útiles como catalizadores industriales debido a su alta especificidad por el sustrato. Gracias al uso de las enzimas, procesos que necesitaban altas temperaturas, uso de productos químicos como sustratos y disolventes complejos, que en su mayoría son costosos y no amigables con el medio ambiente, hoy en día se pueden realizar a temperaturas próximas a la ambiental y en medios acuosos no tóxicos (Oliart-Ros *et al.*, 2016).

Varios sectores industriales se vieron beneficiados con el uso de estas enzimas, diferentes ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Un gran aporte que tienen los microorganismos alcalófilos en la industria es su capacidad de producir una diversidad de enzimas extracelulares que tienen la particularidad de presentar actividades óptimas en valores de pH alcalinos, a diferencia de otras enzimas utilizadas que pierden parcial o total actividad a elevados pH (Preiss *et al.*, 2015). Estas enzimas alcalófilas resultan ser interesantes ya que, además de funcionar a altos pH, pueden presentar grandes actividades a altas temperaturas y/o concentraciones de sal.

Microorganismos alcalófilos, sobre todo pertenecientes al género *Bacillus*, tienen importantes aplicaciones industriales debido a su capacidad de producir enzimas alcalinas extracelulares, tales como proteasas, celulasas, lipasas, queratinasas, pectinasas, amilasas, entre otras (Nogi *et al.*, 2005; Sarethy *et al.*, 2011). Enzimas como proteasas, celulasas y amilasas son muy utilizadas como aditivos en detergentes de lavanderías, una de las principales industrias beneficiadas por el uso de enzimas alcalófilas. Esto se debe a que estas enzimas son capaces de soportar la composición alcalina que presentan los detergentes (Ito *et al.*, 1989).

Otras industrias importantes que se han visto beneficiadas con el uso de enzimas producidas por bacterias alcalófilas son la alimentaria, textil, papelera y farmacéutica (Madigan *et al.*, 2009).

Tabla 1. Enzimas utilizadas en diferentes sectores industriales, los microorganismos productores y su aplicación. Extraída y adaptada de Madigan *et al.*, 2009.

Enzima	Microorganismo	Aplicación	Industria
Amilasa	Hongos	Pan	Panadera
	Bacterias	Coberturas de almidón	Papelera
	Hongos	Fabricación de jarabe y glucosa	Alimentaria
	Bacterias	Almidonado en frío de la ropa	Almidón
	Hongos	Ayuda digestiva	Farmacéutica
	Bacterias	Eliminación de revestimientos	Textil
	Bacterias	Eliminación de manchas; detergentes	Lavandería
Proteasa	Hongos	Pan	Panadería
	Bacterias	Eliminación de manchas	Limpieza en seco
	Bacterias	Reblandecimiento de la carne	Cárnica
	Bacterias	Limpieza de heridas	Médica
	Bacterias	Eliminación de revestimientos	Textil
	Bacterias	Detergentes de uso doméstico	Lavandería
Invertasa	Levaduras	Relleno blando de caramelos	Confitería
Glucosa oxidasa	Hongos	Eliminación de glucosa y oxígeno; papeles para pruebas de diabetes	Alimentaria Farmacéutica
Glucosa isomerasa	Bacterias	Jarabe de maíz rico en fructosa	Refrescos
Pectinasa	Hongos	Prensado, clarificación	Vino, zumos de frutas
Renina	Hongos	Coagulación de la leche	Quesera
Celulasa	Bacterias	Suavizante de tejidos, abrillantador; detergente	Lavandería
Lipasa	Hongos	Ruptura de la grasa	Láctea, lavandería
Lactasa	Hongos	Ruptura de la lactosa en glucosa y galactosa	Láctea, alimentaria
ADN polimerasa	Bacterias Arqueas	Replicación del ADN en PCR	Investigación

1.4 Taxonomía bacteriana

La taxonomía es la ciencia de la clasificación de organismos. La taxonomía bacteriana específicamente consiste en tres áreas separadas pero estrechamente relacionadas como lo son la clasificación, nomenclatura e identificación. La clasificación comprende el agrupamiento de organismos dentro de grupos (denominados taxones). Dicha clasificación se obtiene sobre la base de características similares o relaciones de parentesco. La nomenclatura es la asignación de nombres a los mencionados taxones de acuerdo a reglas internacionales (*International Code Nomenclature of Bacteria*) (Brenner *et al.*, 2005). La identificación comprende la caracterización mediante un número limitado de ensayos adecuados como estudios morfológicos, bioquímicos, metabólicos, entre otros, que permitan obtener la identidad de un organismo aislado como miembro perteneciente a un taxón ya establecido o como miembro de una nueva especie.

1.4.1 Rangos taxonómicos procariotas existentes

Existen varios niveles usados en la clasificación bacteriana. El más alto nivel es denominado Dominio, a este nivel le siguen phylum, clase, orden, familia, género, especie y subespecie que son sucesivamente niveles más bajos en el rango, siendo el nivel de especie el grupo taxonómico básico y más importante en sistemática bacteriana (Brenner *et al.*, 2005). No existe una definición de especie universal a nivel de procariota pero actualmente se define como un grupo de cepas que muestran entre sí un alto grado de similitud en sus propiedades y que difieren en forma significativa de otros grupos de cepas, cada especie difiere significativamente en sus características con otras especies (Brenner *et al.*, 2005). Una cepa es una población de organismos que descienden de un único organismo o de una sola célula. Las cepas pertenecientes a la misma especie deben tener coherencia genética (genoma similar), ser monofiléticos (provenientes de una misma rama evolutiva) y deben tener fenotipo similar (características observables y fisiológicas).

Cuando se aísla un microorganismo procariota de la naturaleza y se cree que no está previamente descrito, se debe analizar si es lo suficientemente distinto a otras especies ya conocidas para ser considerado una nueva especie o simplemente es una nueva cepa perteneciente a una especie ya descrita. Para alcanzar formalmente la validación taxonómica de la nueva especie, se publica una descripción detallada de las características y rasgos diferenciales del organismo, así como el nombre propuesto y se depositan cultivos viables de dicho organismo en al menos dos colecciones internacionales de microorganismos (Madigan *et al.*, 2009).

Para poder describir una nueva especie microbiana nos basamos en las herramientas que nos provee la taxonomía polifásica, en la cual además de los análisis comparativos a nivel fenotípico, provistos por la taxonomía tradicional, se incluyen análisis genotípicos y filogenéticos (Madigan *et al.*, 2009).

1.4.2 Análisis fenotípicos

El fenotipo es la expresión observable del genotipo y por esta razón una de las desventajas de analizar el fenotipo es que la información completa de un genoma procariota nunca se expresa en su totalidad, ya que la expresión génica está directamente relacionada con las condiciones ambientales que rodea al microorganismo (Roselló-Mora *et al.*, 2001). Los análisis fenotípicos clásicos o tradicionales utilizados en la identificación examinan en las células bacterianas características morfológicas, metabólicas, fisiológicas y bioquímicas que pueda presentar, además de otros aspectos. La morfología de una bacteria incluye tanto características celulares (forma celular, presencia de esporas, flagelos, cuerpo de inclusión, tinción de Gram) como características de la colonia (forma, color, tamaño, viscosidad, etc.). En cuanto a las características bioquímicas y fisiológicas incluyen datos sobre crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentraciones de cloruro de sodio, como así condiciones atmosféricas (condiciones aerobias o anaerobias), crecimiento en presencia de diversas sustancias, como agentes antimicrobianos y datos sobre la presencia o actividad de diferentes enzimas, metabolización de sustratos, etc., (Tabla 2) (Roselló-Mora *et al.*, 2001).

Tabla 2. Análisis fenotípicos realizados en un procedimiento de identificación de un microorganismo. (Extraída y adaptada de Madigan *et al.*, 2009).

Morfología	Morfología de la colonia (tamaño, forma y aspecto), la reacción a la tinción de Gram, tamaño y forma de la célula, patrón de distribución de flagelos, presencia de esporas y si las tiene cómo se distribuyen estas dentro de la célula, etc.
Movilidad	Si la bacteria presenta movilidad o no, si dicha movilidad es por desplazamiento, natatoria por flagelos, en enjambre (swarming) o movilidad por vesículas gaseosas.
Metabolismo	Mecanismos de conservación de la energía (fotótrofo, quimioorganótrofo, quimiolitotrofo), utilización de compuestos de carbono, nitrógeno o azufre, fermentación de azúcares, fijación de nitrógeno, requerimiento de factores de crecimiento.
Fisiología	Rango de temperatura, pH y sales para su crecimiento, respuesta al oxígeno (aerobio, facultativo o anaerobio).
Química celular	Ácidos grasos, lípidos polares, quinonas respiratorias.
Otros aspectos	Pigmentos, luminiscencia, sensibilidad a antibióticos.

1.4.3 Quimiotaxonomía

Se consideran análisis fenotípicos a todas aquellas pruebas o ensayos que no estén dirigidos hacia el ADN o ARN, por lo que las técnicas quimiotaxonómicas son consideradas como parte de análisis fenotípicos (Roselló-Mora *et al.*, 2001). Los tipos y las proporciones relativas de ácidos grasos y lípidos polares presentes en la membrana citoplasmática de las células son rasgos fenotípicos esenciales. La técnica empleada para caracterizar estos ácidos grasos se denomina FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*, técnica del éster metílico de los ácidos grasos) y tiene un uso muy extendido, empleándose habitualmente en la caracterización de nuevas especies bacterianas (Madigan *et al.*, 2009).

La variación en composición y abundancia de ácidos grasos puede variar tremendamente entre las distintas bacterias, lo que incluye diferencias en la longitud de cadena, presencia o ausencia de dobles enlaces, anillos, cadenas ramificadas, o grupos hidroxilos. Por tanto, un perfil de ácidos grasos puede a menudo identificar una especie bacteriana (Roselló-Mora *et al.*, 2001). Para su análisis, los ácidos grasos extraídos de cultivos bacterianos cultivados en condiciones estándar se modifican para formar sus ésteres metílicos correspondientes. Estos derivados volátiles se identifican por cromatografía de gases. El cromatograma que muestra los tipos y cantidades de ácidos grasos de la bacteria desconocida se compara con la base de datos de perfiles de ácidos grasos de miles de bacterias de referencia cultivadas en las mismas condiciones. Esto último es de gran importancia, ya que se busca que la variación observada de componentes sea el reflejo de las diferencias genéticas entre los microorganismos a estudiar y no como consecuencia en la variación en las condiciones de cultivo (Roselló-Mora *et al.*, 2001).

1.4.4 Análisis genotípicos

El análisis genotípico considera aspectos comparativos de las células a nivel de su genoma. Dentro de éstos análisis se incluyen hibridación ADN-ADN, estimación de la composición básica del ADN (% G+C), electroforesis en gen de campo pulsado (PFGE), fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y comparación de secuencias de genes individuales (como por ejemplo el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S) (Roselló-Mora *et al.*, 2001). De todas formas la información genómica más completa que se puede obtener, es a partir de la secuenciación del genoma completo. A continuación se mencionan las técnicas más utilizadas en taxonomía bacteriana.

1.4.5 Relación de bases de ADN (% en moles de G+C)

La información genética contenida en el genoma de un microorganismo está definida por la sucesión lineal de las cuatro bases nucleotídicas que conforman la estructura primaria del ADN, estas son: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C).

La relación de bases de una molécula de ADN generalmente se describe como la abundancia relativa del par G+C, y se le suele denominar **contenido de G+C** (Roselló-Mora *et al.*, 2001), es característico de cada genoma y se calcula su porcentaje de la siguiente manera, $G+C:[G+C]/[A+T+C+G] \times 100$. Cuanto mayor es la diferencia entre dos organismos, menos relacionados están entre ellos. Se ha observado que dos microorganismos que difieren en más del 10% en moles G+C no pertenecen al mismo género y que si la diferencia es de hasta 5% dichos organismos pertenecen a la misma especie (Roselló-Mora *et al.*, 2001). Aunque este análisis es útil a la hora de diferenciar entre grupos de taxones, las similitudes en las composiciones de bases no siempre indican relaciones de parentesco ya que a partir de una composición de bases muy similar se puede obtener secuencias nucleotídicas muy diferentes (Madigan *et al.*, 2009).

1.4.6 Hibridación ADN-ADN

Esta técnica está basada en la capacidad que tienen las cadenas que forman el ADN en re-asociarse o hibridarse una vez desnaturalizadas. Al formar simple hebras, pueden re-asociarse para formar el dúplex de ADN original. Cuando dos organismos comparten una secuencia nucleotídica similar o idéntica, es de esperar que sus ADN se hibriden el uno con el otro en una proporción equivalente a la similitud entre sus secuencias genómicas. De este modo, la hibridación ADN-ADN entre los genomas de dos organismos proporciona un índice aproximado de su parecido mutuo (Roselló-Mora *et al.*, 2001). En un ensayo de hibridación, el ADN genómico extraído de un organismo de referencia (cepa tipo de la especie) se marca químicamente con un compuesto radiactivo o fluorescente y se fragmenta en pequeños trozos. Luego se aumenta la temperatura de la solución para separar las dos cadenas que forman el dúplex de ADN y se mezcla con un exceso de ADN del organismo que se busca identificar. Dicho ADN es preparado de modo similar al primero con la excepción de que éste no se marca, la mezcla de ADN se deja enfriar para que las cadenas simple hebra se puedan re-asociar por complementariedad de bases formando un ADN heterodúplex. Todo aquel ADN restante sin hibridar, es eliminado por lavados. Por último, se mide la radiactividad (por ejemplo) del ADN heterodúplex y se compara con el control, el cual, como ya se mencionó es un ADN de referencia puro (ADN homodúplex) de un organismo representante de la especie. Como control se toma la radiactividad resultante de la hibridación del organismo conocido consigo mismo el cual es el 100% de la hibridación (Madigan *et al.*, 2009).

Hay dos parámetros principales que se utilizan para medir el grado de similitud, estos son: la relación de unión relativa (RBR) y la diferencia en el punto medio de desnaturalización térmica (ΔT_m). El RBR considera la cantidad relativa de ADN heterodúplex en comparación con el ADN homodúplex. La temperatura de fusión o punto medio de desnaturalización térmica (T_m) es la temperatura a la cual se observa el 50% del ADN bicatenario desnaturalizado, por lo tanto, ΔT_m es un parámetro que representa la estabilidad térmica de los dúplex de ADN, la ΔT_m es la diferencia entre la

T_m de ADN homodúplex y la T_m de ADN heterodúplex, ésta diferencia permite medir la relación ADN-ADN. Esto se basa en que los heterodúplex representan un número menor de bases apareadas que las del homodúplex, es decir, se forman menos enlaces de hidrogeno. Por lo que, los dúplex son menos estables y en una curva de cinética de desnaturalización, la T_m se alcanza a una temperatura menor. En base a estos dos parámetros, se dice que dos organismos pertenecen a la misma especie si presentan un valor de RBR mayor o igual al 70% y una ΔT_m de hasta 5°C (Roselló-Mora *et al.*, 2001).

1.4.7 Comparación de secuencia de genes individuales

Los genes más empleados en análisis genotípicos son los genes que codifican para el ARN ribosomal, éstos están altamente conservados en su función debido al papel fundamental del ribosoma en la síntesis de proteínas (Madigan *et al.*, 2009). Éste tipo de genes contienen una estructura altamente conservada y una estructura altamente variable, con la cual es posible diferenciar entre organismos de diferentes especies. En estos tipos de análisis, lo que se hace es la extracción del ADN genómico del microorganismo a identificar y amplificar la secuencia del gen con cebadores o *primers* específicos para dicha secuencia mediante una reacción de PCR. Una vez que se obtiene el producto de amplificación se pasa a la obtención de la secuencia nucleotídica del gen para su posterior análisis, que culmina con la comparación frente a diferentes secuencias de cepas de referencia de diferentes especies bacterianas que generalmente se encuentran guardadas en bancos de datos públicos. En general se considera que una bacteria cuyo gen del 16S rRNA difiere en su secuencia en más de un 3% de la de otros organismos debe ser considerada como una nueva especie. Esta propuesta se apoya en la observación de que el ADN genómico de dos microorganismos cuyas secuencias para el gen del 16S son idénticas en menos del 97%, es decir tienen una diferencia mayor al 3%, habitualmente se hibridan entre sí en menos del 70% (Figura 2) (Roselló-Mora *et al.*, 2001), que es el valor mínimo para considerar a dos organismos como de la misma especie (mencionado en la sección 1.4.6). Otros genes muy conservados como *recA*, que codifica para una recombinasa, o *gyrB*, que codifica una DNA girasa, también pueden ser útiles para distinguir bacterias al nivel de especie, aunque con éstos genes se puede presentar la dificultad de no tener un banco de datos tan completo como el que se tiene para el gen 16S rRNA (Madigan *et al.*, 2009).

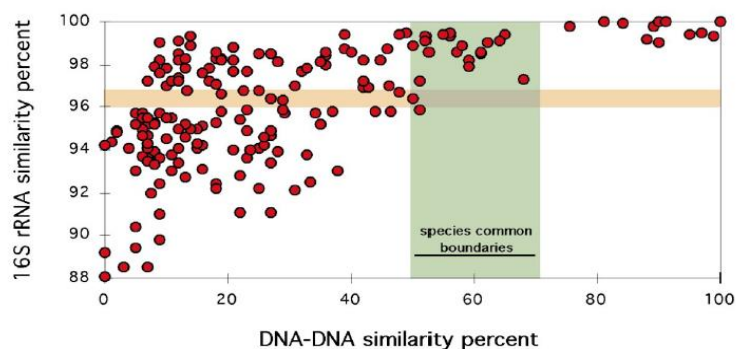


Figura 3. Comparación de % hibridación ADN-ADN y % similitud en la secuencia de 16S ARNr (extraído de Roselló-Mora, 2001).

1.4.8 Análisis filogenético

Los análisis genotípicos y fenotípicos, que agrupan a los organismos según sus similitudes genéticas y fenotípicas respectivamente, se complementan con el análisis filogenético, que intenta colocar a los organismos en el marco de sus relaciones evolutivas. La evolución implica descendencia con modificación, cambios en la secuencia de ADN genómico del microorganismo y la herencia de dichos cambios por la siguiente generación, todos los organismos se encuentran relacionados por su descendencia a partir de un ancestro común (Ludwig *et al.*, 1998). Se define filogenia a la historia evolutiva de un grupo de organismos y ésta se deduce indirectamente a la secuencia nucleotídica (Ludwig *et al.*, 1998). Para éste análisis se emplean una serie de genes que presenten las siguientes características: estar distribuidos universalmente, estables en su función, altamente conservados, ausencia de transferencia horizontal, función homóloga en todos los organismos y longitud adecuada (cantidad de información suficiente) (Madigan *et al.*, 2009). El gen más utilizado es el que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal pero se pueden utilizar otras moléculas marcadoras como la subunidad β de la ATPasa y factor de elongación EF-TU (Ludwig *et al.*, 1998).

El paso crítico de los análisis filogenéticos basados en secuencias nucleotídicas, es la alineación de los datos. Dado que las posiciones con un ancestro común deben compararse para obtener conclusiones filogenéticas confiables, las posiciones homólogas deben organizarse en columnas comunes en una alineación correcta (Ludwig *et al.*, 1998). Una vez realizado el alineamiento múltiple se pasa a la estimación de la distancia genética entre las diferentes secuencias. Existen distintos modelos y fórmulas que buscan una mejor estimación en el número de cambios evolutivos a partir de la información limitada de las secuencias, uno de los modelos más empleados es de Jukes-Cantor, el cual asume que la probabilidad de cambios de nucleótidos ocurre independientemente y que el número de cambios detectables en las secuencias actuales es menor que el número de cambios que ocurrieron en la realidad evolutiva (Ludwig *et al.*, 1998).

La forma clásica de visualización de los estudios filogenéticos basados en secuencias son los árboles aditivos. En dichos árboles se puede observar un patrón de ramificación que indica el camino de la evolución, mientras que las longitudes de las ramas (aditivas) indican las distancias filogenéticas. Las distancias (filogenéticas) entre los organismos (secuencias) se expresan como la suma de las longitudes de todas las ramas que conectan dos nodos terminales particulares (Ludwig *et al.*, 1998). Existen varias formas de realizar la reconstrucción de un árbol filogenético, los comúnmente empleados son: matriz de distancia, parsimonia máxima y métodos de máxima verosimilitud. Los métodos basados en distancia tienen como primer paso el cálculo de las distancias genéticas entre todos los pares de secuencias, la información completa de un alineamiento múltiple se resume en su matriz de distancia correspondiente. El principal método de construcción de árboles filogenéticos basado en matriz de

distancia se denomina Neighbour-Joining, éste es un algoritmo utilizado ampliamente, produce arboles compuesto por ramas de distinta longitud a diferencia de otros métodos. Este algoritmo se basa en encontrar taxones vecinos y unirlos progresivamente adicionando su ancestro en común (Saitou & Nei, 1987). La reconstrucción del árbol de acuerdo con los criterios de parsimonia máxima se basa en el modelo de evolución de que la preservación es más probable que el cambio (Ludwig *et al.*, 1998). A diferencia de los métodos de distancia, los algoritmos informáticos basados en máxima parsimonia proporcionan la formación de un árbol con el número mínimo de cambios de carácter. Por último, el método de máxima verosimilitud para la reconstrucción de árboles es el más sofisticado de los tres métodos, utiliza la mayor parte del contenido de información de las secuencias, pero es el más costoso en tiempo y rendimiento informáticos (Ludwig *et al.*, 1998).

Una vez que se construye un árbol filogenético se debe evaluar su robustez. El método de evaluación de árboles más empleado consiste en “bootstrap”, este método se basa en crear una matriz cuyas columnas se van cambiando de forma aleatoria, donde cada una de las matrices creadas forma un nuevo árbol filogenético, este proceso se repite un número de veces prefijado. A cada ramificación se le asigna el porcentaje de veces que aparece en los árboles construidos. Se asume que una ramificación es significativa si aparece en un porcentaje mayor al 50% de las veces (Felsenstein, 1985).

2. Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar desde el punto de vista taxonómico dos cepas bacterianas, las cuales fueron aisladas a partir de un sedimento de un lago alcalino localizado en el Valle del Rift (Tanzania) denominado lago Magadi.

3. Materiales y métodos

3.1 Aislamiento

Las cepas M30 y M8 fueron aisladas a partir de un sedimento de un lago alcalino del valle de Rift (Tanzania). El aislamiento se realizó por dilución de la muestra en suero fisiológico y siembra en superficie sobre medio sólido denominado Plate Count Agar (PCA) (Difco™). El medio se esterilizó mediante autoclave y se llevó a pH 9 aproximadamente con el agregado de Na₂CO₃ 10% (p/v) asépticamente. Una vez sembradas las placas, se incubaron a 30°C por 48 horas.

3.2 Tinción Gram

La tinción Gram se realizó en base a lo detallado por Hucker & Conn (1923) a partir de un cultivo sembrado sobre medio Tripteína Soya Agar (TSA) (Merk) suplementado con 2% de NaCl a pH 9 aproximadamente con el agregado de una solución estéril de Na₂CO₃. Las tinciones se observaron en un microscopio óptico con lente de inmersión (100X). Bacterias gram positivas se observan de color violeta y bacterias gram negativas de color rosa.

3.3 Tinción de esporas

Para determinar la presencia de esporas en la cepa M30 se utilizó la tinción de esporas como describe Schaeffer & Fulton (1933) a partir de un cultivo sobre medio PCA (con las adecuadas suplementaciones) al cual se le agregó 5 mg/L de MnSO₄ para poder inducir la esporulación. La tinción se observó en un microscopio óptico con lente de inmersión (100X). En este tipo de tinción las esporas se observan de color verde mientras que el cuerpo celular se muestra con un color rosa.

3.4 Microscopía electrónica

La morfología de la endospora de la cepa M30 desarrollada en medio PCA modificado con 2% de NaCl y 5 mg/L de MnSO₄ (pH 9.0 aproximadamente), se estudiaron mediante microscopía electrónica en la Unidad de Microscopía Electrónica de Facultad de Ciencias, tal como se describe en Bouchotroch *et al.*, (2001).

3.5 Movilidad

Para detectar la movilidad de las cepas se observó el desarrollo de los microorganismos en un medio semi-sólido. El medio utilizado fue el que se describe en Barrow & Feltham (apéndice A2.6.24) con algunas modificaciones, la composición del medio fue el siguiente: 13 g/L de caldo nutriente (HIMEDIA®), 80 g/L de gelatina, 5 g/L de NaCl y 4 g/L de agar, el medio se esterilizó a 121°C por 15 minutos. Luego se le agregó solución de Na₂CO₃ 10% (p/v) de forma aséptica (para llevar el medio a pH 9 aproximadamente) y se repartió en tubos de tapa rosca estériles (10 ml aproximadamente por tubo). M30 y M8 fueron sembrados (la siembra se realizó por picadura hasta la mitad del tubo) e incubados por 7 días a 30°C.

Si los microorganismos poseen la capacidad de moverse, se observará crecimiento por varias partes del medio, de lo contrario si la bacteria es inmóvil el crecimiento sólo se limitará a alrededor de la siembra.

3.6 Caracterización genotípica

3.6.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico (de las cepas M30, M8, *Bacillus aurantiacus*, *Nesterekonía halobia*, *Nesterekonía halophila*, *Nesterenkonia aethiopica* y *Nesterenkonia lutea*) se utilizó un kit comercial Promega y se procedió de la siguiente manera: a partir de cultivos jóvenes se obtuvieron las células centrifugando el cultivo en una solución de suero fisiológico a una velocidad de 13.000-16.000xg por 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Al pellet de células obtenido se lo sometió a un shock térmico el cual consistió en incubar a las células a 65°C por 15 minutos y luego a -20°C por otros 15 minutos repitiendo éste procedimiento 3 veces. Luego se resuspendieron las células en 480 µl de EDTA 50 mM a pH 8, se colocaron 24 µl de lisozima (50 µg/µL) y se incubaron a 37°C por 30-60 minutos. Al terminar el tiempo se volvió a centrifugar a 13.000-16.000xg por 2 minutos, se removió el sobrenadante, se agregó 600 µl de solución de lisis nucleico y se incubó a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego agregar 3 µl de solución ARNasa (4 µg/µL). Las muestras se incubaron a 37°C por 15-60 minutos, luego de este tiempo se agregó 200 µl de solución de precipitación y se agitó en un vortex a alta velocidad por 20 segundos para mezclar y rápidamente se procedió a dejar las muestras sobre hielo por 5 minutos. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 13.000-16.000xg por 3 minutos, se transfirió el sobrenadante a tubos limpios que contenían 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se incubaron por 18 horas a -20°C para precipitar el ADN. Se volvió a centrifugar a la misma velocidad por 2 minutos y se descartó el sobrenadante, a los tubos se le colocaron 600 µl de etanol 70% para lavar el pellet, se centrifugó por última vez por 2 minutos y se removió todo el etanol. Los tubos se secaron sobre papel absorbente limpio y se incubaron por 15 minutos a 35°C. Por último, se agregó 50 µl de solución de rehidratación y se incubó a 65°C por 1 hora, las muestras se guardaron a -20°C.

3.6.2 Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis cualitativo del ADN genómico extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X (54 g/L de Tris, 27,5 g/L de ácido bórico, 20 ml de 0,5 M EDTA, pH 8). Se utilizó GoodView (SBS Genetech Co., Ltd) como agente intercalante y un marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Fermentas).

3.6.3 Amplificación del gen 16S ARNr

El gen 16S ARNr de las cepas M30 y M8 fue amplificado por PCR utilizando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3') y 1492R (5'-

TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3') (Lane et al., 1985). Para la PCR se utilizó un termociclador (Applied Biosystems) con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 3 minutos, con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

3.6.4 Amplificación del gen de la subunidad beta de la girasa (*gyrB*)

El gen *gyrB* de las cepas M8, *N. halobia*, *N. halophila*, *N. aethiopica* y *N. lutea* fue amplificado por PCR utilizando los primers UP1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') y UP2R (5'-AGCCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT-3') (Yamamoto & Harayama, 1995). Se utilizó el mismo termociclador que en la amplificación del gen 16S ARNr pero en esta ocasión se realizó una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minutos, alineamiento a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, finalizando con una segunda extensión a 72°C por 7 minutos.

Los fragmentos de interés (genes 16S ARNr y *gyrB*) fueron enviados a secuenciar al servicio de Macrogen Inc (Corea).

3.7 Construcción de árboles filogenéticos

La identificación y el cálculo de las similitudes de las secuencias del gen 16S ARNr se determinaron realizando búsquedas en bases de datos como GenBank y el servidor EzBiocloud respectivamente. Para el análisis filogenético se utilizó el software Mega versión 7.0, en donde las distancias evolutivas se calcularon por el método de Jukes-Cantor y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el algoritmo Neighbour-Joining, los valores de bootstrap fueron calculados a partir de 1000 replicados.

3.8 Caracterización fisiológica

3.8.1 Crecimiento en condiciones anaerobias

Para evidenciar el crecimiento bacteriano de ambas cepas en estudio en condiciones anaerobias, se utilizó un medio nutritivo como TSA (Merck) suplementado con Na₂CO₃ 10% (p/v). Las placas sembradas se incubaron en anaerobiosis mediante un sistema generador de gas Anaerocult A Mini (Merck) durante 7 días a 30°C.

3.8.2 Rango de cloruro de sodio

Para determinar el rango y concentración óptima de cloruro de sodio para el crecimiento, se utilizó como medio base caldo nutriente (HIMEDIA®) a un pH aproximado de 9, el pH fue llevado con hidróxido de potasio (KOH) 1M. El medio base se suplementó con diferentes concentraciones de NaCl, los porcentajes de NaCl (p/v) ensayados fueron las siguientes: 0,5%, 1%, 2%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%. Los medios

con (0,5 a 10% de NaCl) fueron esterilizados por autoclave (a 121°C por 15 minutos), mientras que los restantes se esterilizaron por filtración. Cada medio con inóculo fue incubado a 30°C.

3.8.3 Rango de temperatura de crecimiento

Para determinar el rango de temperatura en el cual las cepas eran capaces de crecer y su temperatura óptima, se utilizó como medio base caldo nutriente (HIMEDIA®) suplementado con 5% de NaCl a pH 9 aproximadamente, el pH fue ajustado con hidróxido de sodio (NaOH) 1M. Las temperaturas ensayadas fueron las siguientes (°C): 4, 10, 22, 25, 30, 35, 38, 43 y 44. El medio se esterilizó por autoclave, se repartió 5 ml en tubos de tapa rosca, se inoculó y se incubó a las diferentes temperaturas antes mencionadas.

3.8.4 Rango de tolerancia de pH

Para el ensayo de la determinación del rango de pH en el cual las cepas podían crecer y el pH óptimo, se utilizó como medio base caldo nutriente (HIMEDIA®) suplementado con 5% de NaCl y los valores de pH deseados se obtuvieron adicionando la cantidad necesaria de NaOH al medio de cultivo. Los valores de pH se midieron con un pHmetro y los pH evaluados fueron los siguientes: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0; 9,5; 10; 10,5; 11,0; 12. Los medios de cultivo fueron esterilizados por filtración y se repartieron 5 ml por tubo de tapa rosca, se le agregó inóculo a cada tubo y se incubó a 30°C con agitación orbital permanente a una velocidad de 100 rpm.

Tanto para el ensayo de rango de NaCl, temperatura y pH para crecimiento, los tres ensayos se realizaron por triplicado y se midió la turbidez de los medios por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm por 1 semana.

Se realizaron gráficos con el logaritmo neperiano de las medidas de absorbancia en función del tiempo de incubación tomando como tiempo inicial el momento en que se inoculó cada medio. Los valores óptimos, ya sea de porcentaje de NaCl, temperatura y pH, fueron aquellos cuyas pendientes fueran mayores al resto.

3.9 Caracterización bioquímica

Para las pruebas bioquímicas se utilizó como medio basal caldo nutriente (HIMEDIA®) (con 1,5% de agar en caso de ser necesario), suplementado con 2% de NaCl y llevado a pH 9 aproximadamente con Na₂CO₃ 10% (p/v). Pruebas como catalasa, oxidasa, reducción de nitrato a nitrito, actividad fosfatasa, producción de H₂S, producción de indol a partir de triptófano, DNAsa, hidrólisis de esculina, gelatina, tween 20, 60 y 80, almidón, caseína, reacción de yema de huevo, hemólisis, ONPG y producción de pigmento a partir de tirosina fueron realizadas de acuerdo a Barrow & Felthman (1993). Desaminación de fenilalanina se realizó como se recomienda en Logan & De

Vos (2009) y para comprobar la capacidad de la cepa de utilizar citrato como única fuente de carbono y energía se utilizó Simmons Citrato Agar (DIFCO).

Para determinar la producción de enzimas celulasas y xilanasas en ambas cepas se utilizó un medio mínimo (ver 3.9.2) suplementado con 1,5% de agar y 0,5% de metilcelulosa o 0,5% de xilano como única fuente de carbono respectivamente (Meddeb-Mouelhi *et al.*, 2014).

La actividad pectinolítica se realizó en base a lo descrito por Tariq *et al.*, (2012) con pocas modificaciones, en esta ocasión se utilizó un medio mínimo (ver 3.9.2) suplementado con 1,5% de agar y 0,2% de ácido poligalacturónico.

Para la comparación fenotípica entre M8 y las cepas tipo de las especies *N. halobia* DSM 20541^T (= JCM 11483^T), *N. halophila* YIM 70179^T (=JCM 19556^T), *N. aethiopica* DSM 17733^T (=JCM 14309^T) y *N. lutea* YIM 70081^T (=JCM 13019^T), se realizaron varias pruebas bajo las mismas condiciones de laboratorio. Pruebas como hidrólisis de caseína, tween (20, 60 y 80), almidón y esculina, hemólisis de glóbulos rojos, DNAsa, producción de H₂S y reacción de yema de huevo, se realizaron utilizando como medio base Agar Nutriente (OXOID) con 5% de NaCl y Na₂CO₃ 10% (p/v) para llevar el pH del medio a un valor de 8,5 aproximadamente. El test ONPG se hizo sobre caldo nutriente (HIMEDIA[®]) con 5% de NaCl y a un pH de 8,5.

Pruebas como hidrólisis de almidón, gelatina, caseína, esculina y tween (20, 60 y 80), reacción de yema de huevo, producción de pigmento a partir de tirosina, DNAsa y actividad fosfatasa, se realizaron para la comparación fenotípica entre la cepa M30 y la cepa tipo de la especie *B. aurantiacus* K1-5^T (=DSM 18675^T). Estas pruebas se realizaron utilizando como medio base Agar Nutriente (OXOID) con 2% de NaCl y Na₂CO₃ 10% (p/v) para llevar al medio a un pH de 9 aproximadamente. Producción de enzimas celulasas, xilanasas y pectinasas se realizó como se mencionó anteriormente. Todas las pruebas mencionadas se hicieron bajo las mismas condiciones de laboratorio.

3.9.1 Oxidación-fermentación de glucosa y otros carbohidratos

Para evaluar la vía de degradación oxidativa-fermentativa de glucosa y otros carbohidratos, se utilizó el siguiente medio: 7 g/L K₂HPO₄, 50 g/L NaCl, 2 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O 0,1 g/L, 1 ml/L vitaminas, a pH 9 (Logan & De Vos, 2009) como indicador se usó azul de timol (0,008% p/v) (Kenichi *et al.*, 2008). Las cepas se incubaron por 7 días a 30°C, se observó el cambio de color del indicador cada día.

3.9.2 Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía

Para la cepa M30 se utilizó un medio basal con la siguiente composición: 20,0 g/L NaCl, 2,0 g/L KCl, 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O 0,2 g/L, 1,0 g/L KNO₃, 1,0 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0,5 g/L

KH_2PO_4 (Ventosa *et al.*, 1982), suplementado con vitaminas y 0,2 g/L de extracto de levadura. El medio fue esterilizado por autoclave y llevado a un pH adecuado con el agregado de Na_2CO_3 10% (p/v).

Para la cepa M8 se utilizó un medio basal descrito por Romano *et al.*, (2008) con pocas modificaciones, la composición del medio fue el siguiente: 20,0 g/L NaCl, 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,0 g/L K_2HPO_4 , 2,0 g/L KH_2PO_4 , 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, suplementado con vitaminas y el agregado de Na_2CO_3 10% (p/v) para alcalinizar el medio.

Todos los sustratos (esterilizados por filtración) fueron utilizados en una concentración final de 1% (p/v) (Finore *et al.*, 2016), para ambas cepas (M30 y M8), como control positivo se utilizó D-glucosa a una concentración final de 1% (p/v) y como control negativo se tomó al medio basal sin agregado de sustrato.

Cada medio con su respectivo sustrato se repartió en tubos con tapa rosca (5,0 mL por tubo), se le agregó el inóculo y se incubó a 30°C. Se midió la turbidez por espectrofotometría a una longitud de onda de 660 nm a partir de las 24 horas de incubación hasta completar los 7 días.

Para determinar la capacidad del microorganismo de utilizar el sustrato como única fuente de carbono y energía, se tomó como resultados positivos aquellos tubos con una turbidez mayor o igual a la turbidez del control positivo. Mientras que los resultados negativos fueron medios con una turbidez menor o igual a la indicada por el control negativo y los tubos con una turbidez mayor a la turbidez de tubos negativos pero menores a tubos positivos se tomaron como positivos débiles.

3.9.3 Utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno y energía

Para la cepa M30 se utilizó el mismo medio basal usado para la utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía con la excepción que para este ensayo es necesario quitar cualquier fuente de nitrógeno por lo que al medio no se le agregó KNO_3 ni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para la cepa M8 se utilizó el mismo medio basal usado para el ensayo de utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía pero sin el agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Los sustratos (esterilizados por filtración) que se probaron para ambas cepas (M30 y M8) fueron utilizados a una concentración final 0,1% (p/v). Para esta ocasión se utilizó como control positivo medio base con peptona de caseína (triptona) a una concentración final de 1% y para el control negativo medio base sin sustrato.

Cada medio con su respectivo sustrato se repartió en tubos con tapa rosca (5,0 mL por tubo), se agregó inóculo y se incubó a 30°C. Para determinar la capacidad de asimilar

las diferentes fuentes de nitrógeno se procedió de la misma forma que en el ensayo de utilización de fuente de carbono como única fuente de carbono y energía (ver 3.9.2).

3.9.4 Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía

Para este ensayo se volvió a utilizar el mismo medio basal que se usó anteriormente, Ventosa *et al.*, (1982) para M30 (con el agregado de vitaminas y 0,2 g/L de extracto de levadura) y Romano *et al.*, (2008) para M8 (con el agregado de vitaminas). Para ambos casos, al medio se esterilizó por autoclave y se le agregó Na₂CO₃ 10% (p/v).

Los sustratos (esterilizados por filtración) se utilizaron a una concentración final de 0,1% (p/v), medio con D-glucosa a una concentración final de 0,2% se utilizó como control positivo y medio basal sin sustrato como control negativo.

Cada medio con su respectivo sustrato se repartió en tubos con tapa rosca (5,0 mL por tubo), se agregó inóculo y se incubó a 30°C. Para determinar la capacidad de utilizar los diferentes ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía se realizó como se describe en el punto 3.9.2.

3.9.5 Utilización de sistemas estandarizados para la determinación de características fenotípicas adicionales (API)

Para determinar la utilización de diversas fuentes de carbono en la cepa M8, se ensayó con el kit API50CH (bioMérieux). El cultivo fue incubado a 30°C por 10 días, observándose diariamente.

El análisis del perfil enzimático de ambas cepas (M8 y M30) se realizó con el kit APIZYM (bioMérieux), donde los cultivos fueron incubados a 30°C por 4 horas y media. Pasado el tiempo de incubación, se procedió al revelado.

3.10 Caracterización quimiotaxonómica

Para la cepa M30 se estudió además la composición de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas. Este estudio se realizó en *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) en Alemania. La cepa se cultivó sobre medio PCA suplementado con 2% de NaCl y 10% de Na₂CO₃ a 30°C, y como control se analizó también a *B. aurantiacus* cultivado en idénticas condiciones.

4. Resultados y discusión

4.1 Descripción macroscópica de las cepas M30 y M8

En las Figuras 4 y 5 se observan las cepas de M30 y M8 aisladas sobre medio PCA suplementado con 2% de NaCl a pH 9 aproximadamente luego de 48 horas de incubación a 30°C.

Las colonias formadas por la cepa M30 son de tamaño mediano y de color crema, presentan una forma circular, con margen entero y una superficie lisa, no exhiben elevación por lo que son planas y presentan viscosidad, lamentablemente la Figura 4 no permite apreciar la morfología ni las características antes descritas de las colonias.

Las colonias formadas por la cepa M8 son de tamaño grande y presentan un color naranja-rosa, tienen una forma circular con una superficie lisa, muestran una elevación del tipo convexa con un margen entero como se puede observar en la Figura 5.

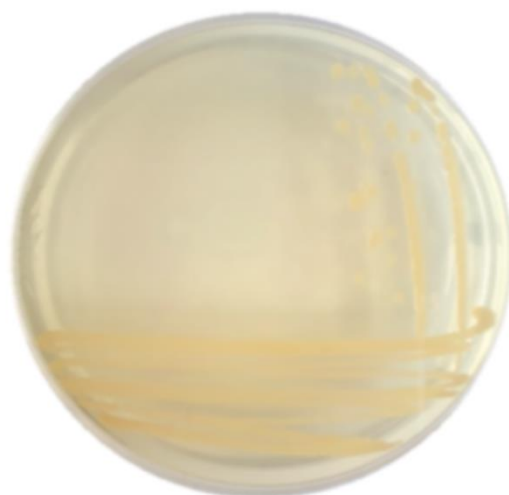


Figura 4. Cepa M30 sobre medio agar PCA (suplementado con 2% de NaCl) a pH 9 e incubada a 30°C.



Figura 5. Cepa M8 sobre medio agar PCA (suplementado con 2% de NaCl) a pH 9 e incubada a 30°C.

4.2 Descripción microscópica de las cepas M30 y M8

Los resultados de la tinción de Gram indican que la cepa M30 se encuentra formada por bacilos gram positivos sin una distribución característica como se puede observar en la Figura 6 obtenida por microscopía óptica. Mientras que para la cepa M8 dicha tinción nos permite afirmar que son cocos gram positivos y que al igual que M30 no presentan una distribución particular (Figura 7).

A partir del agregado de $MnSO_4$ al medio de cultivo se pudo observar que la cepa M30 es capaz de formar endosporas. En la Figura 8 se puede observar la formación de una endospora en una posición central/subterminal, mientras que en la Figura 9 se observa la forma elipsoidal que presenta la espora ya formada (ambas imágenes se obtuvieron mediante microscopía electrónica).

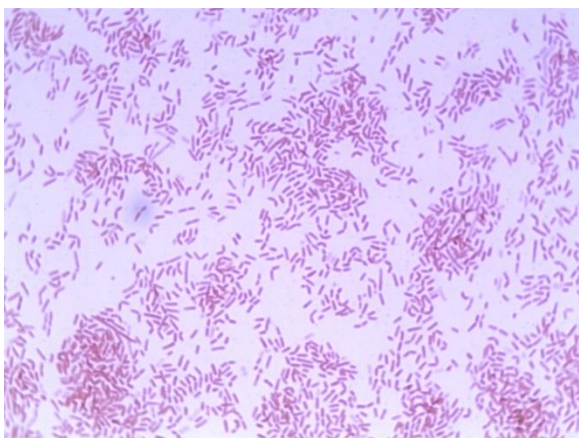


Figura 6. Microscopía óptica donde se observan bacilos gram positivos correspondientes a la cepa M30.

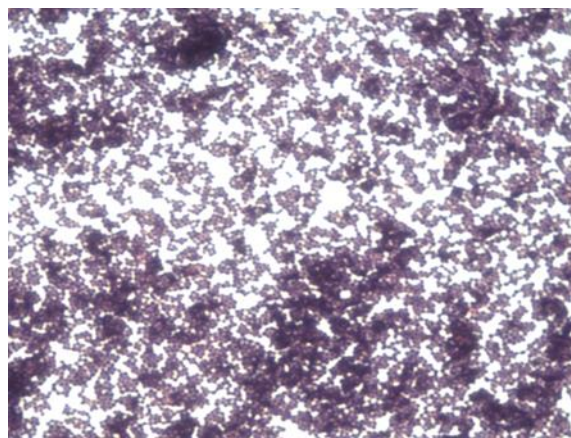


Figura 7. Microscopía óptica donde se observan cocos gram positivos correspondientes a la cepa M8.

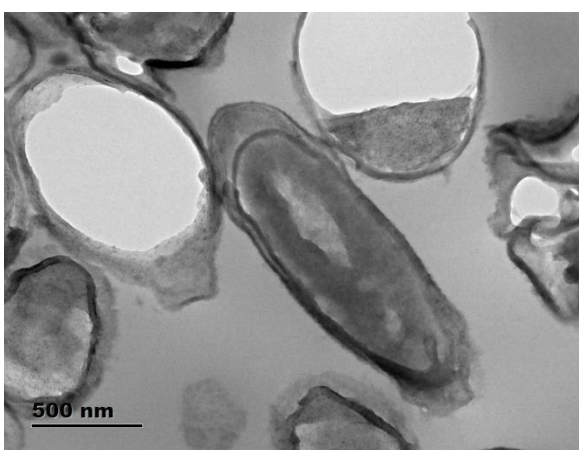


Figura 8. Sección longitudinal que muestra una endospora en una célula de M30, la imagen fue obtenida por microscopía electrónica de un corte ultrafino. Barra, 500 nm.

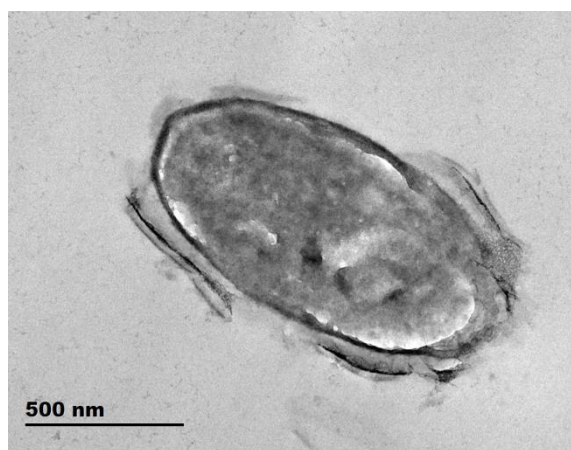


Figura 9. Espora de una célula de M30, la imagen fue obtenida por microscopía electrónica de un corte ultrafino. Barra, 500 nm.

4.3 Caracterización genómica

4.3.1 Comparación de secuencia del gen 16S del ARNr de las cepas M30 y M8 con secuencias en bancos de datos públicos

El gen 16S ARNr de las cepas M30 y M8 fue secuenciado para determinar sus relaciones genéticas y filogenéticas, la secuencia casi completa del gen 16S ARNr de la cepa M30 consiste en 1399 pb, mientras que para M8 es de 1369 pb (secuencia casi completa). Una vez obtenidas las secuencias, primero se procedió a comparar con las secuencias disponibles en bancos de datos como GenBank y el servidor EzBiocloud, sólo con aquellas que tuvieran validado su nombre. De aquí se obtuvo que para la cepa M30 las especies más cercanas eran *Bacillus aurantiacus* K1-5^T, *Bacillus cellulosilyticus* DSM 2522^T, *Bacillus vedderi* JaH^T, *Bacillus caseinilyticus* SP^T, *Bacillus clarkii* DSM 8720^T con una similitud del 96,77%, 95,00%, 94,70%, 94,62% y 93,99% respectivamente. Estos porcentajes de similitud son bajos (menores al 97%) lo que justifica la definición de una nueva especie (Roselló-Mora *et al.*, 2001).

Para la cepa M8, *Nesterenkonia halobia* DSM 20541^T, *Nesterenkonia halophila* YIM 70179^T, *Nesterenkonia aethiopica* DSM 17733^T, *Nesterenkonia lutea* YIM 70081^T, *Nesterenkonia sandarankina* YIM 70009^T, *Nesterenkonia aurantiaca* CK5^T con similitudes de 97,81%, 97,81%, 97,30%, 97,15%, 97,00% y 97,00% respectivamente eran las especies más cercanas, mientras que las otras especies que se encontraron tenían una similitud menor a 97%. En este caso con estos valores de similitud de secuencia del gen 16S ARNr se puede afirmar que la cepa M8 pertenece al género *Nesterenkonia* pero no se puede afirmar todavía que M8 se trate de un nueva especie dentro de dicho género, para esto se tiene que realizar otros ensayos adicionales como hibridación de ADN-ADN y pruebas fenotípicas.

4.3.2 Análisis filogenético de la secuencia del gen 16S del ARNr

El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr basado en el algoritmo Neighbour-Joining demuestran que la cepa M30 pertenece al género *Bacillus* y se encuentra relacionada con la especie *Bacillus aurantiacus* al compartir un ancestro reciente común pero aun así se trata de dos especies diferentes. Esto es posible afirmarlo en base al porcentaje de bootstrap mostrado, el cual indica que dentro de los 1000 replicados el 99% ubicaban a M30 en dicha posición filogenética (Figura 10).

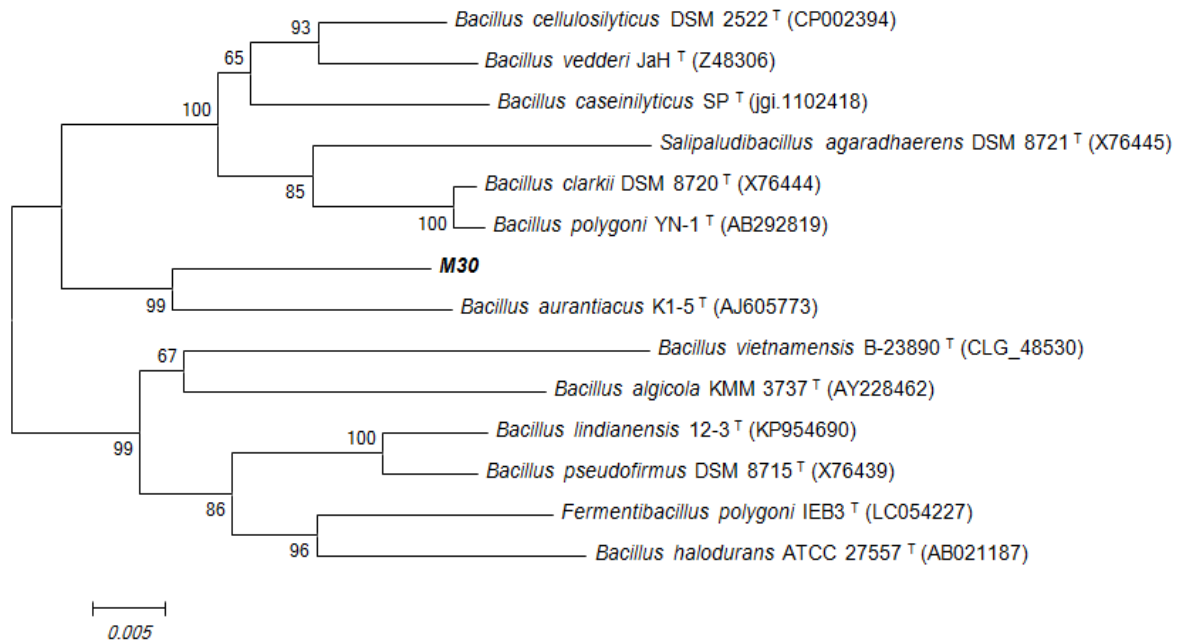


Figure 10. Análisis filogenético de la secuencias del gen ARNr 16S de la cepa M30. El árbol se construyó utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining, en los nodos se indican los valor de bootstrap mayores a 50% (1000 replicados). Barra 5 sustituciones cada 1000.

El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr basado en el algoritmo Neighbour-Joining confirma que la cepa M8 está relacionado filogenéticamente a miembros del género *Nesterenkonia* y que la misma comparte un ancestro común con las especies *N. halobia* y *N. halophila*. Esto es posible afirmarlo a partir del porcentaje (74%) de bootstrap (Figura 11).

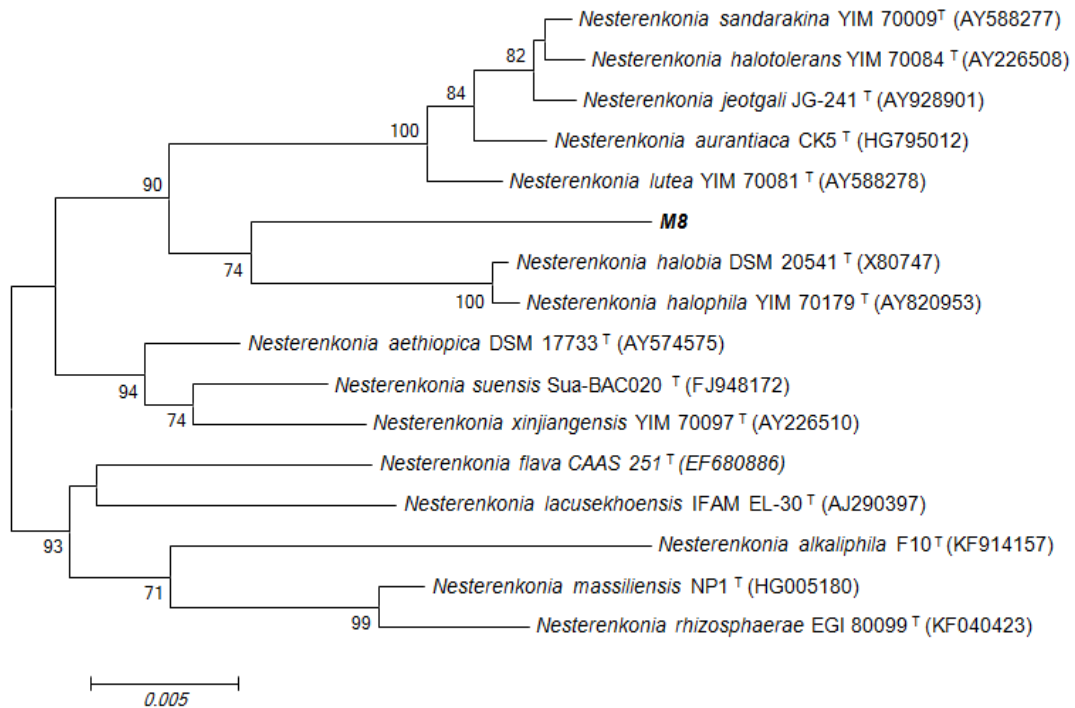


Figure 11. Análisis filogenético de la secuencias del gen ARNr 16S de la cepa M8. El árbol se construyó utilizando el algoritmo de Neighbour-Joining, en los nodos se indican los valor de bootstrap mayores a 50% (1000 replicados). Barra 5 sustituciones cada 1000.

4.3.3 Análisis de secuencia del gen *gyrB*

Para la cepa M8 se pudo obtener la secuencia del gen que codifica para la subunidad β de la girasa (*gyrB*). Al igual que el gen que codifica para el 16S ARNr, el *gyrB* se puede utilizar para la identificación de un microorganismo (Madigan *et al.*, 2009), como también para diferenciarlo de otros a nivel de especie. Para esto es imprescindible contar con un banco de datos completo (como existe para el 16S ARNr) que nos proporcione los datos de secuencias necesarios, o bien secuenciar el gen de aquellas especies a las que podemos inferir que nuestra cepa se asemeja.

Nuestro objetivo en este punto, fue obtener las secuencias del gen *gyrB* tanto para M8 como también para las cepas tipo de las especies *N. halobia*, *N. halophila*, *N. lutea* y *N. aethiopica* (especies más similares a M8 en secuencia del gen 16S ARNr), con el fin de tener una herramienta más que nos permitiera diferenciar a M8 de estas especies mencionadas. Como resultado sólo pudimos obtener la secuencia de *gyrB* de M8, al parecer el par de primers utilizados no eran los más adecuados para las cuatro especies, ya que no se obtuvo producto de la reacción de PCR.

4.4 Caracterización bioquímica de la cepa M30

La cepa M30 fue capaz de crecer en un rango de temperatura que varía desde los 12°C hasta los 43°C, obteniéndose un crecimiento óptimo en un rango de 25-30°C. Crece en un amplio rango de porcentaje de cloruro de sodio que abarca desde 0,5 a 15% NaCl (p/v), siendo 5% NaCl (p/v) el óptimo de crecimiento. En cuanto a pH, es capaz de crecer dentro de valores de pH de 8 a 12 teniendo un crecimiento óptimo en valores de 11-12 (Tabla 6). Comparando éstos resultados obtenidos con la cepa genéticamente más cercana *B. aurantiacus*, no se observan diferencias relevantes que permitan diferenciar una de la otra ya que los valores son muy similares. El rango de temperatura en el cual *B. aurantiacus* es capaz de crecer es muy equivalente a nuestra cepa en estudio y su temperatura óptima cae dentro del rango de posibles temperaturas óptimas de M30 que es de 25°C a 30°C. Lo mismo sucede con el porcentaje de cloruro de sodio y el pH para el crecimiento, aunque en este último M30 presenta valores de pH más altos para su desarrollo óptimo.

Se observaron diferencias notables en la hidrólisis de distintas macromoléculas entre ambas cepas. M30 fue capaz de hidrolizar caseína, esculina y almidón, lo que indica que dicha cepa presenta las enzimas proteasas, esculinasas y amilasas respectivamente pero fue incapaz de hidrolizar tween ya sea 80, 60 o 20. Sin embargo, *B. aurantiacus* no es capaz de hidrolizar almidón, caseína, ni esculina pero tiene la capacidad de hidrolizar tween 80, 60 y 20. Una cuestión a destacar es que, como en todas las pruebas bioquímicas antes mencionadas, la prueba de hidrólisis de gelatina se realizó con ambas cepas (M30 y *B. aurantiacus*) en paralelo en las mismas condiciones. En este ensayo se obtuvieron resultados contradictorios a los publicados para *B. aurantiacus*, ya que ésta fue capaz de hidrolizar gelatina al igual que la cepa

M30 bajo las mismas condiciones. La cepa tipo de la especie *B. aurantiacus* presenta actividad lecitinasa y desoxirribonucleasa (DNAsa) a diferencia de M30. En cambio, M30 fue positiva para actividad fosfatasa diferenciándose de *B. aurantiacus*.

M30 también mostró diferencias con respecto a *B. aurantiacus* en la utilización de diferentes sustratos como única fuente de carbono y energía. Estas dos se diferencian en que M30 es capaz de utilizar los carbohidratos maltosa, D-xylosa, D-manitol y D-galactosa. En cuanto a la utilización de aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno, M30 utiliza L-alanina y L-serina, sustratos que *B. aurantiacus* no utiliza.

Tabla 6. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M30 y *Bacillus aurantiacus* sp. nov. (especie más cercana, datos obtenidos de Borsodi *et al.*, 2008).

Característica	M30	<i>B. aurantiacus</i>
Pigmentación de la colonia	Crema	Naranja
Morfología de la célula	Bacilo	Bacilo
Forma de spora	Elipsoidal	Elipsoidal
Ubicación de spora	Central/Subterminal	Central/Subterminal
Temperatura de crecimiento (°C)		
Rango	12-43	10-45
Óptimo	25-30	28
pH para crecimiento		
Rango	8-12	8-12
Óptimo	11-12	9,5-10
NaCl para crecimiento (%)		
Rango	0,5-15	0-15
Óptimo	5	3-7
Hidrólisis de:		
Almidón*	+	-
Gelatina*	+	+
Caseína*	+	-
Esculina*	+	-
Tween 80,60,20*	-	+
Actividad fosfatasa*	+	-
Reacción de Yema de huevo*	-	+
ADNasa*	-	+
Descomposición de tirosina*	+	-
Utilización de:		
Maltosa	+	-
Melobiosa	+	+
D-Xylosa	+	-
Glicerol	+	NE
D-Manitol	+	-

Continúa

Tabla 6. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M30 y *Bacillus aurantiacus* sp. nov. (especie más cercana, datos obtenidos de Borsodi *et al.*, 2008).

Característica	M30	<i>B. aurantiacus</i>
D-Galactosa	+	-
Ácido Succínico	-	+
L-Serina	+	-
L-Alanina	+	-

Positivo: +; Negativo: -; No se ensayó: NE. * Estos en ensayos se realizaron en el laboratorio en paralelo para ambas cepas bajo las mismas condiciones. El resto de los resultados para *B. aurantiacus* fueron extraídos de literatura publicada.

M30 es catalasa positiva, oxidasa negativa, no presenta movilidad y es aerobio estricto. Es un microorganismo mesófilo capaz de crecer en el rango de temperaturas de 12-43°C obteniéndose un crecimiento óptimo entre 25-35°C. Es alcalófilo estricto presentando un crecimiento entre valores de pH de 8 a 12 siendo 11-12 los valores óptimos para su crecimiento, no se observó crecimiento a valores de pH neutros. En cuanto al porcentaje de cloruro de sodio para su crecimiento, el mismo abarca de 0,5% a 15%, observándose un crecimiento óptimo en 5%.

Resultó negativa en el ensayo de reducción de nitrato a nitrito y producción de indol. Se observó que dicha cepa no utiliza citrato como única fuente de carbono usando el medio Simmons Citrato Agar ya que no hubo crecimiento del microorganismo en el medio utilizado. Se obtuvieron resultados negativos de pruebas como presencia de fenilalanina desaminasa, hidrólisis de urea y producción de H₂S.

Se obtuvo hemólisis en medio de cultivo suplementado con sangre bovina lo que evidencia la presencia de enzimas hemolíticas en el microorganismo. Se observó producción de pigmentos en medio suplementado con tirosina y pudo hidrolizar gelatina, esculina y almidón. Se obtuvieron resultados interesantes al sembrar la cepa en medios de cultivos suplementados con pectina, celulosa y xilano. La bacteria presenta enzimas pectinasas, celulasas y xilanasas evidenciado por la producción de halos alrededor de su siembra (Figuras 12, 13 y 14 respectivamente).

A través de un medio basal se obtuvo que dicha cepa es capaz de utilizar como fuente de carbono y energía los sustratos maltosa, D-trehalosa, melobiosa, D-xylosa, glucógeno, glicerol, D-galactosa y D-manitol, a su vez también utiliza los ácidos orgánicos, glutárico, ácido málico y citrato de sodio. Los sustratos ramnosa, D-rafinosa, L-arabinosa, D-celobiosa, D-arabitol, D-fructosa, α-cetoglutarato, formiato de sodio, propianato de sodio, ácido succínico, butirato de sodio, fumárico, lactato de sodio y acetato de sodio no fueron utilizados. Los aminoácidos L-serina, L-alanina, L-triptófano, L-Isoleucina, L-ornitina, DL-valina, L-fenilalanina, asparagina, arginina y L-ácido aspártico fueron utilizados por la cepa como única fuente de carbono y nitrógeno pero L-lisina, glicina, L-glutamina y L-cisteína no fueron utilizados. Mediante un medio OF modificado con 0,008% (p/v) de azul de timol, M30 fue capaz de oxidar los sustratos D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-maltosa, D-trehalosa, D-sacarosa y almidón.

A partir de la utilización de un sistema API ZYM (bioMérieux), en la cepa M30 se detectó las siguientes actividades enzimáticas, fosfatasa alcalina, lipasa esterasa (C8), leucina arilamidasa, α -quimiotripsina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, valina arilamidasa y tripsina, estas dos últimas de forma débil.

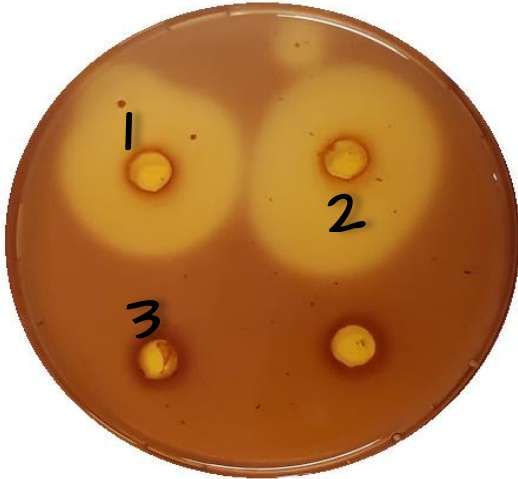


Figura 12. Medio mínimo con 0,2% de ácido poligalacturónico y suplementado con 2% NaCl, 10% de Na_2CO_3 y 1,5% de agar. 1. Cultivo de M30, 2. *B. aurantiacus*, 3. Cultivo de M8. Se observan halos transparentes por la actividad de enzimas pectinasas luego de inundar la placa con solución de lugol.

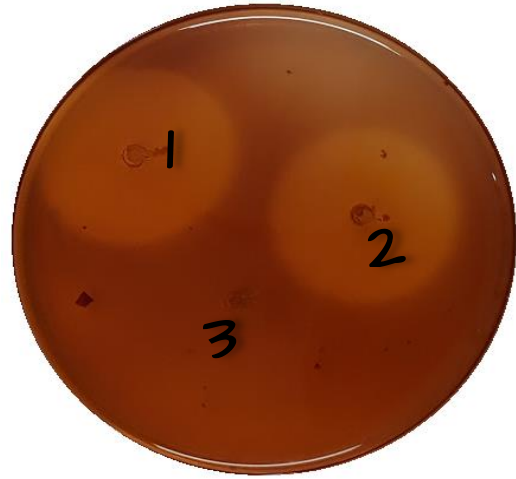


Figura 13. Medio mínimo con 0,5% de metil-celulosa y suplementado con 2% NaCl, 10% de Na_2CO_3 y 1,5% de agar. 1. Cultivo de M30, 2. *B. aurantiacus*, 3. Cultivo de M8. Se observan halos transparentes por la actividad de enzimas celulasas luego de inundar la placa con solución de lugol.



Figura 14. Medio mínimo con 0,2% de xilano y suplementado con 2% NaCl y 10% de Na_2CO_3 y 1,5% de agar. 1. Cultivo de M30, 2. *B. aurantiacus*, 3. Cultivo de M8. Se observan halos transparentes por la actividad de enzimas xilanasas luego de inundar la placa con solución de lugol.



Figura 15. Cultivo de M30 sobre medio agar nutriente suplementado con 2% de almidón, 2% de NaCl y 10% de Na_2CO_3 . Se observa halo transparente que indica la actividad de enzimas amilasas luego de inundar la placa con solución de lugol.

4.5 Caracterización quimiotaxonómica de la cepa M30

En la Tabla 7 se detallan todos los ácidos grasos presentes en la cepa con sus respectivos porcentajes, claramente se observa que la composición de ácidos grasos en la cepa M30 está dominada por C_{15:0} anteiso (50,07%), seguida de C_{15:0} iso (16,51%), C_{17:0} anteiso (14,36%) y C_{16:0} iso (5,80%) (Figura 16). Si bien se observa que *B. aurantiacus* presenta los mismos ácidos grasos predominantes se encontraron diferencias en los porcentajes de los mismos, como en el caso de los ácidos grasos C_{15:0} anteiso y C_{15:0} iso que se observan diferencias mayores al 5% entre M30 y su especie más cercana.

Estos resultados concuerdan con el perfil de ácidos grasos de varias especies caracterizadas dentro del género *Bacillus*, donde sus ácidos predominantes son C_{15:0} anteiso, C_{15:0} iso y C_{17:0} anteiso generalmente (Kaneda, 1977; Kämpfer, 1994).

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos detectados en la cepa M30 y *Bacillus aurantiacus* bajo las siguientes condiciones de cultivo: medio PCA suplementado con 2% NaCl y 10% de Na₂CO₃ e incubado a 30°C, datos extraídos de Borsodi *et al.*, 2008.

Ácido graso	M30	<i>B. aurantiacus</i>
10:0	-	0,10
13:0 ISO	0,11	0,33
13:0 ANTEISO	-	0,13
14:0 ISO	1,97	1,12
14:0	0,30	0,81
15:0 ISO	16,51	21,68
15:0 ANTEISO	50,07	38,90
14:0 ISO 3OH	-	0,27
14:0 2OH	-	0,42
16:0 N ALCOHOL	-	0,31
16:1 ω7c alcohol	1,51	-
16:0 ISO	5,89	5,91
16:1 ω11c	0,60	-
16:0	3,48	2,86
17:1 ISO ω5c	-	1,67
17:1 ISO ω10c	0,15	-
17:1 ANTEISO A	-	3,04
17:0 ISO	3,82	3,32
17:0 ANTEISO	14,36	11,64
18:1 ω9c	-	0,14
18:0	0,35	0,47
19:0 ANTEISO	-	0,08

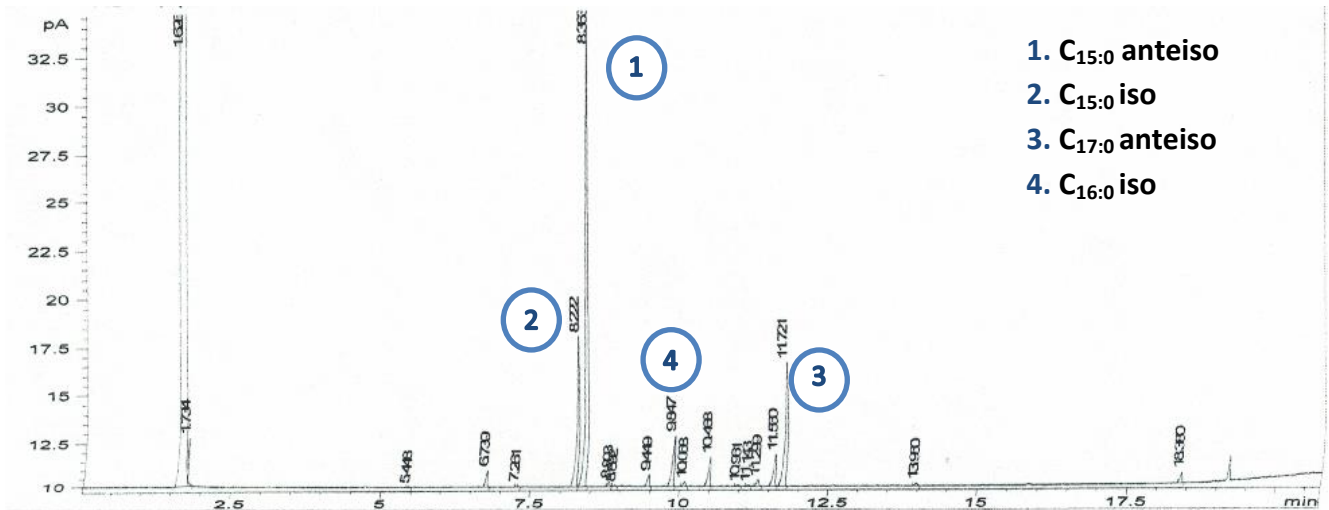


Figura 16. Cromatograma de metilésteres de ácidos grasos producidos por la cepa M30, cada pico representa un éster metílico de ácido graso específico mientras que la altura es proporcional a su cantidad.

El peptidoglicano de la pared celular de la cepa M30 contiene el ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP). En la mayoría de las especies de *Bacillus* el ácido presente es el meso-DAP también conocido como DAP-directo o Aly en la clasificación de Schleifer y Kandler (1972) (Logan & De Vos, 2009), lo que concuerda con nuestros resultados.

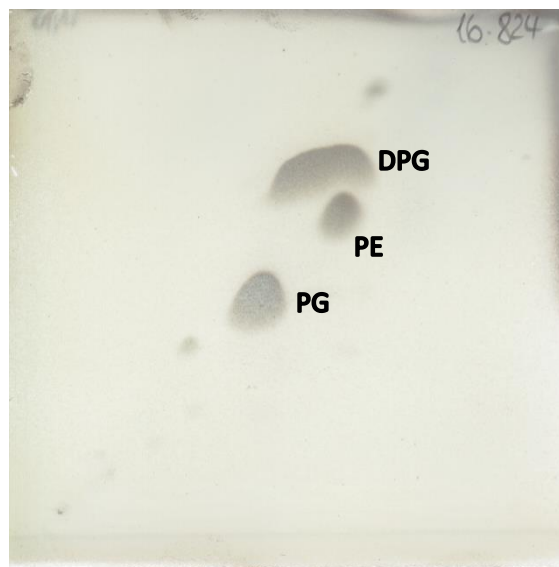


Figura 17. Lípidos polares presentes en la membrana de células de M30, difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG).

El análisis de los lípidos polares de la membrana de M30 dio como resultado que la misma presenta fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol (Figura 17), siendo éstos los lípidos polares que mayormente se encuentran en especies pertenecientes al género *Bacillus* según literatura publicada (Logan & De Vos, 2009).

Al igual que el análisis de lípidos polares, el estudio de la composición de menaquinonas es recomendado para la descripción de una nueva especie (Logan *et al.*, 2009). Éste estudio demostró la presencia de quinonas respiratorias con seis y siete unidades de isopreno, siendo MK7 la quinona isoprenoide más abundante (88%) y en menor proporción MK6 (12%). Con respecto a estos resultados, se ha visto que la quinona isoprenoide MK7 es la más predominante en la mayoría de las especies caracterizadas pertenecientes al género *Bacillus* (Logan *et al.*, 2009; Logan & De Vos, 2009).

En base a los resultados quimiotaxonómicos, fenotípicos y filogenéticos obtenidos se puede confirmar que la cepa M30 pertenece al género *Bacillus* y que dentro de éste corresponde a una **nueva especie**, al presentar una notable diferenciación con el resto de las especies que conforman dicho género.

4.6 Caracterización bioquímica de la cepa M8

Como se mencionó anteriormente, M8 comparte una similitud mayor al 97% en la secuencia del gen ARN ribosomal 16S con cuatro especies pertenecientes al género *Nesterenkonia* (*N. aethiopica*, *N. lutea*, *N. halophila* y *N. halobia*), por lo que se procedió a comparar las características fisiológicas y bioquímicas de las mismas con respecto a la cepa M8.

Los valores óptimos de temperatura de estas cuatro cepas son muy similares a M8. Sólo se observó diferencia con respecto a *N. halophila*, la cual presenta un rango de temperaturas más amplio que abarca desde los 4°C hasta 45°C, diferenciándose de M8 que crece a partir de los 10°C hasta los 38°C.

En cuanto al porcentaje de cloruro de sodio para el crecimiento, éstas especies pueden soportar concentraciones más altas comparándolas con M8, que soporta un máximo de 15% (exceptuando *N. aethiopica* que soporta hasta 12%). Sus valores óptimos es otra característica que las diferencia de M8, *N. halobia*, *N. halophila* y *N. lutea* tienen un crecimiento óptimo a porcentajes de cloruro de sodio mayores o igual a 5% (valor óptimo para M8).

Con respecto al pH, la cepa M8 soporta valores más alcalinos para su crecimiento a diferencia de *N. halobia*, *N. halophila* y *N. lutea*, mientras que *N. aethiopica* es muy similar a M8 en este sentido (rango y valor óptimo de pH).

Además, estas cuatro cepas se compararon fenotípicamente junto a M8 para encontrar características observables que permitieran diferenciar a nuestra cepa en estudio de las demás especies bajo las mismas condiciones de laboratorio (Tabla 8). Los resultados de los ensayos de utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía y la detección de diferentes actividades enzimáticas para éstas cuatro especies de *Nesterenkonia* se obtuvieron de literatura publicada.

Como se muestra en la Tabla 8, M8 dio negativo a todas las pruebas bioquímicas realizadas mostrando una gran diferencia con respecto a *N. aethiopica* de la cual se obtuvieron resultados positivos en la mayoría de las pruebas, que nos permite inferir que dicha especie presenta ciertas enzimas como esculinasas, amilasas, enzimas hemolíticas entre otras, que claramente M8 no presenta. Comparando los resultados obtenidos en los ensayos de utilización de diferentes carbohidratos entre estas dos cepas, éstos fueron similares ya que solo se diferencian en la utilización de dos sustratos (D-xylosa y D-trehalosa). De los sistemas API ZYM (bioMérieux) se obtuvo que M8 presenta únicamente la enzima leucina arilamidasa. Lamentablemente no hay resultados en la literatura que nos permita comparar los resultados obtenidos de nuestra cepa con *N. aethiopica* pero claramente se observan diferencias notables entre ésta especie y M8. Las diferencias van desde la morfología de sus colonias y pigmentación hasta la presencia de una gran diversidad de enzimas presentes en *N.*

aethiopica que en M8 no se observan, por lo que se puede decir en una primera instancia que M8 no pertenece a dicha especie.

También se observaron diferencias fenotípicas con respecto a *N. halophila* y *N. halobia*. La primera fue capaz de hidrolizar esculina y caseína, mismos resultados se obtuvieron para *N. halobia* que además fue capaz de hidrolizar almidón, a diferencia de M8 que como se mencionó resultó ser negativo a todas las pruebas dichas. M8 se diferencia de *N. halobia* en que es capaz de utilizar los sustratos D-trehalosa y D-fructosa, mientras que *N. halophila* no es capaz de utilizar el carbohidrato ramnosa como si lo es M8. *N. halophila* y *N. halobia* presentan las enzimas β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y lipasa (no en *N. halobia*), las cuales no se encuentran presente en M8 (otras diferencias fenotípicas se detallan en la Tabla 8).

Por último, también se notó algunas diferencias entre M8 y *N. lutea*, ésta es móvil, es ONPG positiva y presenta enzimas desoxirribonucleasas. Además, al comparar los resultados suministrados por los sistemas API ZYM para M8 con los datos publicados para *N. lutea* se observó que dicha especie presenta las enzimas α -galactosidasa, β -glucoronidasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa, enzimas no encontradas en M8.

Tabla 8. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M8 y las especies *N. halobia*, *N. halophila*, *N. aethiopica* y *N. lutea*. Datos de cepas extraídos de Delgado *et al.* (2006), Li *et al.* (2005, 2008) y Mota *et al.* (1997).

Característica	M8	<i>N. halobia</i>	<i>N. halophila</i>	<i>N. aethiopica</i>	<i>N. lutea</i>
Forma celular	Coco	Coco	Coco	Bacilos cortos	Cocos
Color de la colonia	Naranja-rosa	Sin pigmentación	Blanco marfil	Amarillo	Amarillo claro
Temperatura de crecimiento (°C)					
Rango	10-38	20-40	4-45	25-40	4-45
Óptimo	25-35	37	28	30-37	28
pH para crecimiento					
Rango	7-12	5-10	6-10,5	7-11	6-10,5
Óptimo	10	7-7,5	7-8	9	7-8
NaCl para crecimiento (%)					
Rango	1-15	3-23	0,5-30	3-12	0-20
Óptimo	5	10	10	3	5-10
Movilidad	-	-	-	-	+

Continúa

Tabla 8. Características fenotípicas diferenciales entre la cepa M8 y las especies *N. halobia*, *N. halophila*, *N. aethiopica* y *N. lutea*. Datos de cepas extraídos de Delgado *et al.* (2006), Li *et al.* (2005, 2008) y Mota *et al.* (1997).

Característica	M8	<i>N. halobia</i>	<i>N. halophila</i>	<i>N. aethiopica</i>	<i>N. lutea</i>
Oxidasa	-	+	-	+	-
ONPG*	-	+	+	+	+
Hidrólisis de:					
Esculina*	-	+	+	+	-
Almidón*	-	+	-	+	-
Tween 20,60,80*	-	-	-	+	-
Yema*	-	+	+	+	-
Producción de H ₂ S*	-	-	-	+	-
DNAsa*	-	+ [§]	+ [§]	+	+
Caseína*	-	+ [§]	+ [§]	+	-
Hemólisis*	-	-	-	+	-
Utilización de:					
L-Arabinosa	+ [§]	+	+	+	+
Glicerol	+	-	NE	+	+ [§]
D-Xylosa	+ [§]	+	+	-	+
D-Trehalosa	+	-	NE	-	NE
D-Manitol	-	-	NE	NE	+
D-Fructosa	+	-	+	+	+
Ramnosa	+	NE	-	NE	NE
Propiedades enzimáticas:					
Leucina arilamidasa	+	NE	NE	NE	NE
α-galactosidasa	-	-	-	NE	+
β-galactosidasa	-	+	+	NE	+
β-glucoronidasa	-	-	-	NE	+
α-glucosidasa	-	+	+	NE	+
β-glucosidasa	-	+	+	NE	+
Lipasa	-	-	+	NE	NE

Positivo: +; Positivo débil: +[§]; Negativo: -; No se ensayó: NE. * Estos en ensayos se realizaron en el laboratorio en paralelo para todas cepas en las mismas condiciones. El resto de los resultados para *N. aethiopica*, *N. lutea*, *N. halophila* y *N. halobia* fueron extraídos de la literatura publicada.

La cepa M8 es catalasa positivo, oxidasa negativo, no presenta movilidad y es aerobio estricto. No reduce nitrato a nitrito, las pruebas de actividad fosfatasa, DNAsa, hemólisis, lecitinasa, descomposición de tirosina y fenilalanina desaminasa fueron negativas, al igual que la hidrólisis de gelatina, tween (20,60 y 80), esculina, caseína, almidón y urea. Tampoco se obtuvo crecimiento en medio Simmons indicando la no utilización de citrato y no hubo producción de indol ni H₂S. Sólo se obtuvo la presencia de la enzima leucina arilamidasa.

Es un microorganismo mesófilo exhibiendo un buen crecimiento en el rango de temperatura de 10 a 38°C con un óptimo entre 25°C y 35°C. Es capaz de crecer a valores de pH de 7 a 12, siendo 10 el valor de pH para el cual se obtuvo un crecimiento óptimo. Entre los diferentes porcentajes de cloruro de sodio que se evaluaron se obtuvo un buen crecimiento dentro del rango de 1 a 15% siendo 5% la concentración óptima de cloruro de sodio, por lo que M8 se distingue por ser también halófilo.

Mediante el uso de un medio mínimo basal se obtuvo que M8 fue capaz de utilizar maltosa, D-trehalosa, ramnosa, L-arabinosa, melobiosa, D-xylosa, glucógeno, D-fructosa y α -cetoglutarato, mientras que D-rafinosa, D-manitol, glicerol y D-galactosa no fueron utilizados como fuente de carbono y energía. A partir del uso de API 50CH se obtuvo que fue capaz de utilizar D-ribosa, D-celobiosa, D-turanosa, L-arabitol y D-sacarosa, también fue capaz de utilizar los siguientes ácidos orgánicos, propianato de sodio, ácido succínico, glutárico, ácido málico, lactato de sodio, fumárico y acetato de sodio pero no utilizó butirato de sodio, citrato de sodio ni propianato de sodio. M8 utilizó L-ornitina, L-alanina, DL-valina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-lisina, arginina, L-glutamina y asparagina como fuente de nitrógeno y energía pero no los aminoácidos glicina, L-cisteína, triptófano, L-serina y ácido aspártico.

5. Conclusiones y perspectivas

La cepa M30 es un bacilo gram positivo formador de esporas, aerobio estricto y no móvil. Forma colonias de color crema, circulares de superficie lisa, planas y de bordes enteros al cabo de 48 horas. Es catalasa positivo pero oxidasa negativo, no reducen nitrato a nitrito y no posee enzimas desoxirribonucleasas, si posee actividad fosfatasa. Es capaz de hidrolizar esculina, gelatina, casina, almidón y tirosina pero no hidroliza tween 20, 60 y 80. La producción de H₂S e indol proporcionaron resultados negativos. Presenta las enzimas celulasas, xilanasas y pectinasas, lipasa esterasa (C8), leucina arilamidasa, α -quimiotripsina, β -galactosidasa, α -glucosidasa, valina arilamidasa y tripsina (otros resultados se detallan en la sección 4.4).

El crecimiento es a partir de pH 8,0 hasta pH 12,0, teniendo su crecimiento óptimo a partir de pH 11-12. El rango de concentración de NaCl para el crecimiento se encuentra entre 0,5-15% (p/v), siendo 5% (p/v) la concentración de sodio óptima. En cuanto a la temperatura, M30 es capaz de crecer entre 12-43°C obteniéndose un crecimiento óptimo a temperaturas que se encuentren entre 25-35°C.

Los lípidos polares de la membrana son fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol, la composición de ácidos grasos de la cepa está dominada por C15:0 anteiso (50,07%), seguida de C15:0 iso (16,51%), C17:0 anteiso (14,36%) y C16:0 iso (5,80%). La quinona isoprenoide más abundante es MK7 (88%) y en menor proporción MK6 (12%). El peptidoglicano de la pared celular contiene el ácido meso-diaminopimélico.

A través del análisis de la secuencia del gen ARN ribosomal 16S, la cepa M30 fue identificada como perteneciente al género *Bacillus* y la especie cercana más relacionada es *Bacillus aurantiacus* (96,8%).

En base a los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos, quimiotaxonómicos y fenotípicos que revelan una clara diferenciación con el resto de las especies tipo del género *Bacillus*, se propone a la cepa M30 como una nueva especie del género *Bacillus*, a la cual se le denominó *Bacillus natronophilus* (amigo de la soda).

En cuanto a la cepa M8, ésta es un coco gram positivo, aerobio estricto y no móvil. Forma colonias de color naranjas-rosas con forma circular de superficie lisa, presentan una elevación del tipo convexa y borde entero al cabo de 48 horas.

M8 es catalasa positivo y oxidasa negativo, de las enzimas ensayadas sólo se pudo detectar leucina arilamidasa.

Crece en un rango de pH que va desde pH 7-12 teniendo un crecimiento óptimo a pH 10. El rango de concentración de NaCl para el crecimiento abarca de 1-20% (p/v), siendo 5% la concentración de sodio necesaria para un crecimiento óptimo. Es capaz de crecer a temperaturas que vayan de 10-38°C obteniéndose un crecimiento óptimo entre 25-30°C.

En base al análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, fue clasificado en el género *Nesterenkonia* (filo *Actinobacteria*) y si bien posee muchas diferencias fenotípicas con especies tipo cercanas para su clasificación como nueva especie se requiere la realización de ensayos adicionales.

Como perspectiva sería relevante poner a punto técnicas adicionales como hibridación ADN-ADN entre M8 y las especies filogenéticamente relacionadas (*N. aethiopica*, *N. lutea*, *N. halophila* y *N. halobia*) para confirmar si M8 se trata de una nueva especie dentro del género *Nesterenkonia*, o bien si se trata de una nueva cepa dentro de alguna de las especies ya mencionadas.

Abordar más sobre el estudio del genoma de ambas cepas para conocer a profundidad todas las propiedades que puedan presentar en sus respectivos genomas. Como ya se dijo, el fenotipo de cada microorganismo depende de su genoma y éste se expresa dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentra, por lo que en el laboratorio es limitado el número de pruebas a realizar para conocer todas las propiedades que pueda presentar el organismo. Aunque en la actualidad existen numerosas metodologías que permiten siempre saber un poco más sobre el fenotipo de la bacteria, la información completa siempre se encuentra en su genoma. Esto último nos permitiría obtener también la secuencia del gen que codifica para la subunidad β de la girasa (*gyrB*) para la cepa M30.

También sería interesante la caracterización de las enzimas producidas por la cepa M30 que pueden tener un uso importante en la industria y encontrar la forma de su sobreexpresión para producir cantidades a gran escala que permitieran su utilización.

Referencias

Aino, K., Hirota, K., Matsuno, T., Morita, N., Nodasaka, Y., Fujiwara, T., Matsuyama, H., Yoshimune, K., Yumoto, I. (2008). *Bacillus polygoni* sp. nov., a moderately halophilic, no-motile obligate alkaliphile isolated from indigo balls. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 120-124.

Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (2003). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.

Borsodi, A. K., Márialigeti, K., Szabó, G., Palatinszky, M., Pollák, B., Kéki, Z., Kovács, A. L., Schumann P. & Tóth, E. M. (2008). *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 845-851.

Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I., & Bejar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1625-1632.

Brenner, D. J., Staley, J. T., Krieg, N. R. (2005). *Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation*. In: Brenner, D. J., Staley, J. T., Krieg, N. R., Garrity, G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2^a Edition, Springer, 2, 27-32.

Delgado, O., Quillaguaman, J., Bakhtiar, S., Mattiasson, B., Gessesse, A. & Hatti-Kaul, R. (2006). *Nesterenkonia aethiopica* sp. nov., an alkaliphilic, moderate halophile isolated from an Ethiopian soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1229–1232.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4) 783-791.

Finore, I., Pierangelo, O., Di Donato, P., Leone, L., Nicolaus, B., Poli, A. (2016). *Nesterenkonia aurantiaca* sp. nov., an alkaliphilic actinobacterium isolated from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 1554-1560.

Hucker, G. J., Conn, H. J. (1923). Methods of Gram-staining. In *Technical Bulletin of the New York State Agriculture Experimental Station*, No. 93.

Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 735-750.

Horikoshi, K. (2011). *Extremophiles Handbook*. Japan: Springer Japan

Ito, S., Shikata, S., Ozaki, K., Kawai, S., Okamoto, K., Inoue, S., Takei, A., Ohta, Y., Satoh, T. (1989). Alkaline Cellulase for Laundry Detergent: Production by *Bacillus* sp.

KSM-635 and Enzymatic Properties. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 1275-1281.

Kämpfer, P. (1994). Limits and Possibilities of Total Fatty Acid Analysis for Classification and Identification of *Bacillus* Species. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 86-98.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **82**, 6955–6959.

Li, W. J., Chen, H. H., Zhang, Y. Q., Schumann, P., Stackebrandt, E., Xu, L. H. & Jiang, C. L. (2005). *Nesterenkonia sandarakina* sp. nov. and *Nesterenkonia lutea* sp. nov., novel actinobacteria, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 463–466.

Li, W. J., Zhang, Y.Q, Schumann, P., Liu, H.Y., Yu, L. Y., Zhang, Y. Q., Stackebrandt, E., Xu, L. H., Jiang, C. L. (2008). *Nesterenkonia halophila* sp. nov., a moderately halphilic, alkalitolerant actinobacterium isolated from a saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1359-1363.

Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M. S., Seldin, L., Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2114-2121.

Logan, N. A., De Vos, P. (2009). *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., in association with *Bergey's Manual Trust*. pp. 1-163

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, **19**, 554-568.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Pearson Educación, S.A.

Meddeb-Mouelhi, F., Moisan, J. K., Beauregard, M. (2014). A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulose and xylanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, **66**, 16-19.

Mota, R. R., Marquez, C., Arahál, D., Mellado, E. & Ventosa, A. (1997). Polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia halobia*. *International Journal Systematic Bacteriology* **47**, 1231–1235.

Nogi, Y., Hideto, T. & Horikoshi, K. (2005). Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 2309-2315.

Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á. & Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, **11**(1), 79-90.

Preiss, L., Hicks, D. B., Suzuki, S., Meier, T., Krulwich, T. A. (2015). Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **3**, 75.

Romano, I., Finore, I., Nicolaus, G., Huertas, F. J., Lama, L., Nicolaus, B. & Poli, A. (2008). Halobacillus alkaliphilus sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake in Fuente de Piedra, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 886–890.

Rosselló-Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 39-67.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.

Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma S. K., Gupta, V., Gupta, S. (2011). Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **38**, 769-790.

Schaeffer, A. B., Fulton, M. D. (1933). A simplified method of staining spores. *Science* **77**, 194.

Schagerl, M. (Ed). (2016). *Soda Lakes of East Africa*. Vienna, Austria: Springer International Publishing.

Smibert, R. M. & Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. *In Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 603–711. Editado por: P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Tariq, A. & Latif, Z. (2012). Isolation and biochemical characterization of bacteria isolates producing different levels of polygalacturonases from various sources. *African Journal of Microbiology Research*, **6**, 7259-7264.

Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cornmenzana, A. (1982). Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Journal of General Microbiology* **128**, 1959-1968.

Yamamoto, S. & Harayama, S. (1995). PCR Amplification and Direct Sequencing of gyrB Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1104-1109.

Agradecimientos

A Javier Menes por brindarme la oportunidad de realizar la tesis de grado, además de su apoyo y conocimiento en todo momento.

A todos los integrantes del laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental por su cálida bienvenida y su ayuda a lo largo del desarrollo de la tesis.

A mis padres (Norma y Carlos) y a mis hermanas (Lorena y Daniela) por su apoyo incondicional desde el principio de la carrera.

A Gustavo por acompañarme y apoyarme, alentándome a que no baje los brazos en los momentos más difíciles.

A mis amigas y compañeras de carrera con quien compartí horas y horas de estudio.

A todos, muchas gracias.