



CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS HALÓFILAS Y SUS MECANISMOS MORFOLÓGICOS, PROVENIENTES DE SUELOS HIPERSALINOS DEL CARIBE COLOMBIANO (LA GUAJIRA)

Franklin Junior Parejo Solano
CC 1143248910
Código estudiantil: 20121228304
Fparejo@unisimonbolivar.edu.co

María Gabriela Osorio Fernández
CC 100220968
Código estudiantil: 20191913376
Maria.Osorio4@unisimonbolivar.edu.co

Trabajo de Investigación del Programa Microbiología

Tutores

Elwi Guillermo Machado Sierra MSc PhD
Yani Cristina Aranguren Diaz MSc PhD



RESUMEN

La salinidad presente en distintos ambientes puede ocasionar problemas que interfieren en el desarrollo y en la absorción de nutrientes. Es por esto que se buscó un potencial biorrecuperador a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, con el fin de recuperar los suelos que sufren de esta problemática. El estudio realizado tuvo como finalidad el aislamiento de bacterias halotolerantes de sedimento de las salinas de Manaure (La Guajira). Se realizó la estandarización del cultivo bacteriano con el medio mínimo IRAM a diferentes concentraciones de cloruro de sodio e incubadas a 28°C, durante 48 horas con observaciones cada 24 horas. Se realizaron curvas de crecimiento bacteriano y de cada aislado seleccionado se llevaron a cabo pruebas de promotora de crecimiento vegetal, con la finalidad de identificar su potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Se hizo extracción de ADN, PCR y secuenciación del gen ARNr 16s para la identificación de cada aislado. Se seleccionaron aislados que presentaron crecimiento en el medio IRAM con concentraciones superiores de NaCl 2M. El análisis de filogenia de uno de los aislados obtuvo como resultado *Halomonas spp.*

Palabras clave: Salinidad, Cloruro de sodio, *Halomonas*.

ANTECEDENTES

Diariamente a nivel mundial se presentan dos problemas de alta relevancia, en primer lugar el “daño a los ecosistemas”, ya que estos realizan un trabajo indispensable manteniendo un equilibrio en la vida de los seres humanos, si continúa el daño de los ecosistemas, la vida como se conoce hasta la actualidad tendría un cambio repentino y no volvería a ser la misma; mientras que, el segundo problema es “el hambre”, el cual lo sufren todos los países en vía de desarrollo y representa una problemática de muchos siglos atrás causada por múltiples razones, las condiciones extremas en las que se encuentran algunos suelos y la casi nula proliferación de cultivos de alimentos o pasto para el ganado. Es aquí donde puede entrar un grupo de bacterias llamadas halófilas, las cuales resisten condiciones extremas de salinidad y mediante estas, se puede llevar a un balance al suelo y ecosistemas de cada sitio en condiciones extremas de salinidad, obteniendo así un resultado beneficioso para el ser humano, así como también para el desarrollo adecuado de plantas y animales.



Objetivos

Objetivo General

Caracterizar bacterias halófilas y sus mecanismos morfológicos, provenientes de suelos hipersalinos del caribe colombiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta

Las muestras se colectaron de los sedimentos en salinas de Manaure (Norte del Departamento de la Guajira) y playa de Camarones (Sur del departamento de la Guajira), 4 muestra por locación, para un total de ocho muestras.

Aislamiento

El aislamiento de estas bacterias se realizó una microdilución en placas de 96 pozos, adicionando a 10 g de sedimento, 90 ml de solución salina, y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-12} , se sembraron las 3 últimas diluciones en el medio mínimo IRAM con una concentración final (g/L) de 1 g triptona; 40 g NaCl; 4 g MgSO₄; 0,8 g de extracto de levadura y 1 g KCl.

Identificación

Para la identificación de estas se hizo primeramente una tinción de Gram y se determinaron las características morfológicas de las colonias, se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias a concentraciones salinas de 0, a 2 Molar, de cloruro de sodio (NaCl).



RESULTADOS

Curva de crecimiento

En cuanto a la curva de crecimiento se tomaron las dos cepas M3 y M7. las cuales fueron inoculadas en una caja de 96 pozos con diferentes concentraciones molares de cloruro de sodio, éstas fueron dejadas durante 30 horas en un equipo de medición de absorbancia.

Prueba biofilm

Para esta prueba se tomaron las dos cepas de interés M3 y M7. la cual fueron inoculada en concentraciones diferentes de glucosa, está utilizando el medio Caldo de Lisogenia y la glucosa de igual manera, se dejaron durante seis días, en placa de 96 pozos, sobre agitadora orbital.

Pruebas para el desarrollo y crecimiento vegetal

Para estas pruebas se prepararon medios diferentes para identificar si estas presentaban actividades como lipasa, proteasa, celulolítica. las cuales se trabajaron con el medio inicial mínimo IRAM cuyos componentes son: Tryptone 5 g; NaCl 200 g; SO₄Mg + 7H₂O 20 g; Yeast extract 4 g; Agar 17 g; KCl 5 g; CaCl + 6H₂O 0.2 g. pH 7.0-7.2. A este se le adicionaron los componentes básicos para determinar qué actividad se estaba evaluando.

Extracción del ADN genómico

Se utilizó el método de fenol: cloroformo para extraer el ADN genómico, ADN genómico completo de las cepas aisladas tanto M3 y M7. para este procedimiento se tomaron 20 microlitros de caldo de cultivo dejándolo incubando por 12 hrs, del cual se tomó 1 microlitro del cultivo y se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 rpm. El pellet se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (5 ml de Tris-HCl, 1 ml de 0,5M EDTA, y 5 ml de solución de SDS al 10% y 400 ml de agua destilada) y se incubó durante 5-10 mins horas a 90°C. luego se procedió a enfriar rápidamente en hielo, se centrifugó durante 5 minutos por 12000 rpm con cantidades iguales de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1. La fase acuosa se trasladó a un nuevo tubo eppendorf, que se llenó con 1/10 de volumen de isopropanol. Para la precipitación del ADN, se aplicó el doble de la cantidad de etanol frío al



99,9 por ciento. Se utilizó la incubación nocturna a -20°C para mejorar la precipitación del ADN

CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo abordado se logró cumplir con el objetivo general que fue “Caracterizar bacterias halófilas y sus mecanismos morfológicos, provenientes de suelos hipersalinos del caribe colombiano” se identificaron dos cepas de las muestras procesadas llamadas M3 y M7 que resultaron pertenecer al género *Halomonas*, estas presentaron una mayor cercanía con la especie *H. venusta*, creando un clado con esta misma en el árbol filogenético, cabe destacar que esto fue posible debido a la serie de pruebas a nivel genético y a partir de la secuencia consenso que se tenía de la dos cepas.

Referencias

- FAO 1989. Production yearbook, vol.42. Rome. FAO. 350 pp.
- FAO, 2008. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- García Horstmann, A. (2021). Estudio de microorganismos halófilos moderados productores de exopolisacáridos pertenecientes a salinas de interior en Castilla-La Mancha.
- Hebert, A. M., & Vreeland, R. H. (1987). Phenotypic Comparison of Halotolerant Bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 347-350.
- Hu, Y., Liu, T., Chen, N., & Feng, C. (2021). Iron oxide minerals promote simultaneous bio-reduction of Cr (VI) and nitrate: Implications for understanding natural attenuation. *Science of The Total Environment*, 786, 147396.
- Kämpfer, P., Rekha, PD, Busse, HJ, Arun, AB, Priyanka, P. y Glaeser, SP (2018). *Halomonas malpeensis* sp. nov., aislado de la arena de la rizosfera de una planta de dunas costeras. *Revista internacional de microbiología sistemática y evolutiva*, 68(4), 1037-1046.
- Murali Krishnan, S., Arun Nagendran, N., Pandiaraja, D. y Vinayaga Moorthi, P. (2017). Aislamiento y caracterización de productores de amilasa y optimización de la producción de enzimas. *Revista Internacional de Investigación para el Desarrollo*, 7 (12), 18128-18134.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 135–152. doi:10.1042/ba19990073.
- Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P., 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. *Process Biochem* 40,3569–3575. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.049.
- Pearson, H., Stirling, D., 2003. DNA extraction from tissue. *Methods Mol. Biol.* 226, 33–34. doi:10.1385/1-59259-384-4:33.
- Phillips, A., Janies, D., Wheeler, W., 2000. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 317–330. doi:10.1006/mpev.2000.0785.
- Rasu, KM y Arun, A. (2017). Explorando la producción de polímeros biodegradables a partir de microbios marinos. En *Biodegrad. polim. Desarrollo reciente Nueva perspectiva* (págs. 33-64). Editorial IAPC.



- Samad, Abd, NS, Amid, A, Jimat, DN, Shukor, NAA, Others, 2017. Isolation and identification of halophilic bacteria producing halotolerant protease. *Sci. Herit.* J 1, 07–09. doi:10.26480/gws.01.2017.07.09.
- Szabolcs I. 1989. Salt-affected soils. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Szabolcs I. 1996. An overview on soil salinity and alkalinity in Europe. In: *Soil Salinisation and Alkalinisation in Europe*. European Society for Soil Conservation. Special Publication, p.1-12. Thessaloniki, Greece.
- Wang, T., Zhang, L., Bo, L., Zhu, Y., Tang, X., & Liu, W. (2019, February). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl by Halomonas bacteria. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 237, No. 5, p. 052033). IOP Publishing.
- Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburg, W. y Faaij, A. (2011). El potencial técnico y económico global de la bioenergía de suelos afectados por sal. *Energía y ciencia ambiental*, 4 (8), 2669-2681.
- Woolard, CR e Irvine, RL (1995). Tratamiento de aguas residuales hipersalinas en el reactor discontinuo de secuenciación. *Investigación del agua*, 29 (4), 1159-1168