

UCH-FC
Biotecnología
P659
C-1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
ARQUEA HALOFILA EXTREMA
CON POTENCIAL DE DEGRADAR HIDROCARBUROS SATURADOS**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular por:

ERIC ALEJANDRO PINTO FIGUEROA

2009



Director de Seminario de Título: Dra. Jenny Blamey A.

Profesor patrocinante: Dr. Davor Cotoras T.



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Eric Alejandro Pinto Figueroa.

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ARQUEA HALOFILA EXTREMA CON POTENCIAL DE DEGRADAR HIDROCARBUROS SATURADOS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Jenny Blamey Alegria
Directora Seminario de Título

Dr. Davor Cotoras Tadic
Profesor Patrocinante

Comisión de Evaluación:

Dr. Nicolás Guiliani Guerin
Presidente Comisión

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Evaluador



Santiago de Chile, agosto 2009



En la cumbre del macizo Urus (5495 m), Cordillera Blanca, Perú



Desde niño hiperactivo y disperso... en los años de colegio me gustaba el canto y la pintura. Los primeros experimentos los realice en la cocina, donde mi madre Marisol y mis hermanos Yaminet y Edgar, fueron las victimas de los protocolos culinarios. Si bien por un tiempo pensé en estudiar medicina, mis motivaciones irían por otra perspectiva. La llegada a la Chile y a la Facultad de Ciencias, desarrollo mi interés por diferentes temas, en especial los relacionados con los temas ambientales y su sustentabilidad. Al mismo tiempo, el descubrimiento del montañismo desarrollo mi cariño hacia la natura y un gusto por emprender desafíos. Así, participe en diversos proyectos de educación, expediciones, intentos de empresa, etc. De todas las experiencias, algunas llegadas a buen termino y otras en las que no, aprendí bastante, pero por sobre todo... el valor de las personas. Estoy agradecido de lo recorrido y siento que recién empieza...



Dedicado a Marisol, mi madre



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin el aporte de diferentes personas que estuvieron junto a mí en su realización. Quiero agradecer a la Doctora Jenny Blamey por la dirección en este trabajo, compartir su visión pragmática y la confianza entregada. Al Señor Olivier Rickmers presidente de Fundación Biociencia, por los recursos de laboratorio ofrecidos y sus paternales conversaciones en diferentes temas. Al Doctor Davor Cotoras, por ser patrocinador de este trabajo. A los profesores de la Universidad de Chile, en especial a la comisión de evaluación, el profesor Nicolás Guiliani y la profesora Rosalba Lagos, quienes contribuyeron a través de sus enseñanzas, tantas correcciones y apoyo. Al Doctor Francisco Remonsellez, que muy generosamente estuvo para resolver dudas, dando consejos y revisando detalles.

A los compañeros y amigos quienes amenizaron mi estadía en el laboratorio durante el transcurso de este trabajo en especial a Rocío Peralta, Maximiliano Amenábar, Lotsé Blamey, Freddy Boehmwald, Daniela Correa, Miguel Castro, Mauricio Acosta, Carol Davis y Felipe Galleguillos. A los amigos que desde cerca o la distancia me apoyaron, en especial a Jorge Vera, Carolina Rosas, Gabriel Woytek, Margarita Godoy, Carola Cardoso, Julie Gaye, Joana Meyer y Claudia Jara.

A mi hermanita Yaminet, quien siempre estuvo presente con buen ánimo y diligencia. Al pequeño Édgar, siempre preguntando que tanto escribía y escribía. A mi tío Luis, tía Paty y mis primas Constanza, Ivania y Daniela, por recibirme en su hogar durante un periodo de mi trabajo.

A Marisol, mi madre, quien a través de su ejemplo de vida, me enseñó a tener convicciones y vivir mis ideales.

Todos ustedes, han sido invaluable en mi crecimiento como profesional y por cierto personal. Espero haber podido reflejarlo en este trabajo, muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDOS



Página

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xi
GLOSARIO	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCION	17
1.1. Diversidad microbiana en ambientes extremos	17
1.1.1. Estudio de la diversidad microbiana	17
1.1.2. Diversidad en ambientes extremos y su potencial biotecnológico	18
1.2. Microorganismos degradadores de hidrocarburos	19
1.2.1. Degradación de hidrocarburos mediada por microorganismos	19
1.2.2. Microorganismos degradadores de hidrocarburos en ambientes extremos	22
1.3. Ambientes hipersalinos y degradación microbiana de hidrocarburos	22
1.3.1. Microorganismos halófilos extremos	22
1.3.2. Degradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos	24
1.3.3. Salar de Ascotan y microorganismo halófilos extremos	25
1.4. Objetivo general	27
1.5. Objetivos específicos	27
2. MATERIALES Y METODOS	27
2.1. Muestras, medios y condiciones de cultivo	28
2.1.1. Procedencia de las muestras	28
2.1.2. Medio de enriquecimiento y aislamiento de los microorganismos	28

2.1.3. Selección y caracterización de los microorganismos en 2% de keroseno	29
2.2. Técnicas de biología molecular	30
2.2.1. Extracción ADN genómico	30
2.2.2. Amplificación de la secuencia del 16S ADN ribosomal	30
2.3. Análisis filogenético	31
2.4. Condiciones de cultivo para los ensayos de temperatura, pH y sal total	31
2.4.1. Estudio del crecimiento microbiano en relación a la temperatura	31
2.4.2. Determinación de la velocidad de crecimiento en relación al pH	32
2.4.3. Determinación de la velocidad de crecimiento en relación a la concentración de sal total	32
2.5. Ensayos microbiológicos para la caracterización de halobacteriales	32
2.5.1. Crecimiento anaeróbico vía reducción del nitrato	32
2.5.2. Crecimiento anaeróbico vía fermentación de la L-arginina	33
2.5.3. Crecimiento en diferentes carbohidratos como sustrato	33
2.5.4. Test para catalasa	34
2.5.5. Test para oxidasa	34
2.5.6. Test de actividad esterasa y proteasa	34
2.6. Microscopia electrónica de barrido	34
2.7. Estudio de la actividad monooxigenasa para hidrocarburos saturados	35
2.7.1. Degradación específica de hidrocarburos	35
2.7.2. Preparación del extracto crudo para zimograma	35
2.7.3. Determinación cuantitativa de proteínas	35
2.7.4. Detección cualitativa de actividad monooxigenasa mediante zimograma	36
3. RESULTADOS	37
3.1. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos extremos	37
3.1.1. Arqueas halófilas extremas	37
3.1.2. Selección de microorganismos capaces de crecer en 2% de keroseno	38
3.1.3. Caracterización preliminar de los microorganismos seleccionados	38
3.2. Análisis moleculares	40
3.2.1. Extracción de ADN genómico	40
3.2.2. Amplificación del gen 16S ADN ribosomal	40
3.3. Análisis filogenético	43
3.4. Crecimiento microbiano en relación a la temperatura, pH y sal total	47



3.4.1.Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano	47
3.4.2.Velocidad de crecimiento microbiano en relación al pH	49
3.4.3.Velocidad de crecimiento microbiano en relación a la concentración total de sal	50
3.5. Caracterización microbiológica del microorganismo Asc3-ii	51
3.5.1.Curva de crecimiento	51
3.5.2.Crecimiento anaeróbico	52
3.5.3.Crecimiento utilizando distintos sustratos	53
3.5.4.Test para catalasa	54
3.5.5.Test para oxidasa	54
3.5.6.Ensayo de actividad esterasa y proteasa	54
3.6. Microscopia electrónica de barrido	55
3.7. Estudio de la actividad monooxigenasa para hidrocarburos	56
3.7.1.Degradación específica de hidrocarburos	56
3.7.2.Detección cualitativa de actividad monooxigenasa mediante zimograma	57
4. DISCUSIÓN	59
4.1. Detección y aislamiento de microorganismos	59
4.2. Biología molecular	60
4.3. Análisis filogenético	60
4.4. Crecimiento microbiano en relación a la temperatura, pH y sal total	61
4.5. Caracterización polifásica para el microorganismo Asc3-ii	62
4.6. Microscopia electrónica de barrido	64
4.7. Estudio de la actividad monooxigenasa para hidrocarburos	64
5. CONCLUSIÓN	67
6. REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1	Degradación aeróbica de los hidrocarburos	21
Figura 2	Imágenes de microscopía electrónica de diferentes microorganismos halófilos extremos	23
Figura 3	Salar de Ascotan	26
Figura 4	Fotografía de los sedimentos obtenidos en el Salar de Ascotan	28
Figura 5	Fotografía de diferentes cultivos puros obtenidos utilizando medio <i>SW</i>	37
Figura 6	Fotografía de las cultivos puros creciendo en medio <i>KSW</i>	38
Figura 7	Fotografía de las colonias de los microorganismos capaces de crecer en keroseno	39
Figura 8	Extracción de ADN genómico de los microorganismos capaces de crecer en 2% keroseno.	40
Figura 9	PCR del gen 16S ADN ribosomal para arqueas	41
Figura 10	Especificidad del PCR en relación a la concentración Mg^{2+}	42
Figura 11	PCR optimizado de las diferentes secuencias del 16S ADN ribosomal	42
Figura 12	Cladograma para los microorganismos Asc1-i y Acs1-ii	44
Figura 13	Cladograma para el microorganismo Asc3-ii	45
Figura 14	Cladograma para el microorganismo Asc3-iii	46
Figura 15	Crecimiento microbiano de Asc3-ii y Asc3-iii en función a la temperatura	48
Figura 16	Velocidad de crecimiento de Asc3-ii y Asc3-iii en función a la temperatura	49
Figura 17	Velocidad de crecimiento de Asc3-ii y Asc3-iii en función al pH	50
Figura 18	Velocidad de crecimiento de Asc3-ii en función a la concentración de sal total.	51
Figura 19	Curva de crecimiento de Asc3-iii en condiciones óptimas	52
Figura 20	Crecimiento anaeróbico mediante la reducción del nitrato en Asc3-ii	53
Figura 21	Ensayo para la presencia de catalasa en cultivo de Asc3-ii	54
Figura 22	Imagen de microscopía electrónica de barrido para el microorganismo Asc3-ii	55
Figura 23	Crecimiento del microorganismo Asc3-ii en diferentes hidrocarburos	56

Figura 24	Tinción de proteínas de un extracto de Asc3-ii en PAGE no denaturante	57
Figura 25	Zimograma de actividad monooxigenasa con dodecano como sustrato	58
Figura 26	Citocromo P450 en <i>Haloarcula marismortui</i> , monooxigenasa putativa en el microorganismo Asc3-ii	66





INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales organismos degradadores de hidrocarburos	20
Tabla 2	Caracterización preliminar de los microorganismos capaces de crecer en 2% de keroseno	39
Tabla 3	Resultados de BLASTn de los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii	43
Tabla 4	Propiedades de diferenciación del microorganismo Asc3-ii con otras especies válidamente descritas del género <i>Haloarcula</i>	63
Tabla 5	Enzimas que son capaces de degradar hidrocarburos saturados	65



GLOSARIO

Ambiente hipersalino: ambiente salino que posee una concentración de sales iguales o superiores al 15% de sal.

Atalasohalino: ambiente formado por aguas con elevado residuo salino pero de composición diferente a la del agua marina. Generalmente contiene más sulfuro y manganeso y se halla como manantial en los salares en cuencas endorreicas o arreicas

Caracterización polifásica: caracterización de una especie en base tanto a la información filogenética como genotípica

Citocromo P450: familia de hemoproteínas encontradas en los tres dominios de la vida. Utilizan un amplio rango de compuestos endógenos y exógenos como sustrato de sus reacciones enzimáticas. La actividad enzimática más común es la monooxigenasa.

Cladograma: diagrama representativo en la clasificación biológica taxonómica de los organismos, en el que se muestra la relación entre distintas especies según una característica derivada, la cual es resultado del análisis cladístico de una especie. Los cladogramas son importantes herramientas filogenéticas para el estudio de conceptos científicos.

Axénico: cultivo axénico o puro es un cultivo que contiene solo una clase de microorganismo.

Grupo monofilético: grupo de especies descendientes de una simple especie que incluye todos los descendientes de esta especie troncal.

Haloarquea: microorganismo halófilo extremo, pertenecen al dominio arquea, que requiere altas concentraciones de sal para crecer. Muchos de ellos son pleomórficos.

Hidrocarburos saturados: también conocidos como alcanos, son moléculas orgánicas simples y no contienen dobles o triples enlaces entre los átomos de carbono.

Pleomorfismo: variación del tamaño o forma celular de una especie.

Salar: un salar es un lago superficial en cuyos sedimentos dominan las sales (cloruros, sulfatos, nitratos, boratos, etc). Las sales precipitan por la fuerte evaporación.

Talasohalino: ambiente originado por la evaporación del agua de mar y que contiene sus mismas proporciones iónicas.

Zimograma: técnica electroforética basa en un SDS-PAGE, que incluye la adición del sustrato al gel de poliacrilamida, para la detección de la actividad enzimática.

RESUMEN

Existen microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en ambientes hipersalinos. A pesar de su potencial uso en bioremediación, los procesos biológicos involucrados en la degradación de hidrocarburos aún son desconocidos, en parte debido al limitado número de especies caracterizadas. Diferentes microorganismos que habitan los ambientes hipersalinos han sido descritos en salares como Llamara, Ascotan y Atacama, ubicados en el norte de Chile. La presencia de microorganismos en estos ambientes sugiere la posible existencia de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos.

El objetivo principal de este trabajo fue la búsqueda, aislamiento y caracterización polifásica de una arquea halófila extrema capaz de degradar hidrocarburos saturados.

A partir de muestras provenientes del Salar de Ascotan (3.716 m, altiplano de la II región, Chile), fueron aislados seis microorganismos. Los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii se seleccionaron para este estudio por su capacidad de crecer en 2% de keroseno como única fuente de carbono y energía. Presentan una pigmentación naranja, morfología celular cocoide y son capaces de crecer en medio sólido con una concentración entre 15-30% de sal total. El alineamiento de las secuencias del gen 16S ADN ribosomal de estos microorganismos seleccionados reveló que pertenecían al orden halobacteriales, género *Haloarcula*. El análisis filogenético mostró que los microorganismos Asc1-i y Asc1-ii corresponden al mismo aislado y forman un grupo monofilético con *Haloarcula japonica rrnA*. Asc3-ii forma un grupo monofilético con *Haloarcula japonica rrnA*, *Haloarcula argentinensis rrnA* y *Haloarcula argentinensis rrnB*. Asc3-iii formó un grupo monofilético con todas las especies de *Haloarcula rrnB*. El estudio del crecimiento microbiano en función de la temperatura, pH y concentración de sal total, mostró que Asc3-ii tiene una velocidad de crecimiento mayor a 45 °C, pH neutro y con una concentración de 27,5% de sal.

En base a estos resultados, el microorganismo Asc3-ii se seleccionó para la caracterización de un taxón en halobacteriales. La curva de crecimiento para este microorganismo cultivado a 45 °C en medio *SW* 27,5% y pH 7,5, presentó dos fases de crecimiento exponencial, la primera con un tiempo de duplicación de 2,17/día y la segunda con un tiempo de duplicación de 0,38/día. Macroscópicamente, Asc3-ii forma colonias con morfología circular, elevación convexa y pigmentación naranja oscuro. Asimismo se observó presencia de motilidad. Metabólicamente es aeróbico facultativo, capaz de crecer en galactosa, sorbitol, sacarosa y manitol como fuentes de carbono. Además posee actividad catalasa y oxidasa. La morfología celular cocoide se reveló por microscopía electrónica de barrido. El estudio de degradación de hidrocarburos mostró que el microorganismo Asc3-ii es capaz de crecer en hexadecano 7 mM, dodecano 7mM y 2% de keroseno, manteniéndose mejor en dodecano. El zimograma para actividad enzimática de monooxigenasas tipo citocromo P450, reveló que este microorganismo posee actividad monooxigenasa.

En conclusión, este trabajo sugiere que el microorganismo Asc3-ii es una nueva especie perteneciente al género *Haloarcula* con el potencial de degradar hidrocarburos saturados.

ABSTRACT

There are hydrocarbon degrading microorganisms in hypersaline environments. Despite its potential use in bioremediation, biological processes involved in degradation of hydrocarbons are poorly understood, in part due to the limited number of species characterized so far. Several microorganisms that inhabit hypersaline environments have been described in salt lakes as Llamara, Ascotan and Atacama, located in northern Chile. The presence of microorganisms in these environments suggests the possible existence of halophilic microorganisms capable of degrading hydrocarbons.

The main goal of this study was to search, isolate and characterize of an extremely halophilic archaeon able of degrading hydrocarbons.

From Ascotan Salt lake (3,716 m, Altiplano of Region II, Chile) six microorganisms were establishing. Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii and Asc3-iii microorganisms were selected for their ability to grow in kerosene 2% as unique source of carbon and energy. These microorganisms had orange pigmentation, a cocci cell morphology and were able to grow in a solid medium with a total salt ranging between 15-30 % (w/v). The alignment of the sequences of the 16S rDNA showed that these microorganisms belonged to the order halobacteriales, genus Haloarcula. A phylogenetic analysis showed that microorganisms Asc1-i and Asc1-ii were the same isolate and formed a monophyletic group with Haloarcula japonica rrnA. Asc3-II formed a monophyletic group with Haloarcula japonica rrnA, and Haloarcula argentinensis rrnA and Haloarcula argentinensis rrnB. Asc3-III formed a monophyletic group with all Haloarcula rrnB. The study of microbial growth in relation to temperature, pH and total salt concentration showed that Asc3-ii has the highest growth rate between at 45 ° C, a neutral pH and a salt concentration at 27,5 %.

Based on these results, Asc3-ii microorganism was selected for the characterization in the order halobacteriales. The growth curve of Asc3-ii done at 45 °C in SW medium 27,5% of total salt and pH 7.5, showed two doubling time growth, the first one of 2,17/day and the second of 0,38/day. Macroscopically, Asc3-ii colony has a round shape, convex elevation and dark orange pigmentation. Also the presence it is motility. Metabolically it turned out to be aerobic facultative, to grow in galactose, sacarose, sorbitol and manitol as carbon sources. Moreover, catalase and oxidase activity. The Coccus cell morphology was revealed by scanning electron microscopy. The study of hydrocarbon degradation showed that microorganism Asc3-ii is able to grow in hexadecane 7mM, dodecane 7mM and kerosene at 2%, remaining better in dodecane. Cytochrome P450 monooxygenase type activity was detected by active staining zymogram.

As a conclusion, this work suggests that microorganism Asc3-ii is a new specie belonging to the genus Haloarcula with a potential to degrade saturated hydrocarbons.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La diversidad microbiana en ambientes extremos

1.1.1. *Estudio de la diversidad microbiana*

Los procariotas son los organismos más abundantes de la tierra, comprendiendo los dominios Bacteria y Archaea, siendo su diversidad, resultado de 3,8 mil millones de años de evolución (Oren, 2002). Se considera que los procariotas son actores esenciales de la biósfera, produciendo componentes de la atmósfera terrestre y catalizando transformaciones indispensables en los ciclos biogeoquímicos (Rainey y Oren, 2006). El estudio de la diversidad microbiana es esencial para comprender la historia de la tierra y para entender los procesos de adaptación biológica ante la variación del entorno (Ogunseitan, 2005).

La diversidad microbiana, entendida como los diferentes tipos de organismos y su relativa abundancia, puede ser estudiada mediante técnicas cultivo dependientes o técnicas moleculares (Torsvik y col., 1998). La aproximación cultivo dependiente, incluye la elaboración y utilización de medios líquidos, semisólidos o sólidos para el crecimiento y aislamientos de microorganismos. Este acercamiento es de gran utilidad, por el bajo costo de los reactivos y la posibilidad de disponer del microorganismo para diferentes estudios (Margesin y Shinner, 2001). Sin embargo, algunos trabajos sugieren que el enfoque cultivo dependiente no es adecuado para determinar la estructura de la comunidad microbiana (Curtis y Sloan, 2005), pues se estima que menos del 1% de los microorganismos existentes son aislados por herramientas convencionales de cultivo (Torsvik y Ovreas, 2002). Por otra parte, la aproximación molecular estudia el material genético presente a través de herramientas de biología molecular como amplificación de ADN, clonación y secuenciación (Madigan y col., 2006). El estudio de la diversidad microbiana a través de las secuencias de genes de ADN ribosomal reveló la existencia del dominio Archaea, marcando una transformación para el entendimiento de la evolución de la vida (Woese y col., 1990). Por otro lado, la diversidad microbiana puede estudiarse mediante genes que codifican

para funciones específicas en los ecosistemas, como por ejemplo, el estudio de los genes relacionados a la fijación del nitrógeno (Jetten, 2008). En metagenómica, se puede estudiar la diversidad microbiana a través de la clonación y secuenciación de segmentos de ADN directamente de muestras ambientales (Madigan y col., 2006). Si bien la utilización de técnicas moleculares para estudiar la diversidad microbiana da una visión global de la riqueza, abundancia y dinámica de los microorganismos (Curtis y Sloan, 2005), el uso de la aproximación cultivo dependiente permite disponer del microorganismo tanto para su caracterización, como para su directa utilización en potenciales aplicaciones biotecnológica (Schiraldi y col., 2002).

1.1.2. Diversidad en ambientes extremos y su potencial biotecnológico

Algunos microorganismos habitan ambientes considerados extremos para la vida, estos microorganismos, llamados extremófilos, pueden vivir a temperaturas cercanas al punto de ebullición o bajo el punto de congelación del agua, en condiciones de pH acidas o básicas, de extrema salinidad o alta presión (Horikoshi y Grant, 1998). Los microorganismos extremófilos han desarrollado adaptaciones fisiológicas en sus proteínas y lípidos, varios poseen eficientes sistemas de reparación de ADN (Rainey y Oren, 2006). Distintas aplicaciones biotecnológicas han sido investigadas usando microorganismos provenientes de ambientes extremos (Larraín-Linton y col., 2007). Algunas aplicaciones biotecnológicas incluyen al organismo en sí mismo, como por ejemplo en la biolixiviación de minerales, donde una comunidad de microorganismos mesófilos, termófilos, hipertermófilos, todos ellos acidófilos, interactúan en la oxidación del azufre o hierro (Alexander y col., 1987). Otras aplicaciones incluyen la purificación de enzimas activas a temperaturas o pH extremos útiles en la industria de detergentes, alimentaria e industria del papel (Podar y Reysenbach, 2006). Asimismo, estudios proyectan el uso de extremófilos en la bioremediación de ambientes extremos (Margesin y Shinner, 2001).

1.2. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

1.2.1. Degradación de hidrocarburos mediada por microorganismos

La degradación de hidrocarburos mediada por organismos se conoce tanto en el dominio Bacteria como Eukarya (Ollivier y Magot, 2005). Si bien existen reportes de degradación de hidrocarburos en ambientes donde habitan arqueas (Oren, 2005), el dominio Archaea aún no ha sido establecido como degradador de hidrocarburos (Ollivier y Magot, 2005). En la tabla 1, se presentan los principales géneros degradadores de hidrocarburos para el dominio Bacteria y Eukarya.

El paso inicial del metabolismo microbiano de hidrocarburos corresponde a la entrada del hidrocarburo hacia el interior de la célula, proceso que ocurre a través de acceso directo o mediado por biosurfactantes (Ron y Rosenberg, 2002; Bordoloi y Konwar, 2008). Una vez ingresado, el hidrocarburo saturado se metaboliza por vías de oxidación aeróbica o anaeróbica (van Beilen y Funhoff, 2007). En la degradación aeróbica, los hidrocarburos saturados son sustrato para enzimas monooxigenasas del tipo alcano hidroxilasa o citocromo P450 (Bernhardt, 2006). El rol de las enzimas monooxigenasas es diverso ya que además de iniciar la degradación de distintas fuentes de carbono, participan en la detoxificación de compuestos tóxicos, síntesis de metabolitos secundarios o señalización de moléculas (van Beilen y Funhoff, 2006).

Asociada a una cadena transportadora de electrones, la enzima monooxigenasa oxida al hidrocarburo en su correspondiente alcohol primario (Wentzel y col., 2007). El alcohol formado, ahora más soluble, es blanco para sucesivas deshidrogenaciones, convirtiéndose en el ácido carboxílico respectivo (Wentzel y col., 2007). El ácido carboxílico se metaboliza posteriormente hasta convertirse en acetyl-CoA, molécula central en el metabolismo, el que puede ingresar al ciclo de Krebs, a las vías metabólicas de biosíntesis de ácidos grasos o biosíntesis de aminoácidos (Fig. 1) (van Beilen y Funhoff, 2005; van Beilen y col., 2006).

Tabla 1. Principales organismos degradadores de hidrocarburos. Diferentes bacterias, levaduras, hongos y algas son capaces de crecer a través de la degradación de hidrocarburos. Nótese la presencia de los dominios Bacteria, Eukarya y la ausencia del dominio Archaea (adaptado de Ollivier y col., 2005).

Bacterias	Levaduras	Hongos	Algas
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Prototheca</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Alkanivorax</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Cunninghamella</i>	
<i>Alkaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Dendryphiella</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Lulworthia</i>	
<i>Geobacillus</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Varicosporina</i>	
<i>Gordonia</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Verticillium</i>	
<i>Mycobacterium</i>	<i>Trichosporom</i>		
<i>Nocardia</i>	<i>Yarrowia</i>		
<i>Pseudomona</i>			
<i>Rhodococcus</i>			
<i>Sphingomonas</i>			
<i>Streptomyces</i>			
<i>Thermoleophilum</i>			

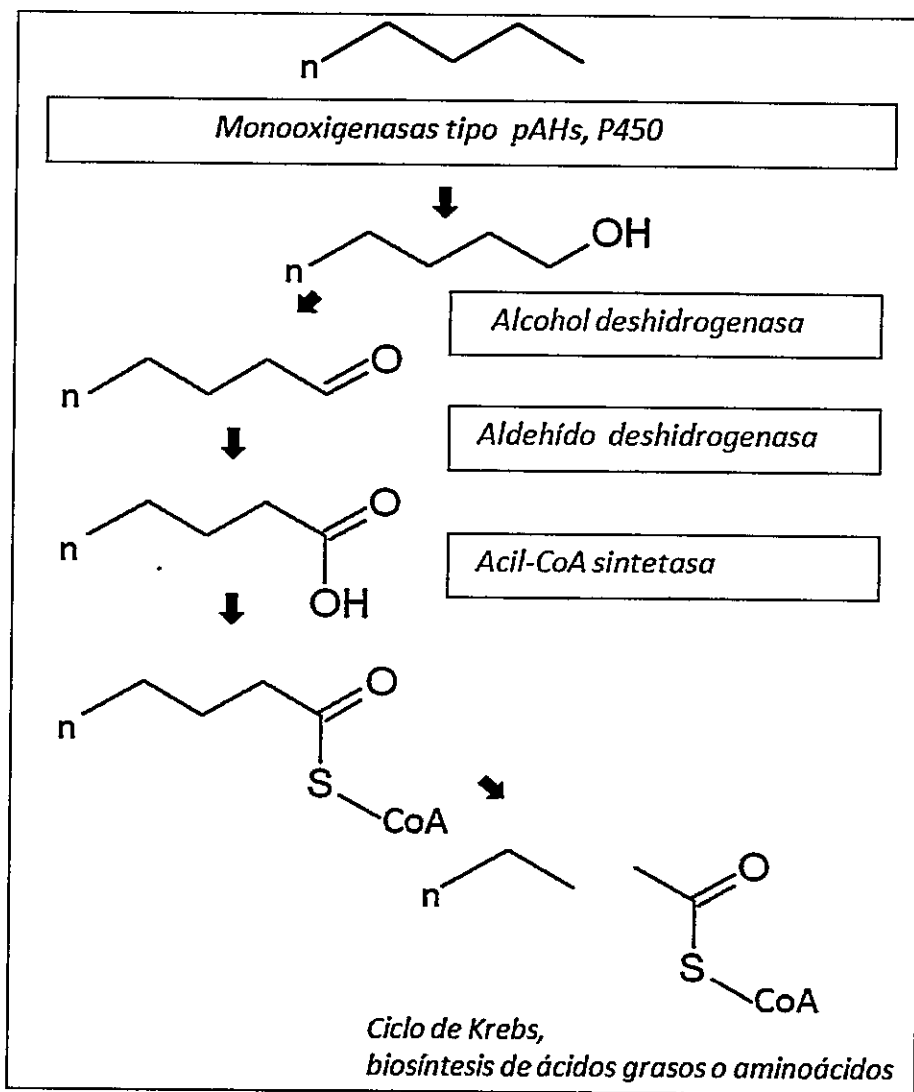


Figura 1. Degradación aeróbica de hidrocarburos. Diferentes alcanos saturados actúan como sustrato para sistemas enzimáticos de monooxigenación tipo alcano hidroxilasa o citocromo p450. Sucesivas oxidaciones convierten el hidrocarburo en Acil-CoA. Después del proceso de la β -oxidación, se forma un Acetil-CoA, molécula central en el metabolismo que puede entrar al ciclo de *Krebs*, las vías metabólicas de biosíntesis de ácidos grasos o biosíntesis de aminoácidos (adaptado de van Beilen y Funhoff, 2007).

1.2.2. Microorganismos degradadores de hidrocarburos en ambientes extremos

Diversos ambientes contaminados por hidrocarburos son caracterizados por presentar bajas temperaturas, pHs extremos o altas concentraciones de sal (Aislabie y col., 2006). Microorganismos degradadores de hidrocarburos adaptados a estas condiciones son importantes para el tratamiento biológico de la contaminación (Margesin y Shinner, 2001). La degradación de hidrocarburos ha sido reportada en una variedad de ambientes terrestres y marinos (Alexander, 1999), como por ejemplo, la degradación de hidrocarburos mediada por microorganismos ha sido descrita en suelos de la Antártica (Aislabie y col., 2006). Bacterias heterótrofas acidófilas han sido descritas por metabolizar diferentes hidrocarburos alifáticos como propanol, acetona, acetaldehído, propanaldehído, dodecano y hexadecano en suelos a pH 3,0 (Alexander y col., 1987). Degradación de fenol bajo condiciones alcalinas ha sido demostrada para pseudomonales por Oren (2005). Se destaca que la mayoría de los procesos biológicos involucrados en la degradación en estos ambientes aún no se conocen (Margesin y Shinner, 2001; Oren, 2005).

1.3. Ambientes hipersalinos y degradación microbiana de hidrocarburos

1.3.1. Microorganismos halófilos extremos

Los ambientes hipersalinos son entornos caracterizados por contener concentraciones mayores a 3,5% de sales, que corresponde a la concentración salina del agua de mar (Oren, 2002). Dependiendo de su composición, pueden clasificarse en sistemas talasohalinos, cuando contienen las mismas proporciones de sales que contiene el agua de mar; o sistemas atalasohalinos, cuando las proporciones de sales son diferentes a las del agua de mar (Oren, 2008). En estos ambientes crecen los microorganismos llamados halófilos (Oren 2002; Oren, 2008). Los halófilos pueden ser clasificados según los requerimientos salinos óptimos de

crecimiento en leves (2-5% de sal total), moderados (5-20% de sal total) y extremos (20-30% de sal total) (Oren y col, 2008).

Los microorganismos halófilos extremos pertenecen al dominio Archaea (Oren, 2002). Para el crecimiento en un ambiente hipertónico, las arqueas halófilas extremas acumulan una concentración intracelular de KCl equivalente a la concentración externa de NaCl para mantener el balance osmótico (Falb y col., 2008). La adaptación a las altas concentraciones de KCl y NaCl incluyen la modificación de la carga superficial de las proteínas a través de una mayor sustitución de aminoácidos como el glutamato y el aspartato (Dassarma, 2006). Morfológicamente, los microorganismos halófilos extremos pueden ser bacilares, discoides, con formas triangulares o cuadrados (Boone y col., 2001), tal como se muestra en la Figura 2. Además, algunos son pleomórficos, especialmente cuando las condiciones iónicas del medio no son las óptimas para su crecimiento (Dassarma y Dassarma, 2008).

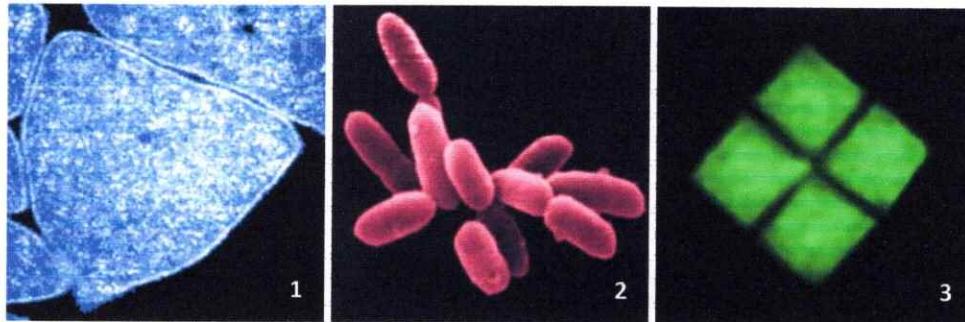


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de diferentes microorganismos halófilos extremos. La diversidad morfológica de las arqueas halófilas extremas es una característica de la orden halobacteria. **1,** *Haloarcula japonica*; **2,** *Halobacterium salinarium*; **3,** *Haloquadratum walsbyi*. Imágenes obtenidas de *Archaea, Laboratoire de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extremophiles*, <http://archaea.u-psud.fr/archaeapics.html>

Se distinguen por ser pigmentados debido a la presencia de carotenoides (Oren, 2005). Metabólicamente pueden ser aeróbicos o aeróbicos facultativos, mediante la reducción de nitrato o la fermentación de aminoácidos L-arginina (Mancinelli y Hochstein, 1986; Rainer y col., 1980). Se ha descrito que especies aisladas y pertenecientes a los géneros *Haloarcula*, *Haloferax* y *Halorubrum*, son capaces de utilizar carbohidratos como fuente de energía y carbono (Oren y col., 1997).

1.3.2. Degradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos

Distintos contaminantes orgánicos son degradados por microorganismos en ambientes salinos (Horikoshi y Grant, 1998; Oren, 2002). Si bien existe una relación inversa entre salinidad y la solubilidad de hidrocarburos, existen reportes de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos a concentraciones entre 4 y 30% de NaCl (Margesin y Shinner, 2001). Microorganismos halófilos o halotolerantes provenientes de sistemas marinos (3,5 % de sal) contaminados con hidrocarburos han sido aislados y caracterizados (Harayama y col., 2004). Una arquea halófila extrema aislada de un salar en Francia (Bertrand y col., 1990) y una arquea halófila extrema aislada de un yacimiento petrolífero salino han sido capaces crecer en presencia de hidrocarburos a 32% de NaCl (Oren, 2005). Una arquea perteneciente al género *Haloferax* y otra perteneciente al género *Halorubrum*, han sido aislados en sitios contaminados con hidrocarburos (Zyyagintseva y col, 1995). Un estudio realizado en un salar argentino, observó la degradación de hidrocarburos en presencia de 20% de NaCl (Kulichevskaya y col., 1992). Sin embargo, estudios sobre los mecanismos biológicos implicados aún no han sido reportados en estos microorganismos (Oren, 2005).

1.3.3. Salar de Ascotan y microorganismo halófilos extremos

El norte de Chile presenta características geológicas, geomorfológicas y climáticas únicas para la formación de diferentes sistemas hipersalinos. Estos sistemas hipersalinos, que pueden ser de origen talasohalino o atalashalino se extienden en la costa, depresión intermedia y altiplano (Risacher y col., 1999), entre ellos el Salar de Llamara, el Salar de Atacama y el Salar de Ascotan.

El Salar de Ascotan, es un sistema hipersalino ubicado en el altiplano de la región de Antofagasta, Chile (Fig. 3). Es un sistema atalashalino, alimentado por distintas fuentes termales y escurrimientos provenientes de rocas volcánicas, presentando zonas con salmueras y salinas (Risacher y col., 1999).

Pocos estudios acerca de la diversidad microbiana han sido realizados en el Salar de Ascotan, según describe Demergasso y col. (2003). Los estudios de diversidad microbiana realizados través técnicas moleculares presentan una diversidad compuesta principalmente por bacterias pertenecientes a las flavobacterias, proteobacterias y bacterias no identificadas y arqueas halófilas extremas pertenecientes al género *Haloarcula* y *Halorubrum* (Demergasso y col., 2004).

Si bien existe el potencial de describir nuevos microorganismos en este sistema hipersalino, estudios cultivo dependientes no han sido publicados.



Figura 3. Salar de Ascotan. 1, imagen satelital del norte de la región de Antofagasta, Chile; 2, El Salar de Ascotan está localizado a 3750 m, en el Altiplano de la región of Antofagasta, Chile. Este lugar es caracterizado por la una alta radiación y baja actividad de agua; 3, fotografía del Salar de Ascotan, donde pueden observarse algunas pozas.

Considerando todo lo anteriormente expuesto, este trabajo propone la siguiente hipótesis:

Es posible aislar arqueas halófilas extremas capaces de degradar hidrocarburos desde muestras ambientales provenientes del Salar de Ascotan.

1.4. Objetivo general

Para demostrar esta hipótesis, se realizará una aproximación cultivo dependiente cuyo objetivo general será aislar y caracterizar una arquea halófila extrema capaz de degradar hidrocarburos saturados.

1.5. Objetivos específicos

Se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Detectar y aislar arqueas halófilas extremas.
- Seleccionar arqueas halófilas extremas capaces de crecer en hidrocarburos.
- Optimizar el crecimiento de las arqueas halófilas extremas seleccionadas en función de la temperatura, pH y concentración de sal total.
- Realizar la caracterización microbiológica para identificar una nueva arquea halófila extrema en un microorganismo seleccionado.
- Demostrar la actividad monooxigenasa involucrada en la degradación de hidrocarburos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras, medios y condiciones de cultivo

2.1.1. Procedencia de las muestras

Diferentes muestras de sedimentos se obtuvieron del Salar de Ascotan, ubicado en el altiplano de la II región, Chile (3750 m de altura., Coordenadas UTM, 7609476N 577107E 19). La toma de muestras se realizó considerando la presencia de pigmentación en los diferentes sedimentos, tal como se muestra en la Figura 4. Los sedimentos se colectaron en tubos falcón de 50 mL bajo condiciones estériles y se almacenaron a -4 °C, hasta su utilización.



Figura 4. Fotografías de los sedimentos obtenidos en el Salar de Ascotan. Detalle de la pigmentación de los sedimentos obtenidos desde el Salar de Ascotan (3750 m de altura, Coordenadas UTM, 7609476N 577107E 19). La diversidad de pigmentación indica la posible presencia de microorganismos incluyendo arqueas halófilas extremas.

2.1.2. Medio de enriquecimiento y aislamiento de los microorganismos

Las muestras se enriquecieron a 48 °C en medio modificado *SW* (*Sea Water*) al 23% (p/v) de sal total y ajustado a pH 7,2. El enriquecimiento se basó en el medio descrito por Rodríguez-Valera y col. (1979). El medio *SW* modificado para una concentración 30% (p/v),

contiene: 240 g/L NaCl, 30 g/L MgCl₂ x H₂O, 35 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 7 g/L KCl, 5 g/L de extracto de Peptona y 1 g/L de extracto de levadura (Oxoid). Se adicionó 1 mL de solución traza que contiene: 1,5 g/L FeCl₂, 1 g/L ZnCl₂, 0,3 g/L MnCl₂ x 4H₂O, 3 g/L H₃BO₃, 2 g/L CoCl₂ x 2H₂O, 0,2 g/L CuCl₂ x 2H₂O, 0,24 g/L NiCl₂ x 6H₂O y 0,3 g/L NaMoO₄ x 2H₂O. La preparación del medio sólido se realizó agregando 1,5 % (p/v) de agarosa al medio *SW*. Las placas se realizaron a alta temperatura para permitir una gelificación homogénea.

2.1.3. Selección y caracterización preliminar de los microorganismos capaces de crecer en 2 % de keroseno.

Los microorganismos capaces de crecer en keroseno se seleccionaron en medio *KSW* (*Kerosene Sea Water*) propuesto en este trabajo, basado en el medio *modificado SW* descrito anteriormente. El medio *KSW* contiene medio *modificado SW* al 23% (p/v) de sal total, sin peptona ni extracto de levadura y 2% (v/v) de keroseno, ajustado a pH 7,2. Se consideró crecimiento positivo a través de la medición de DO a 600 nm en un espectrofotómetro y mediante observación al microscopio. La morfología de los microorganismos seleccionados se describió usando criterios microbiológicos estándares, que incluyó tipo de borde, pigmentación y elevación de la colonia. La morfología celular se examinó al microscopio óptico utilizando cultivos líquidos en crecimiento exponencial (Madigan y col., 2006).

Para la mantención de los microorganismos en 2% de keroseno se utilizaron placas R2A al 23% de NaCl las cuales contienen: 0,5 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de peptona, 0,5 g/L de caseína hidrolizada, 0,5 g/L de glucosa, 0,5 g/L de almidón soluble y 0,3 g/L de piruvato de sodio (Aislabie y col., 2006).

2.2. Técnicas de biología molecular

2.2.1. Extracción del ADN genómico

El método de extracción del ADN genómico se realizó mediante la modificación del protocolo propuesto por Yang y col. (2007). 1 mL de cultivo en fase exponencial se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm y posteriormente se descartó el sobrenadante. Para realizar lisis celular osmótica, se agregó 400 µL de agua bidestilada y se agitó en vortex durante 20 s. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 14.000 rpm y se recuperó el sobrenadante cuidadosamente. Posteriormente, la solución se calentó a 73 °C durante 10 min. La extracción se almacenó a -4 °C, hasta su utilización.

El ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en solución amortiguadora de TBE 0,5 M y se utilizó el marcador de peso molecular del fago lambda *EcoR1/HindIII*. El *mix* de carga consistió en 3 µL del extracto ADN genómico, 3 µL de solución de carga (3 mL glicerol (30%), 25 mg azul de bromofenol (0,25%) y H₂O destilada hasta 10 mL) y 2,5 µL de *sybergold*. El gel se corrió a 85 V/cm durante 40 min. Los resultados se observaron en un transiluminador.

2.2.2. Amplificación de la secuencia del gen del 16S ADN ribosomal

La secuencia del gen del 16S ADN ribosomal se amplificó usando el primer universal 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), el partidor específico para Bacteria 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el partidor específico para Archaea 21F (5'-TCCGGTTGATCCYGCCGG-3', donde Y = C o T).

La reacción de PCR consistió en: 2,5 µL buffer 10X*, 2 µL MgCl₂*(25mM), 2 µL dNTPs *(10 mM mix), 1 µL partidor 1492R, 1 µL partidor 21F o 27F, 0,2 µL de *Taq* * (5U/µL), 13,3 µl agua destilada y 3 µL ADN templado (*, fermentas). Las condiciones de PCR fueron: 1 min *hot start* a 95 °C; 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 93 °C, 1 min de hibridación a 55 °C y 1 min

de elongación a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C (Dyall-Smith, 2008). La visualización se realizó en gel de electroforesis en agarosa como se describió anteriormente. El producto amplificado de PCR se almacenó a -4 °C.

2.3. Análisis filogenéticos

Los ADNs se enviaron a la Universidad de Michigan para secuenciación. Las secuencias para establecer las bases de datos y realizar los análisis posteriores, se seleccionaron desde la base de datos del EMBL y Ribosome Database Project, RDP (Maidak, 1997; Maidak, 2000). Los cromatogramas de las secuencias de los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii se revisaron utilizando el programa FinchTV. Las secuencias revisadas obtenidas se sometieron a un alineamiento básico con el programa BLASTn (Altschul, 1990). Las secuencias de los microorganismos aislados junto con diversas secuencias seleccionadas se sometieron a un alineamiento múltiple con el programa ClustalX (Thompson, 1997). Posteriormente las secuencias se editaron para que todas tuvieran el mismo tamaño, 500 bases. Posteriormente, los análisis filogenéticos fueron realizados con la suite PHYLIP 3.67, bajo el criterio de máxima parsimonia, con el algoritmo JQ y un bootstrapping de 1000 (Abdennadher y Boesh, 2007; Retief, 2000).

2.4. Condiciones de cultivo para los ensayos de temperatura, pH y sal total

2.4.1 Estudio del crecimiento microbiano en relación a la temperatura

En el estudio de crecimiento microbiano en relación a la temperatura, los microorganismos se crecieron en medio modificado *SW* al 23% de sal total ajustado a pH 7,2 a las temperaturas 5, 12, 25, 29, 33, 37, 41 y 45 °C. El crecimiento se determinó a través de la medición del DO a 600 nm durante 16 días. Las experiencias se realizaron en triplicado.

2.4.2. Determinación de la velocidad de crecimiento en relación al pH

Para determinar el crecimiento microbiano en relación al pH, los microorganismos se crecieron a 37 °C en medio modificado *SW* al 23% de sal total, a diferentes pHs entre 5,5 y 8,5, usando un incremento de 0,5 unidades de pH. Los medios a pH 5,5-6,5, se ajustaron en presencia de la solución de amortiguación MES 25 mM (concentración final). Los medios a pH 6,5-7,5, se ajustaron en presencia de la solución de amortiguación HEPES 25 mM (concentración final). Los medios a pH 8,0 y 8,5, se ajustaron en presencia de la solución de amortiguación EPPS 25 mM (concentración final). El crecimiento se determinó a través de la medición del DO a 600 nm al tercer día. Las experiencias se realizaron en triplicado.

2.4.3. Determinación de la velocidad de crecimiento en relación a la concentración de sal total

Para determinar el crecimiento microbiano en relación a la concentración de sal total, los microorganismos se crecieron a 40 °C en medio modificado *SW* ajustado a pH 6,5 en diferentes concentraciones de sal total, entre 1y 30%. La peptona, el extracto de levadura y las sales trazas fueron mantenidas constantes. El crecimiento se determinó a través de la medición del DO a 600 nm al tercer día. Las experiencias se realizaron en triplicado.

2.5. Ensayos microbiológicos para caracterización de halobacteriales

2.5.1. Crecimiento anaeróbico vía reducción de nitrato.

El crecimiento anaeróbico vía reducción de nitrato se realizó modificando lo descrito por Mancinelli y col. (1986). Se agregó 1g/L de KNO₃, 10 µL de ácido sulfamílico 0.8% (disuelto en ácido acético al 30%) y 10 µL de n-naftilamina 0,5% (disuelto en ácido acético al 30%) al medio modificado *SW* al 27,5% de sal total y ajustado a pH 7,5. Para la anaerobiosis, un frasco

con tapa de goma se lleno con el medio modificado *SW* y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 PSI. Una vez abierto la autoclave, el O₂ disuelto se desplazó mediante el bombeo de N₂ a través de un sistema manifold (Girguis y col., 2005). La inoculación se realizo al 5% (v/v) en fase exponencial y se creció a 37 °C, durante 7 días. El resultado positivo se observó por el cambio a una coloración violácea y observación microscópica.

2.5.2. *Crecimiento anaeróbico vía fermentación de L-arginina*

Para el estudio del crecimiento anaeróbico vía fermentación de L-arginina, se agregó 2,5 g/L de L-arginina (Rainer y Oren, 1980) al medio modificado *SW* al 27,5% de sal total y ajustado a pH 7,5 .La anaerobiosis se realizó según lo descrito anteriormente, se inoculó con 5% de cultivo en fase exponencial y se creció a 37 °C, durante 7 días. El resultado positivo se observó por crecimiento del microorganismo.

2.5.3. *Crecimiento en diferentes fuentes de carbono como sustrato*

Para estudiar el crecimiento a través del consumo de diferentes fuentes de carbono, se prepararon medios de cultivos sólidos y líquidos con el medio modificado *SW* al 27,5% de sal total, ajustado a pH 6,5, sin extracto de levadura ni peptona y distintas fuentes de carbono: 0,1% de sacarosa, galactosa, maltosa, glucosa, ribosa, galactosa o manitol (Oren y col., 1997). Para suplementar la ausencia de nitrógeno se agregó 1 g/L de NH₄Cl, además, se adicionó la solución de amortiguación MES 25mM (concentración final) para controlar el cambio de pH debido al consumo de los azúcares (Oren y col., 1997). Se inoculó al 5% en fase exponencial y se cultivo a 37 °C. El crecimiento se detectó por medición de DO a 600 nm.

2.5.4. *Test para catalasa*

Para el test para catalasa, se aplicó directamente a un grupo de colonias 3 gotas de H₂O₂ al 30% de sal total. El test positivo se observó por la liberación de burbujas de aire, transcurridos 5 min (Dyal-Smith, 2006).

2.5.5. *Test para oxidasa*

Para el test para oxidasa, se aplicó el 1% de reactivo de *Kovacs* a un papel filtro impregnado con colonias. El test positivo se observó por el cambio de color del papel a una coloración violácea (Dyall-Smith, 2006)

2.5.6. *Test de actividad esterasa y proteasa.*

La actividad esterasa y proteasa para arquea halófilas extremas se estudio mediante el ensayo de Tween 80 realizado simultáneamente según lo descrito por Gutiérrez and González (1972). La actividad esterasa se observaría por la formación de halos debido a la precipitación del oleato cálcico y la actividad proteasa por la formación de un halo opaco alrededor de las colonias.

2.6. **Microscopia electrónica de barrido**

La microscopia electrónica de barrido se realizó según lo descrito por Nicolaus y col. (1999), en su estudio de exopolisacáridos en *Haloarcula*. 1 mL de cultivo en fase exponencial se concentró mediante 10 min de centrifugación a 10.000 rpm. Posteriormente, el pellet se lavó usando una solución amortiguadora A (buffer fosfato 0,05 M preparado al 10% de NaCl y ajustado a pH 6,5). Las células se fijaron al 3% (v/v) de glutaraldehido en solución amortiguadora A, durante 30 min a 25 °C y posteriormente fueron filtradas usando un filtro de poliamida (Sartorius) 0,45µm. Las células fijadas se deshidrataron por lavado en incrementos de

10% de etanol (60-100%). Luego, las células se secaron al vacío y se recubrieron con oro-paladio en un recubridor catódico durante 60 s. Las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL JSM-T300 (resolución, hasta 10nm).

2.7. Estudio de la actividad monooxigenasa para hidrocarburos saturados

2.7.1 Degradación específica de hidrocarburos

Para estudiar la degradación específica de distintos hidrocarburos se preparó medio modificado *SW* al 27,5% de sal total y ajustado a pH 6,5, sin extracto de levadura ni peptona, más distintas fuentes de hidrocarburos: hexadecano 7 mM, dodecano 7 mM y 2 % de keroseno. Se utilizó el doble de las concentraciones descritas por Saul y col. (2005). El crecimiento se detectó por medición de DO a 600 nm.

2.7.2. Preparación del extracto crudo para zimograma

La obtención del extracto crudo para el zimograma se realizó a través de una modificación de lo propuesto por Dyall-Smith (2006). 500 mL de cultivo celular se creció en el medio modificado *SW*, sin extracto de levadura, con 1 g/L de peptona y dodecano 10 mM. El cultivo en fase exponencial se centrifugó durante 45 min a 8.000 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se descarto. El precipitado fue resuspendido en 25 mL de KCl 2M, se adicionó 1 mg de ADNasa y lisozima, y se incubó durante 30 min a 37 °C. Luego, se centrifugó a 4 °C durante 30 min a 8.000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -4 °C.

2.7.3. Determinación cuantitativa de las proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó según el método de Bradford (1976), utilizando el sistema comercial *Bio-rad Protein Essay* (Biorad).

2.7.4. *Detección cualitativa de actividad monooxigenasa mediante zimograma*

La detección cualitativa de actividad monooxigenasa se realizó mediante un zimograma, según lo descrito por Zazueta-Sandoval y col. (2003). La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) no denaturante se realizó al 10%, el que se realizó con una mezcla de 13,3 mL de solución acrilamida/bisacrilamida (mezcla de 30 g de acrilamida y 0,8 gr de N,N-metilenbisacrilamida en H₂O destilada hasta 100mL), 10 mL de buffer fosfato a pH 7,5, 16,48 mL de H₂O destilada, 1 mL de persulfato de amonio al 10% y 5µL de TEMED. Se cargó 40 µL de extracto de crudo de proteínas en solución de carga (relación 1:1). El gel se corrió en buffer fosfato pH 7,5, durante 18 hrs a 80 V/cm (Ausubel, 2003). La presencia de proteínas en el gel de acrilamida se confirmó por la tinción con azul de comassie aplicado directamente en el gel y su posterior lavado con agua a 50 °C.

En el ensayo de actividad, el gel no-denaturante PAGE se sumergió en mezcla de reacción de 10 mL de solución A (20 mg de o-dianisidina disuelta en 15 ml de alcohol absoluto y titulado hasta 100 ml con buffer Tris-HCl 25mM, pH 7,5); 9 ml de buffer Tris-HCl, pH 7,5; y 1,0 ml de dodecano. El ensayo enzimático se realizó a 37 °C y se agitó hasta que apareció una banda de coloración café (Zazueta y col., 2003).

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos extremos

3.1.1. *Arqueas halófilas extremas*

Para la obtención de arqueas halófilas extremas, los sedimentos de las muestras llamadas Asc1, Asc2, Asc3 y Asc4 se enriquecieron en medio *SW* a 48 °C y se incubaron durante 14 días. Se determinó el estado de crecimiento a través de medición de DO a 600 nm y observaciones al microscopio. Posteriormente, los enriquecimientos se sembraron en placas *SW* y se incubaron durante 10 días a 48 °C. Distintas colonias pigmentadas fueron obtenidas de los enriquecimientos de Asc1, Asc2 y Asc3, las cuales fueron aisladas y traspasadas sucesivamente en medios sólidos y líquidos. Se obtuvieron un total de seis cultivos puros llamados: Asc1-i, Asc1-ii, Asc1-iii, Asc3-i, Asc3-ii y Acs3-iii (Fig. 5).



Figura 5. Fotografía de diferentes cultivos puros obtenidos utilizando medio *SW*. Los aislados se obtuvieron realizando traspasos sólidos y líquidos a 48 °C en medio *SW* al 23% y ajustado a pH 7,2. De izquierda a derecha: Asc1-i, Asc1-ii, Asc1-iii, Asc3-i, Asc3-ii, Acs3-iii y JurB (control positivo).

3.1.2. Selección de microorganismos en 2% de keroseno.

Los cultivos puros se inocularon al 10% (v/v) en medio *KSW* y se incubaron a 48 °C durante 10 días. Se determinó el estado del crecimiento a través de la medición de DO a 600 nm y observaciones al microscopio. Además se observó la emulsión del keroseno (datos no mostrados). Se observó que los microorganismos Asc1-i, Asc3-ii, Acs3-iii (Fig. 6) y Asc1-ii (no mostrado) fueron capaces de crecer en 2% de keroseno.

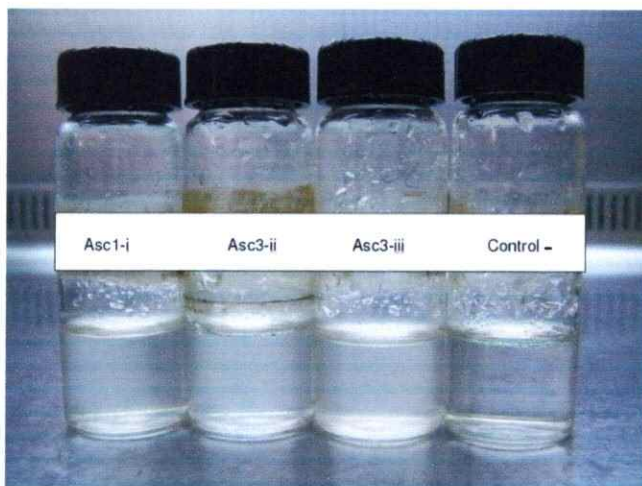


Figura 6. Fotografía de los cultivos puros creciendo en medio KSW. Los cultivos se realizaron en medio SW 23% de NaCl ajustado a pH 7,2 más 2 % de keroseno y sin peptona ni extracto de levadura. El crecimiento se determinó por la medición de DO a 600 nm en comparación al control.

3.1.3. Caracterización preliminar de los microorganismos seleccionados

La caracterización de los microorganismos capaces de crecer en kerosene al 2%, se realizó usando criterios microbiológicos análisis macroscópicos y microscópicos. El resumen de la caracterización se muestra en la Tabla 2 y la imagen de las colonias en la Figura 7.

Tabla 2. Caracterización preliminar de los microorganismos capaces de crecer en 2% de keroseno. Los aislados capaces de crecer en 2 de keroseno fueron caracterizados en base a su morfología macroscópica y microscópica. Además, fueron crecieron en placas de sal en un rango entre el 15 y 30%. La motilidad fue observada en tubos semi-tendidos con medio SW al 23% de NaCl al 0,2 % de agar.

<i>Característica</i>	<i>Asc1-i</i>	<i>Asc1-ii</i>	<i>Asc3-ii</i>	<i>Asc3-iii</i>
<i>Pigmentación</i>	Naranja claro	Naranja	Naranja oscuro	Naranja
<i>Forma colonia</i>	Irregular	Circular	Circular	Circular
<i>Elevación</i>	Plana	Plana	Convexa	Convexa
<i>Forma celular</i>	Diplococo	Pleomorfo	Coco	Coco
<i>Motilidad</i>	+	+	+	+
<i>Rango de concentración de sal en medio sólido</i>	20-30%	15-30%	15-30%	20-30%

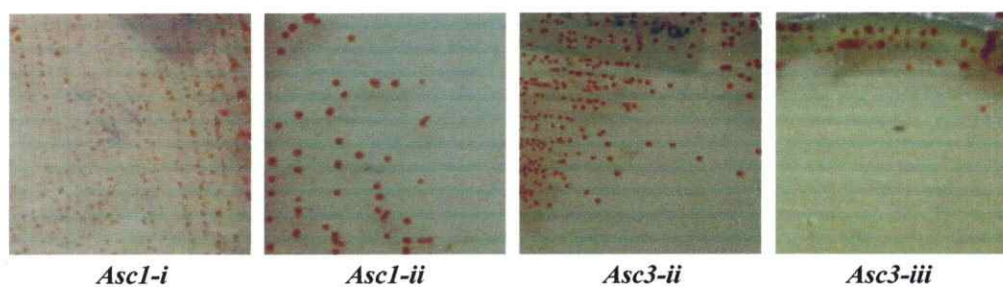


Figura 7. Fotografía de los aislados capaces de crecer en keroseno. Colonias de los diferentes aislados capaces de crecer en keroseno como única fuente de carbono y energía, mantenidas en placas R2A.

3.2. Análisis moleculares

3.2.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii, los cuales fueron seleccionados por su capacidad de crecer en 2 % de keroseno, se realizó a través de la modificación del protocolo propuesto por Yang y col (2007). Este protocolo resultó ser el que generó mayor cantidad de ADN. El ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis en 1% de gel de agarosa (Fig. 8).

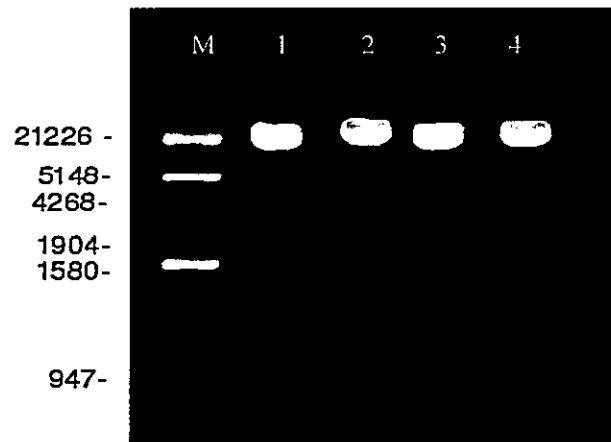


Figura 8. Extracción de ADN genómico de los microorganismos capaces de crecer en 2% de keroseno. Los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii se incubaron a 37 °C en medio SW al 23 % y ajustado a pH 7,2. El ADN de todos los aislados se sometió en 1% de gel de agarosa durante 40 min a 80V/cm. 1, Asc1-i; 2, Asc1-ii; 3, Asc3-ii y 4, Asc3-iii. M, marcador de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*.

3.2.2. Amplificación del gen 16S ADN ribosomal

La amplificación de la secuencia del gen 16S ADN ribosomal de los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii se realizó usando los partidores específicos para bacterias 27F, arqueas 21F en par con el partidador universal 1492R. La reacción de amplificación de la secuencia del 16S ADN ribosomal resultó positiva sólo para arqueas. Las reacciones con ADN

genómico sin diluir presentaron amplificación inespecíficas con pesos moleculares mayores al del gen 16S ADN ribosomal. El ADN diluido 10 veces también presentó amplificación de bandas inespecíficas pero se observó la amplificación que corresponde a la banda del gen 16S ADN ribosomal (Fig. 9).

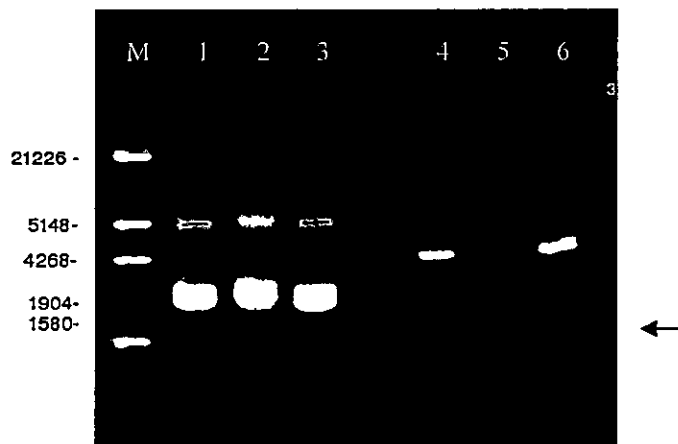


Figura 9. PCR del gen 16S ADN ribosomal para arqueas. PCR de la secuencia del 16S ADN ribosomal de los microorganismos Asc1-i, Asc3-ii y Asc3-iii crecidos a 37 °C en medio WS 23% y ajustado a pH 7,2 utilizando el partidor específico para arqueas 21F con el partidor universal 1492R. Los carriles 1, 2 y 3, muestran la amplificación positiva inespecífica para arqueas; Los carriles 4,5 y 6, muestran amplificación inespecífica para arqueas utilizando el ADN diluido 10 veces. Sólo el carril 6 posee amplificación con el tamaño correspondiente al 16S ADN ribosomal (flecha negra). 1, Asc1-i; 2, Asc1-ii y 3, Asc3-ii, neto. 4, Asc1-i; 5, Asc3-ii y 6, Asc3-ii, dilución 10. M, marcador de peso molecular lambda *EcoRI/HindIII*.

Para aumentar la especificidad de la amplificación de la secuencia del 16S ADN ribosomal, se probaron distintas concentraciones de $MgCl_2$, utilizando el ADN diluido 10 veces, Los resultados mostraron que se requirió una menor concentración de $MgCl_2$ (Fig. 10).

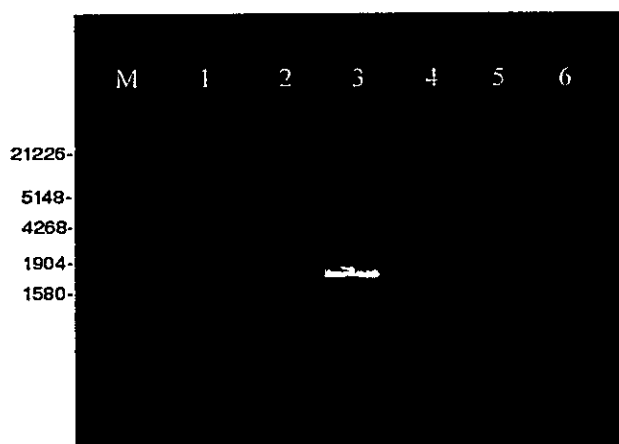


Figura 10. Especificidad del PCR en relación a la concentración de Mg^{2+} . La reacción de PCR se realizó a 6 diferentes concentraciones de $MgCl_2$, 3 mM (1), 2,5 mM (2), 2 mM (3), 1,5 mM (4), 1 mM (5) y 0,5 mM (6). M, marcador peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*.

En base a los resultados anteriores, el PCR para la secuencia del gen del 16S ADN ribosomal, se realizó utilizando el ADN diluido 10 veces y con 1 mM de $MgCl_2$ (Fig. 11).

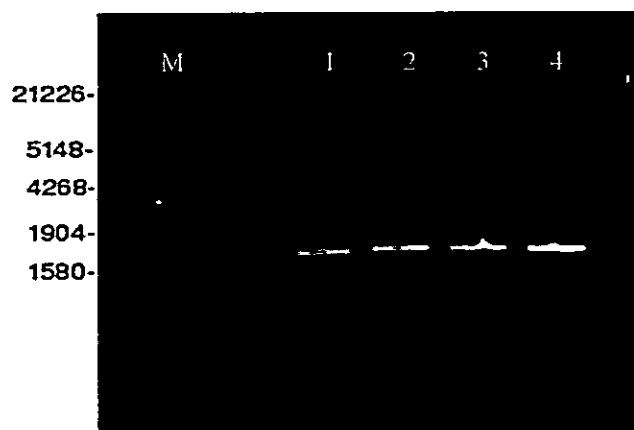


Figura 11. PCR optimizado de las diferentes secuencias del 16S ADN ribosomal. Amplificación de las secuencias del 16S ADN ribosomal de los microorganismos Asc1-i, Asc3-ii y Asc3-iii crecidos a 37 °C en medio WS 23% y ajustado a pH 7,2. 1, Asc1-i; 2, Asc1-ii; 3, Asc3-ii y 4, Asc3-iii. M, marcador de peso molecular Lambda *EcoRI/HindIII*.

3.3. Análisis filogenético

Los cromatogramas y secuencias en formato FASTA de los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii, se analizaron con diferentes herramientas bioinformáticas. Los cromatogramas se examinaron y corrigieron con la herramienta FinchTV. Posteriormente, las secuencias en formato FASTA corregidos fueron analizados con el programa BLASTn. Los resultados de los alineamientos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de BLASTn de los microorganismos Asc1-i, Asc1-ii, Asc3-ii y Asc3-iii. Los resultados muestran que los microorganismos aislados están cercanos a *Haloarcula marismortui* ATCC 43049.

Microorganismo	Alineamiento más significativo	Identidad	Gaps
<i>Asc1-i</i>	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	87 %	3 %
<i>Asc1-ii</i>	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	94%	0%
<i>Asc3-ii</i>	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	91%	1%
<i>Asc3-iii</i>	<i>Haloarcula marismortui</i> ATCC 43049	91%	2%

En base a los alineamientos realizados, diferentes secuencias del gen 16S ADN ribosomal del grupo de los Halobacteriales se seleccionaron, considerando miembros del género *Haloarcula*. Las secuencias se seleccionaron de las bases de datos del EMBL o RDP (*Ribosome Database Project*). Las secuencias se alinearon y cortaron con el programa ClustalX. Los análisis filogenéticos se realizaron con el criterio de máxima parsimonia usando el programa DNAPARS y se realizó un bootstrap de 1000. Para la selección del árbol se utilizó el programa CONSENSE. Para visualizar el árbol se usó el programa ViewTree. Los microorganismos

forman distintos nodos monofiléticos con especies del género *Haloarcula* (Fig. 12-14). En base a estos resultados, los microorganismos Asc3- ii y Asc3-iii fueron seleccionados para análisis posteriores.

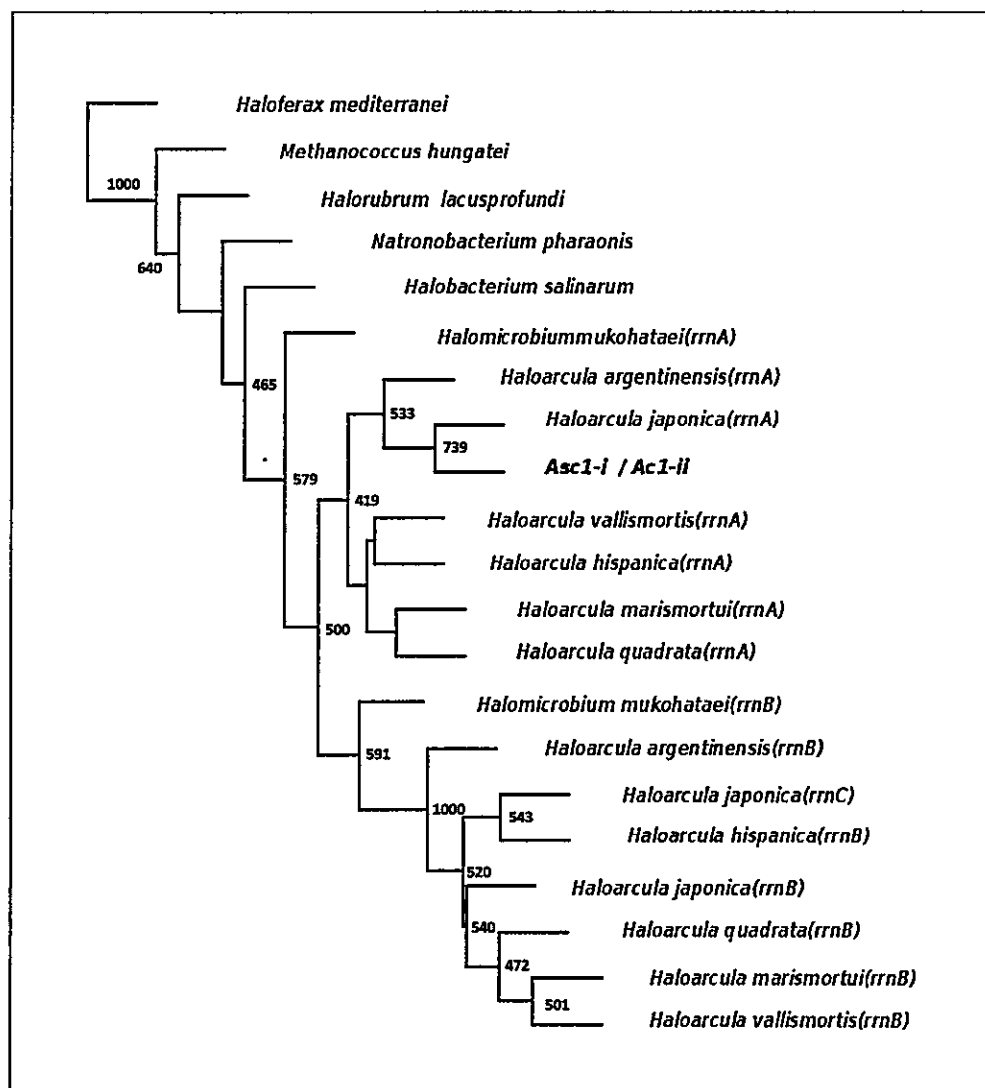


Figura 12. Cladograma para los microorganismos Asc1-i y Acs1-ii. Distintas secuencias del grupo halobacteriales se analizaron con los microorganismos Asc1 y Asc1-ii. Se observa que el microorganismo Asc1-i y Asc1-ii formaron el mismo nodo monofilético con *Haloarcula Japonica rrnA*, con un bootstrap de 739. La relación filogenética se realizó usando el criterio de máxima parsimonia. Los valores sobre 400 de *Bootstrap* son mostrados en los nodos.

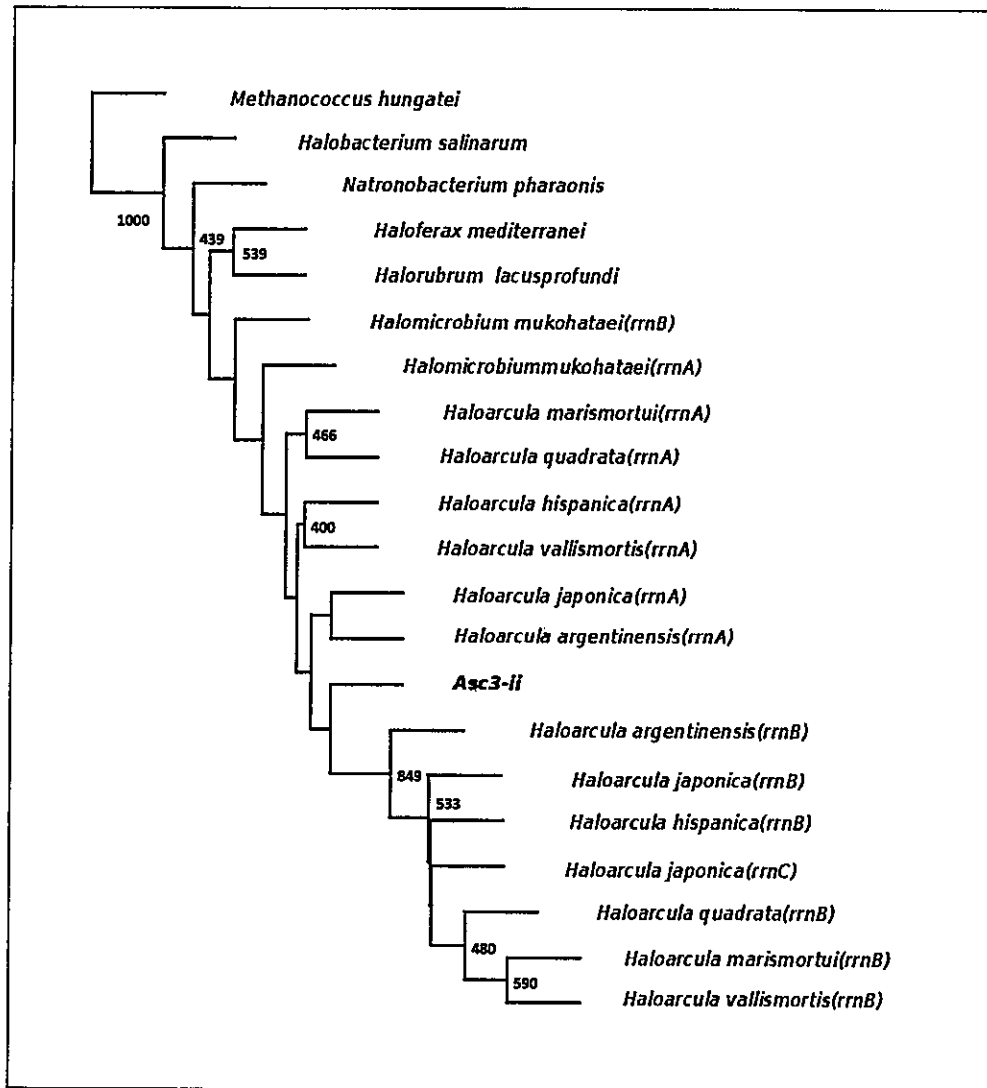


Figura 13. Cladograma para el microorganismo Asc3-ii. El estudio de los relaciones filogenéticas entre el microorganismo Asc3-ii, mostró que Asc3-ii agrupa a un nodo monofilético que contienen las especies de *Haloarcula japonica rrnA*, *Haloarcula argentinensis rrnA* y *Haloarcula argentinensis rrnB*. La relación filogenética se realizó usando el criterio de máxima parsimonia. Los valores sobre 400 de *Bootstrap* son mostrados en los nodos.

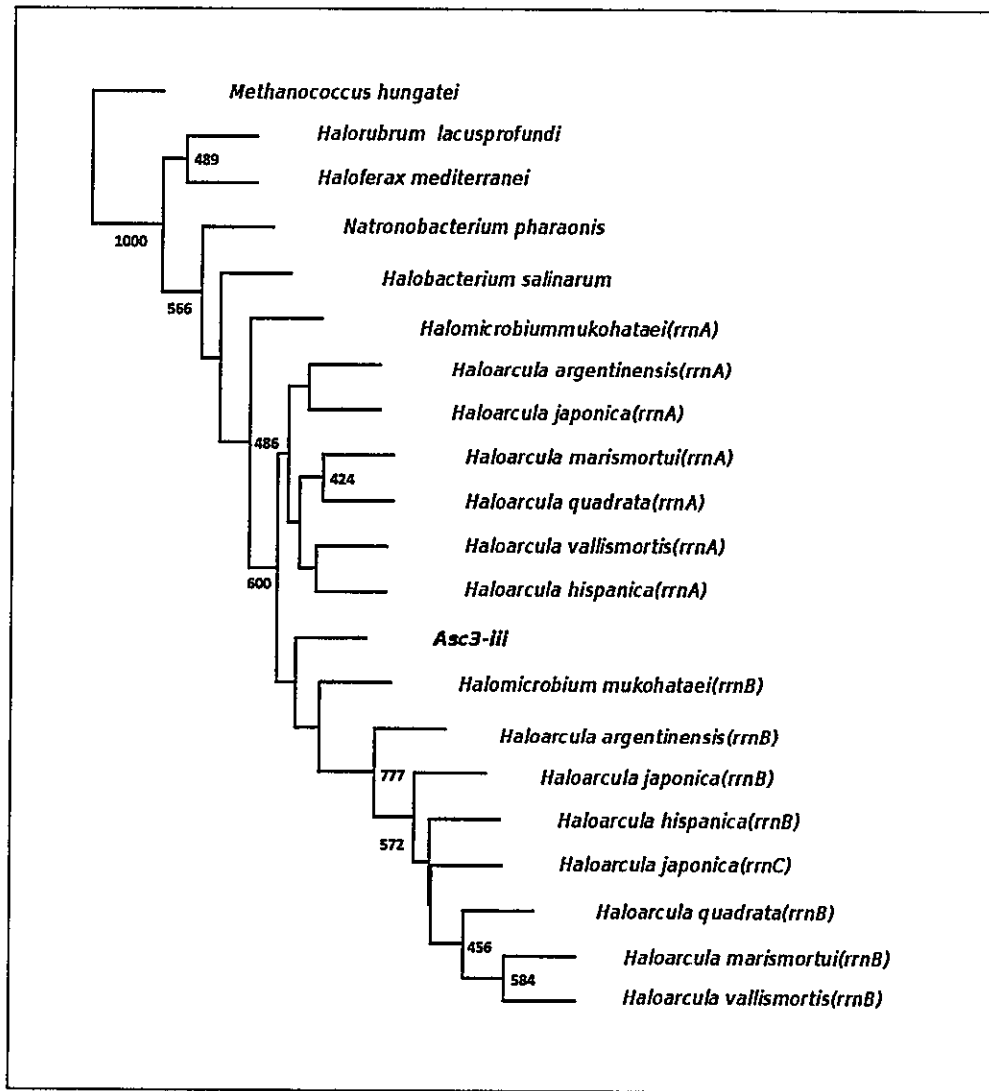


Figura 14. Cladograma para el microorganismo Asc3-iii. El estudio de las relaciones filogenéticas entre el microorganismo Asc3-iii, mostró que Asc3-iii comparte un nodo monofilético con las especies de *Haloarcula rrnB*. La relación filogenética se realizó usando el criterio de máxima parsimonia. Los valores sobre 400 de *Bootstrap* son mostrados en los nodos.

3.4. Estudio del crecimiento microbiano en función de la temperatura, pH y sal total

3.4.1. Velocidad de crecimiento microbiano en función de la temperatura

El estudio de la cinética del crecimiento microbiano de los microorganismos Asc3-ii y Asc3-iii en relación a la temperatura se realizó a ocho temperaturas diferentes: 4, 10, 19, 29, 33, 37, 41 y 45 °C, durante 15 días. El progreso del crecimiento se determinó a través de la toma de muestras y mediciones de DO a 600 nm (en triplicado). Ambos microorganismos no presentaron crecimiento a 4 y 10 °C (resultados no mostrados). En cambio, sí presentaron crecimiento entre los 19 y 45 °C (Fig. 15). De los gráficos se desprende que la velocidad de crecimiento μ ($\ln [DO_t/DO_0]/[t-t_0]$, t en días) tiene un comportamiento similar a partir de los 19 °C. No obstante, se observó una relación inversa entre el tiempo de la fase lag y la temperatura (Fig. 15).

Para definir una temperatura óptima en un tiempo t, se considero el crecimiento microbiano ocurrido entre el primer y cuarto día, intervalo de tiempo que se consideró para el resto de los estudios.

Las velocidades de crecimiento obtenidos para las diferentes temperaturas en los microorganismos Asc3-ii y Asc3-iii, mostraron que el microorganismo Acs3-ii presentó una velocidad de crecimiento mayor a 37 y 45 °C y el microorganismo Asc3-iii presentó una velocidad de crecimiento mayor a 33 °C (Fig. 16).

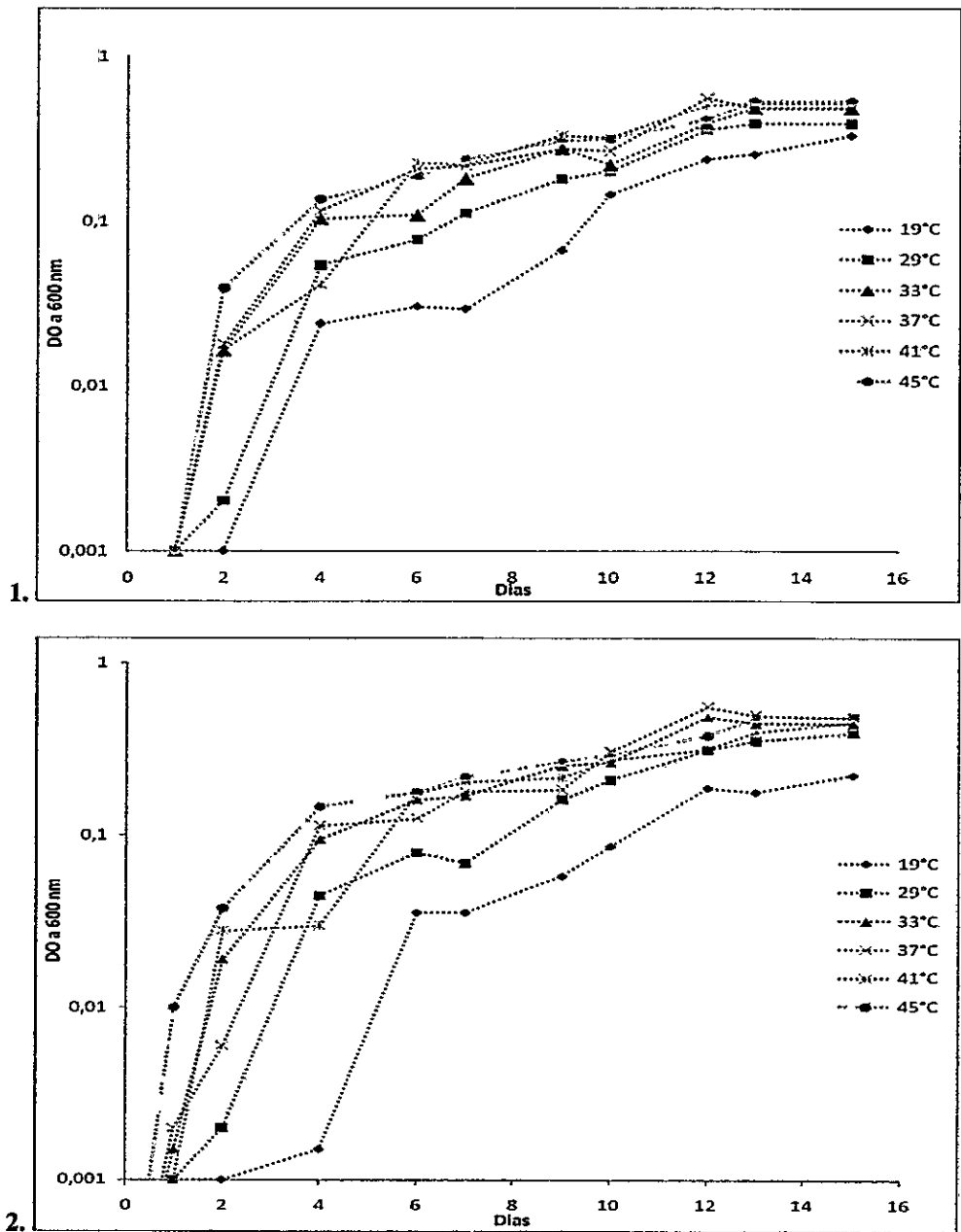


Figura 15. Crecimiento microbiano de Asc3-ii y Asc3-iii en función a la temperatura. Los microorganismos Asc3-ii (1) y Asc3-iii (2) se incubaron en medio SW al 23 % de NaCl y ajustado a pH 7,2. La medición de la DO a 600 nm (en triplicado) se realizó durante 15 días.

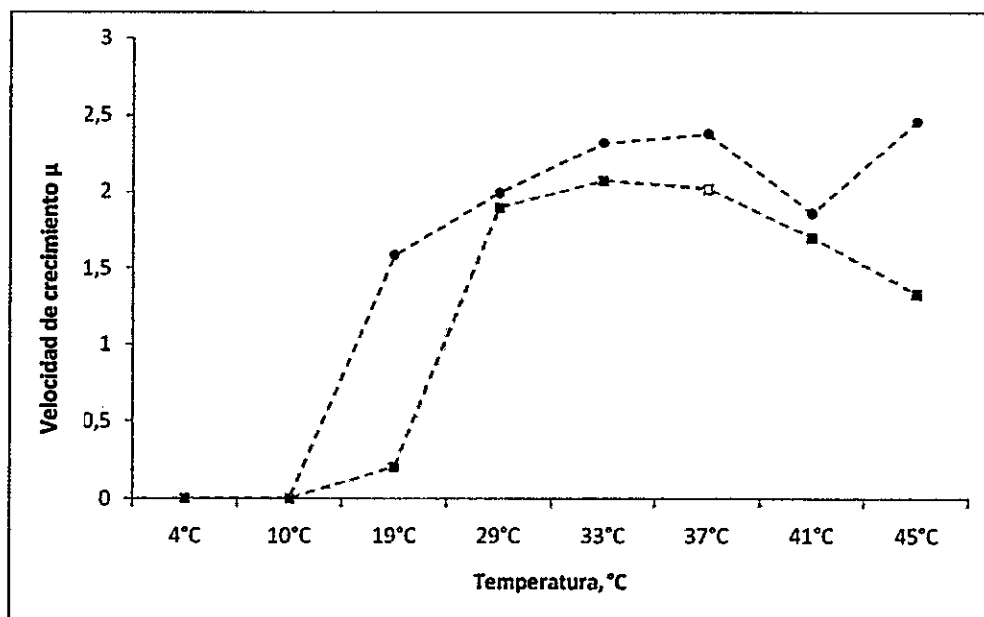


Figura 16. Velocidad de crecimiento de Asc3-ii y Asc3-iii en función de la temperatura. Los microorganismos Asc3-ii (●) y Asc3-iii (■) fueron crecidos en medio SW 23 % y ajustado a pH 7,2, exhibieron una velocidad de crecimiento μ directamente proporcional hasta los 37 °C. Posteriormente presentaron comportamientos diferentes.

3.4.2. Velocidad de crecimiento microbiano en relación al pH

La velocidad de crecimiento μ en relación al pH se estudio entre el primer y cuarto día, Las distintas velocidades registradas para los diferentes pH para los microorganismos Asc3-ii y Asc3-iii son mostrados en la Figura 17. De los resultados graficados se observó que el microorganismo Asc3-ii tuvo una mayor velocidad de crecimiento a pH 7,5. A diferencia, para Asc3-iii ocurre a pH 7,0.

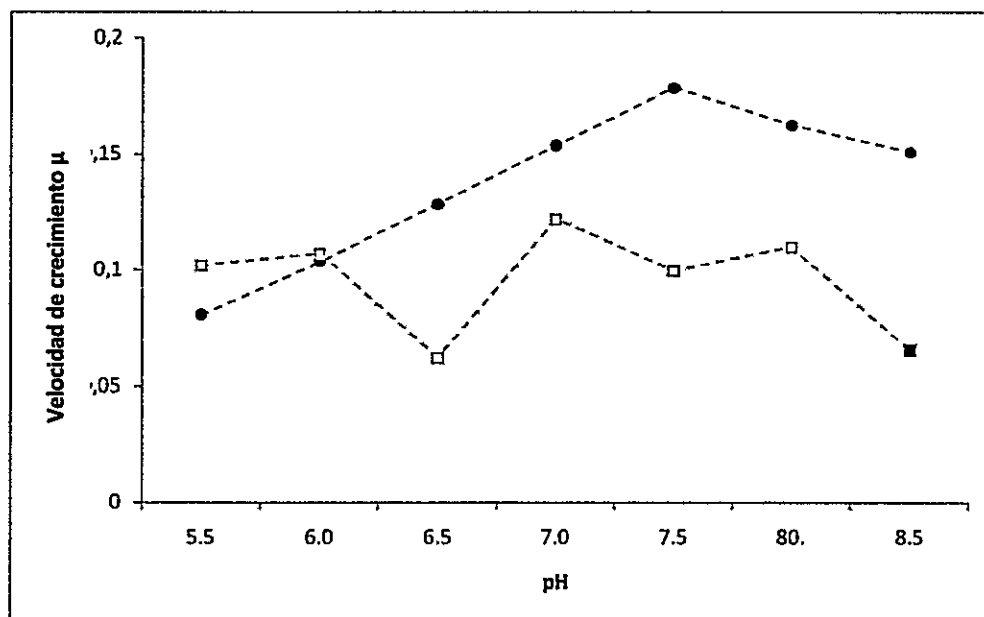


Figura 17. Velocidad de crecimiento de Asc3-ii y Asc3-iii en función al pH. Los microorganismos Asc3-ii (●) y Asc3-iii (■) fueron crecidos a 37 °C en medio SW 23%, mostrando una velocidad de crecimiento μ mayor a pH neutro.

3.4.3. Velocidad de crecimiento en relación a la concentración total de sal.

La velocidad de crecimiento en relación a la concentración total de sal se estudió entre el primer y cuarto día para el microorganismo Asc3-ii y Asc3-iii. La velocidad de crecimiento para Asc3-iii no se logró determinar debido a la presencia de contaminación a concentraciones menores al 20% (datos no mostrados). Las distintas velocidades de crecimiento del microorganismo Asc3-ii en relación a la concentración de sal total se graficó (Fig. 18). Los resultados mostraron que la mayor velocidad de crecimiento se obtiene a 27,5 % de sal total.

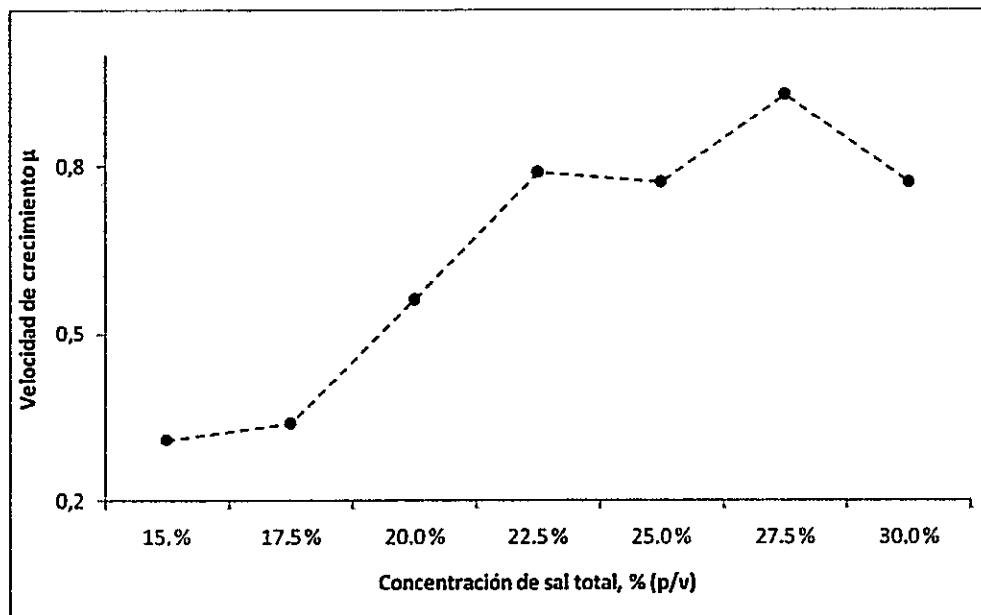


Figura 18. Velocidad de crecimiento del microorganismo Asc3-ii en función a la concentración de sal total. El microorganismo Asc3-ii (●) incubado a 37 °C en medio *SW* y ajustado a pH 7,2, presentando una velocidad de crecimiento μ mayor a 27,5% de sal.

3.5. Caracterización microbiológica del microorganismo Asc3-ii

3.5.1. Curva de crecimiento

Basado en los resultados filogenéticos y en los estudios de crecimiento microbiano en relación a la temperatura, pH y concentración de sal total, el microorganismo Asc3-ii se seleccionó para la caracterización microbiológica. El microorganismo Asc3-ii se creció a 45 °C, pH 7,5 y 27,5 % de sal total (Fig. 19). La curva de crecimiento se construyó mediante recuento celular en cámara *Neubauer* 0,01 (en triplicado) durante 17 días. La curva de crecimiento presentó dos fases de crecimiento exponencial, el primero con un tiempo de generación de 2,17/día entre el día 1 y 4 y el segundo con un tiempo de generación de 0,38/día entre el día 4 y 8. La fase estacionaria se presenta entre el día 8 y 10, seguido de la fase de muerte. El recuento de las células en cámara *Neubauer* 0,01 entregó un valor de $1,76 \times 10^7$ cel/mL, hacia el final de la fase exponencial.

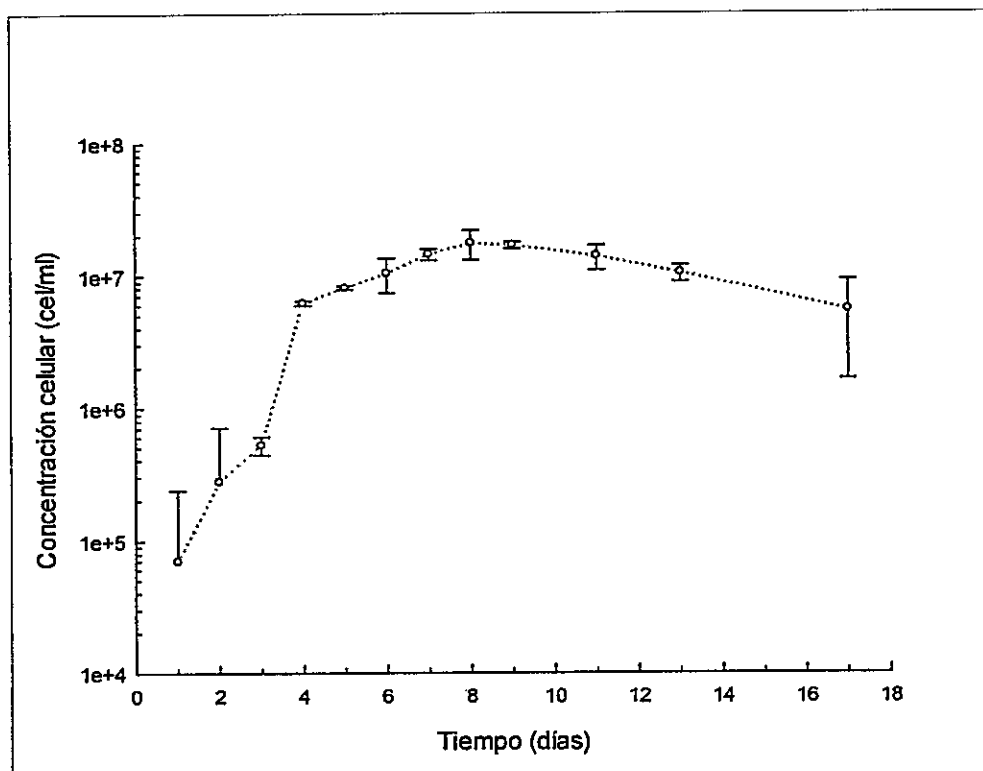


Figura 19. Curva de crecimiento de Asc3-ii en condiciones óptimas. El microorganismo Asc3-ii se incubó a 45 °C en medio *SW* al 27,5 % de NaCl, ajustado a pH 7,5. La fase exponencial se extiende hasta el día 8, la fase estacionaria hasta al día 10 y la fase de muerte se extiende a partir de ahí.

3.5.2. Crecimiento anaeróbico

El crecimiento anaeróbico a través de la reducción de nitrato por el microorganismo Asc3-ii, resultó positivo (Fig. 20). Con este resultado el microorganismo Asc3-ii es clasificado como aeróbico facultativo, capaz de utilizar el nitrato como ultimo aceptor de electrones. El ensayo de crecimiento anaeróbico de Asc3-ii vía fermentación del aminoácido L-arginina se monitoreó durante 10 días sin resultados positivos.



Figura 20. Crecimiento anaeróbico mediante la reducción del nitrato en Asc3-ii. El microorganismo Asc3-ii se creció a 45 °C en medio *SW* al 27,5 % de NaCl, ajustado a pH 7,5 bajo condiciones anaeróbicas. A la derecha, ensayo colorimétrico positivo de reducción de nitrato positivo sobre el cultivo Asc3-ii, en donde se aprecia la coloración rosada. A la izquierda, el control negativo. El ensayo colorimétrico sigue la reacción, $2NO_3^- + 4e + 4H^+ \rightarrow 2NO_2 + 2H_2O$

3.5.3. Crecimiento utilizando distintos sustratos

El crecimiento del microorganismo Asc3-ii se estudio utilizando distintos sustratos como única fuente de carbono y energía, tanto en medios sólidos como líquidos. Los ensayos monitoreados durante 10 días fueron positivos para galactosa, sorbitol, sacarosa y manitol. Por lo tanto, el microorganismo Asc3-ii posee maquinaria metabólica para usar distintos carbohidratos como una fuente de carbono y energía.

3.5.4. Test para la catalasa

El ensayo para la catalasa en el microorganismo Asc3-ii resulto positivo a través de la aparición de burbujas sobre una cantidad de colonias (Fig. 21).

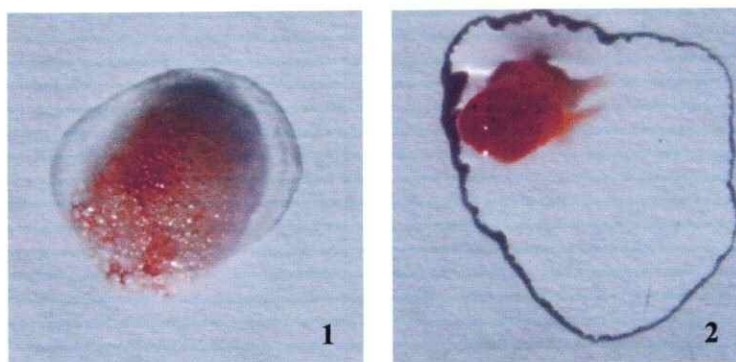


Figura 21. Ensayo para la presencia de catalasa en cultivo de Asc3-ii. Células provenientes de placas de cultivo fueron mezcladas con agua oxigenada al 30%. **1**, colonias con H₂O₂; **2**, colonias sin H₂O₂. La aparición de las burbujas en la figura de la izquierda indica la presencia de actividad catalasa. Las burbujas de O₂ son producidos por la reacción $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

3.5.5. *Test para la oxidasa*

La presencia de actividad se observó mediante el cambio a una coloración violeta de un papel impregnado con células del microorganismo Asc3-ii. El test para la oxidasa para la presencia de enzimas tipo citocromo, resultado positivo para el microorganismo Asc3-ii (datos no mostrados).

3.5.6. *Ensayo actividad esterasa y proteasa.*

El ensayo de actividad esterasa y proteasa específico para halobacteriales, durante el transcurso de 10 días no presentó actividad positiva.

3.6. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido se realizó según lo descrito por Nicolaus y col. (1999). Debido a que las condiciones ambientales de temperatura, pH y concentración de sales afecta la morfología celular de las arqueas halófilas extremas, se utilizaron las mayores velocidades de crecimiento encontradas para Asc3-ii. Las células del microorganismo Asc3-ii se lavaron con una solución al 10% de NaCl para que no ocurriera lisis osmótica y se fijaron en etanol. El microorganismo Asc3-ii presentó morfología cocoide de aproximadamente 8 μm de diámetro (Fig. 22).

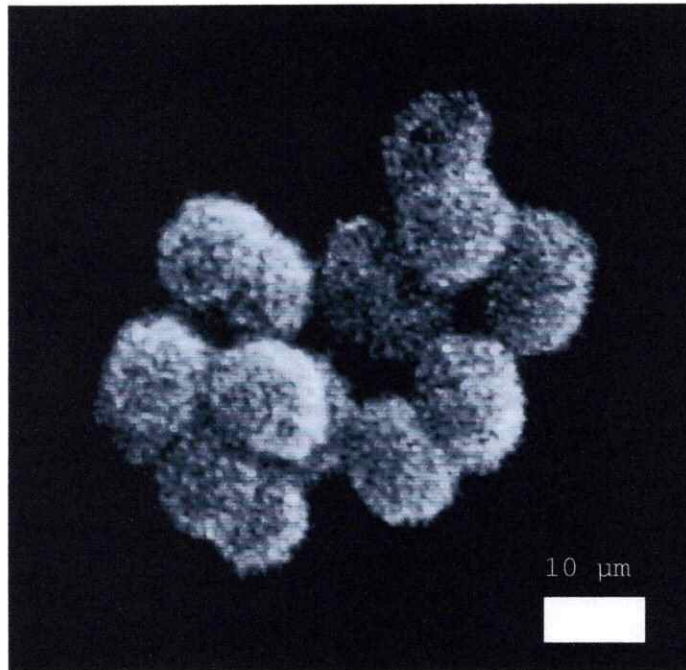


Figura 22. Imagen de microscopía electrónica de barrido para el microorganismo Asc3-ii. Las células del microorganismo Asc3-ii fijadas en oro-paladio y visualizadas en un microscopio electrónico de barrido (EOL JSM-T300, resolución de hasta 10nm) presentan morfología cocoide.

3.7. Estudio de la actividad enzimática monooxigenasa para hidrocarburos

3.7.1. Degradación específica de hidrocarburos

En el estudio de degradación específica de hidrocarburos, el microorganismo Asc3-ii se inoculó a 37 °C en diferentes medios SW al 23% de NaCl (sin extracto de levadura ni peptona) adicionado sólo con hexadecano, dodecano o keroseno como única fuente de carbono y energía. El estudio se realizó al 23 % de NaCl y no al 27,5% de NaCl (la concentración óptima encontrada para Asc3-ii), debido a que se reporta una relación inversa entre concentración de NaCl y solubilidad de los hidrocarburos (Margesin y Schinner, 2001). Los resultados mostraron que el microorganismo Asc3-ii creció diferencialmente en dodecano, hexadecano y keroseno, siendo el crecimiento ligeramente mayor en dodecano (Fig. 23). No se realizó recuento celular al microscopio debido a la presencia de los hidrocarburos, que dificulta el enfoque.

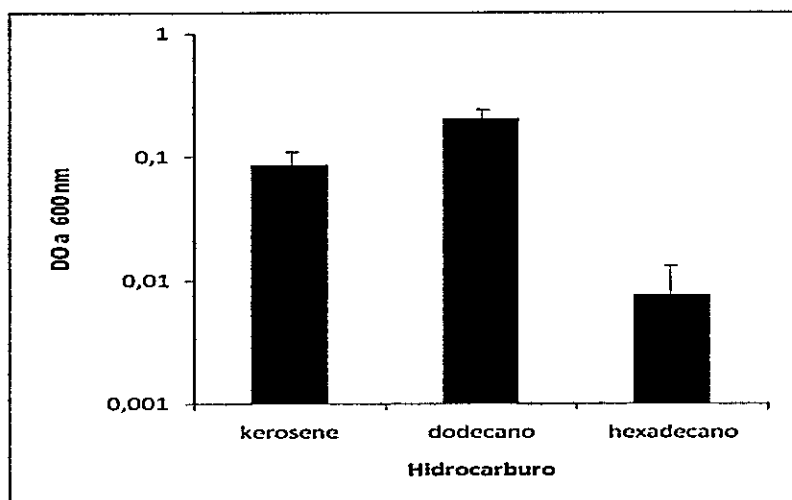


Figura 23. Crecimiento del microorganismo Asc3-ii en diferentes hidrocarburos. El microorganismo Asc3-ii se inoculó a 37 °C en medio SW al 23% sin extracto de levadura ni peptona y se adicionó hexadecano (7 mM), dodecano (7 mM) o kerosene (2% (v/v)). Después de 72 hrs de incubación, el crecimiento observado a través de la medición de DO a 600 nm.

3.7.2. Detección cualitativa de actividad monooxigenasa mediante zimograma

La actividad enzimática para monooxigenasas tipo citocromo P450 en el microorganismo Asc3-ii, se estudio a través de un zimograma. El extracto crudo de proteínas se obtuvo de un cultivo que creció a 37 °C en medio *WS* al 23% de NaCl, ajustado a pH 7,5 sin extracto de levadura y con dodecano y peptona (disminuida a 1 g/L). La peptona se agregó debido a que diferentes ensayos mostraron que las células del microorganismo sólo crecían adheridas a la superficie de las micelas de dodecano, obteniéndose un bajo rendimiento de masa celular (resultados no mostrados). El extracto crudo obtenido se cuantificó mediante el método de Bradford.

El extracto crudo se ensayo a distintos pH (datos no mostrados), para lograr que las proteínas nativas entraran en el gel de poliacrilamida (*PAGE*) no denaturante. Mediante la tinción de proteínas con azul de Coomassie, se observó bandas de proteína nativa en el gel de poliacrilamida a pH 7,5 (Fig. 24).

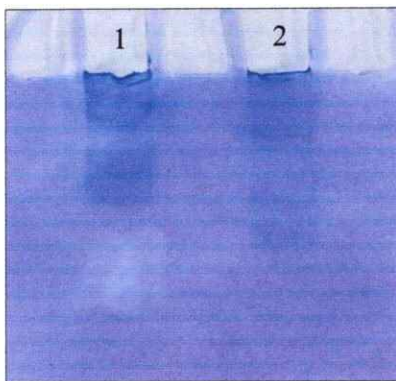


Figura 24. Tinción de proteínas de un extracto crudo de Asc3-ii en PAGE no denaturante. El extracto fue sometido a una electroforesis en PAGE no denaturante durante 18 hrs. La tinción con azul de Coomassie, mostró la presencia de bandas de proteína nativa presentes en el gel a pH 7,5. **1**, 9,45 mg/mL de proteína; **2**, 4,75 mg/mL de proteína.

Para el ensayo de actividad, el PAGE no denaturante con las proteínas nativas, se sumergió en 10 mL de una mezcla de reacción de solución A, que contiene o-dianisidina y dodecano (ver materiales y métodos). El ensayo realizado a 37 °C y con agitación suave, presentó la aparición de una banda de coloración café a los 15 minutos, el cual corresponde al ensayo positivo para actividad monooxigenasa tipo citocromo P450 (Fig. 25).

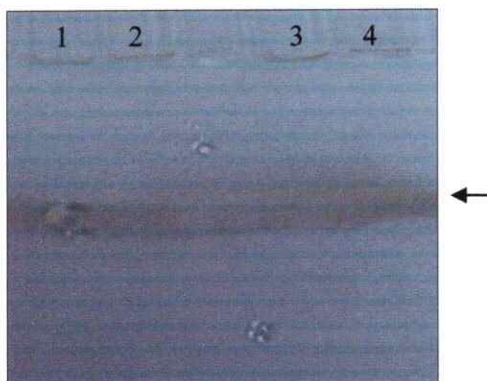


Figura 25. Zimograma de actividad monooxigenasa con dodecano como sustrato. El PAGE no denaturante de Asc3-ii, fue sumergido en solución con dodecano como sustrato y o-dianisidina. La actividad monooxigenasa se reveló por la banda de color café debido a la oxidación de la o-dianisidina (flecha negra). **1-2** y **3-4**, se cargaron a concentraciones finales de 9,45 mg /mL y 4,75 mg /mL de proteínas totales, respectivamente.

4. DISCUSIÓN

4.1. Detección y aislamiento de microorganismos

En este trabajo la presencia de microorganismos halófilos extremos en el salar de Ascotan se demostró a través de técnicas cultivo dependientes, tal como sugirió Demergasso y col. (2004) a través de técnicas moleculares. La utilización del medio modificado *SW* en el sistema atalosalino de Salar de Ascotan y la utilización de 48 °C en el enriquecimiento, resultó una estrategia cultivo dependiente adecuada para el aislamiento de arqueas halófilas extremas. No obstante, es posible que sólo una parte de la diversidad haya sido detectada (Papke y col., 2007).

La presencia de microorganismos halófilos extremos con el potencial de degradar hidrocarburos de cadena saturada se observó usando el medio *KSW* propuesto en este trabajo. Se destaca que la concentración de 2% de keroseno utilizada, corresponde al doble de lo usado en trabajos para búsqueda de bacterias degradadoras de hidrocarburos (Aislabie y col., 2006; Saul y col., 2005). La concentración se eligió en base que los sitios contaminados en donde se ha estudiado la degradación microbiana de hidrocarburos en ambientes hipersalinos es mayor al 2% (Le Borgne y col., 2008). Otro hecho importante fue la observación de emulsión del keroseno (*datos no mostrados*), siendo esto un índice claro de degradación del hidrocarburo y también una potencial presencia de biosurfactantes (Ron y Rosenberg, 2002).

En la caracterización preliminar de los microorganismos seleccionados, la presencia de pigmentación naranja, morfología celular pleomorfica y crecimiento en placas en un rango entre 15 a 30% de sal total, sugirieron la presencia de arqueas halófilas extremas.

4.2. Biología molecular

La extracción de ADN genómico consistió básicamente en lisis osmótica. Se prefirió este método por el alto % de rendimiento de ADN comparado a la extracción fenol cloroformo (Dyall-Smith, 2006). Sin embargo, hubo dificultades en la amplificación específica en la secuencia del gen del 16S ADN ribosomal, posiblemente a debido las sales presentes en el extracto. La dilución y estandarización de la concentración de $MgCl_2$, mejoró la especificidad de la reacción de PCR. Sin embargo, es posible que un proceso de purificación previo, hubiera mejorado significativamente la especificidad de la reacción de PCR.

4.3. Análisis filogenéticos

Los cromatogramas obtenidos mostraron un alto contenido de bases nitrogenadas pirimidicas guanidina-citocina y sectores con ruido, definido como zonas en el cromatogramas donde no se pudo determinar qué base nitrogenada correspondía. Es conocido que la presencia de ruido es común en el estudio de microorganismos del dominio Archaea, sin embargo, la presencia de los sectores de específicos sectores con ruido podría sugerir la presencia de polimorfismo en el gen 16S ADN ribosomal hecho observado en el género *Haloarcula*, el cual posee tres genes 16S ADN ribosomal. Para dilucidar esto, lo que debe realizarse es la clonación de la secuencia completa del gen 16S ADN ribosomal.

El análisis filogenético mostró que los microorganismos pertenecían a la orden halobacteriales, género *Haloarcula*. Los resultados de los árboles filogenéticos indicaron que los aislados Asc1-i y Asc1-ii eran la misma especie. El aislado Asc3-ii agrupó en un nodo monofilético que incluyó a las especies *Haloarcula Japonica* rrnA, *Haloarcula argentinensis* rrnA y *Haloarcula argentinensis* rrnB. El aislado Asc3-iii agrupó en un nodo monofilético que incluyó a todas las especies de *Haloarcula* rrnA. Sin embargo, algunos nodos presentaron valores de *bootstrap* menores a 400 (valores no mostrados), esto podría explicarse por el tamaño

de las secuencias utilizadas (450-500 pb), el cual esta en el limite para los análisis con el criterio de máxima parsimonia. En relación al origen de las muestras, los resultados son consistentes con la descripción de microorganismos cercanas a *Haloarcula* mediante técnicas cultivo independendientes en el Salar de Ascotan (Demergasso y col., 2004). Si bien *Haloarcula* no suele ser uno de los microorganismos más abundantes dentro de un ecosistema, es conocido por ser uno de los géneros cultivables debido a su capacidad de crecer en una diversidad de sustratos (Papke y col., 2007).

4.4. Crecimiento microbiano en relación a la temperatura, pH y sal total.

Durante el estudio del crecimiento microbiano en función a la temperatura en los microorganismos Asc3-ii y Asc3-iii, se observó una velocidad de crecimiento relativamente constante a partir de los 19 °C. La diferencia principal correspondió al tiempo de la fase lag, la cual disminuía al aumentar la temperatura. Para la elección de una temperatura optima en un tiempo determinado, se determino la velocidad de crecimiento entre primer y cuarto día. El microorganismo Asc3-ii mostró una mayor velocidad de crecimiento a 37 y 45 °C. A diferencia, el microorganismo Asc3-iii, presento velocidad de crecimiento mayor a 33 °C, con un posterior decaimiento a temperaturas mayores. El resultado de Asc3-ii es consistente con la descripción de otras arqueas halófilas extremas cuyo óptimo de velocidad de crecimiento está cercano a los 50 °C (Papke y col., 2007).

Con respecto al pH ambos microorganismos presentaron una mayor velocidad de crecimiento a pH neutro. Este resultado es consistente con las mediciones realizadas en el Salar de Ascotan (Richaser y col., 1999).

La velocidad de crecimiento microbiano en relación a la concentración de sal sólo se realizó en el microorganismo Asc3-ii, el cual presento mayor a una concentración total de 27,5% de sal.

4.5. Caracterización microbiológica del microorganismo Asc3-ii

El microorganismo Asc3-ii se selecciono en base los resultados filogenéticos y los resultados del estudio de crecimiento microbiano en relación a la temperatura, pH y concentración de sal total. La realización de la curva de crecimiento en condiciones óptimas presento un comportamiento particular. Directamente de la curva puede observarse la presencia de 2 fases de crecimiento exponencial, la primera hacia el final del cuarto día con un tiempo de duplicación de 2,17/día y la segunda con un tiempo de duplicación de 0,38/día. Este comportamiento, llamado crecimiento microbiano complejo, ha sido descrito en arqueas halófilas extremas y ha sido especialmente estudiando en *Halobacterium salinarum* NRC817, en donde se ha descrito hasta 6 distintas velocidades de crecimiento en la fase exponencial (Shand y Pérez, 1999). Este comportamiento ocurriría similarmente al conocido crecimiento diauxico, donde existe una preferencia una preferencia de sustratos según su disponibilidad (Madigan, 2006).

Los ensayos microbiológicos se realizaron siguiendo todos los protocolos para la caracterización de un taxón de la orden halobacteriales propuestos por Oren y col. (1997). El crecimiento anaeróbico a través de la desnitrificación resulto positivo. Este resultado es común en arqueas halófilas extremas, las cuales presentan un metabolismo que evoluciono desde un ambiente reducido presente en la tierra primitiva, hacia el actual ambiente oxidado (Oren, 2002). La capacidad del microorganismo Asc3-ii de crecer en diversas fuentes de carbono, evidencio la gran diversidad metabólica que posee el orden halobacteriales. La presencia de catalasa y oxidasa para citocromo P450, mostró la presencia de mecanismos de reparación y detoxificación para la mantención de la integridad celular.

Los resultados del análisis filogenético y la caracterización microbiológica sugieren que el microorganismo Asc3-ii corresponde a una nueva especie del género *Haloarcula*. En la Tabla 4,

se comparan las características del microorganismo Asc3-ii obtenidas en este trabajo con los otros miembros del género *Haloarcula* ya descritos.

Tabla 4. Propiedades de diferenciación del microorganismo Asc3-ii con otras especies válidamente descritas del género *Haloarcula*. Los datos derivan de los trabajos de Oren y col. (1999).

<i>Característica</i>	<i>Asc3-ii</i>	<i>Haloarcula vafismortis</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>	<i>Haloarcula hispanica</i>	<i>Haloarcula jeponica</i>	<i>Haloarcula argentinensis</i>	<i>Haloarcula mukohataei</i>	<i>Haloarcula quadrata</i>
<i>Forma Dominante</i>	<i>Cocos</i>	<i>Bacilar</i>	<i>Pleo-morfo</i>	<i>Bacilar corto</i>	<i>triangular</i>	<i>triangular</i>	<i>Bacilar corto</i>	<i>cuadrada</i>
<i>Motilidad</i>	+	+	+-	+	+	+	+	+
<i>Hidrólisis de Gelatina</i>	-	-	-	+	-	ND	ND	-
<i>Hidrólisis de Almidón</i>	ND	+	+	+	-	ND	ND	+
<i>Hidrólisis de caseína</i>	ND	-	ND	+-	-	ND	ND	-

+, Positiva; -, negativo; +-, variable; ND, no se dispone de datos.

4.6. Microscopia electrónica de barrido

La realización de la microscopia de barrido es una herramienta esencial para la caracterización, pues la morfológica de las arqueas halófilas extremas es diversa. Un inconveniente se produjo en el proceso de fijación del microorganismo Asc3-ii, el cual debió realizarse con una concentración molar NaCl al 10%, para evitar la lisis osmótica. Esto resulto en que la imagen de la microscopia electrónica de barrido realizada, presentará ruido (la rugosidad de la superficie de los microorganismos). La morfología cocoide se presento para el microorganismo Asc3-ii, el cual no ha sido descrito previamente en el género *Haloarcula*.

4.7. Estudio de la actividad monooxigenasa para hidrocarburos

Sin bien distintos trabajos mencionan la degradación de hidrocarburos en ambientes hipersalinos mediada por microorganismos, todavía no ha sido bien establecido cuales son los microorganismos y los sistemas enzimáticos involucrados. El hexadecano, dodecano y keroseno corresponden a hidrocarburos saturados de cadena mediada a larga. El hexadecano es un hidrocarburo saturado de 6 carbonos (denominado C₆), el dodecano es un hidrocarburo saturado de 12 carbonos (denominado C₁₂) y el keroseno es una mezcla de hidrocarburos saturados entre 6 y 12 carbonos (hidrocarburos entre C₆-C₁₂) (Olivier y Magot, 2005). Estos hidrocarburos representan entre el 30 y 40 % de la proporción de los hidrocarburos presentes en los sitios contaminados por derrames de petróleo (Olivier y Magot., 2005). van Beilen y col. (2005) describe los principales sistemas enzimáticos que metabolizan hidrocarburos, donde diferentes clases de enzimas degradan específicos hidrocarburos, dependiendo del tamaño (Tabla 5).

Según los resultados obtenidos y la información previamente descrita sobre la degradación aeróbica de hidrocarburos, el sistema enzimático putativo que explica la degradación en el microorganismo Asc3-ii, corresponde al citocromo P450.

Tabla 5. Enzimas que son capaces de degradar hidrocarburos saturados (adaptada de van Beilen y col., 2005)

Enzima	Composición y cofactores	Ej. microorganismos con el sistema	Sustrato
Clase I P450	P450 oxigenasa: P450 hemo Ferredoxina: (2Fe-2S) Ferredoxina reductasa: FAD, NADH	<i>Sphingomonas sp. HXN-200</i> , <i>Mycobacterium sp. HXN-1500</i> , <i>Acinetobacter sp. EB104</i>	C ₄ -C ₁₆
Clase II P450 (CYP 52)	Oxigenasa microsomal: P450 hemo Reductasa: FAD, FMN, NADPH	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	C ₁₀ -C ₁₆
Clase II P450 (CYP2E, CYP4B)	Oxigenasa microsomal: P450 hemo Reductasa: FAD, FMN, NADPH	Humanos y conejos	C ₆ -C ₁₀
Alcano hidroxilasa integral de membrana	Membrana hidroxilasa: Fe dinuclear Rubredoxina: Fe Rubredoxina reductasa: FAD, NADH	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	C ₁ -C ₁₀

Por otro lado, a través de una aproximación bioinformática, se reveló la presencia de un ORF (*open reading frame*) que codificando para un posible citocromo P450 clase I en el genoma secuenciado de *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 (Fig. 26). El citocromo P450 es una enzima que posee distintas funciones en la célula, siendo el principal responsable del metabolismo oxidativo de los agentes xenobióticos respondiendo a ellos mediante una oxidación que agrega un alcohol primario bajando su toxicidad (van Beilen y col., 2007).

Este resultado podría explicar el porqué se presentaría la degradación de hidrocarburos en sistemas hipersalinos contaminados y en los microorganismos aislados del Salar de Ascotan, sitio que previamente no había sufrido contaminación.

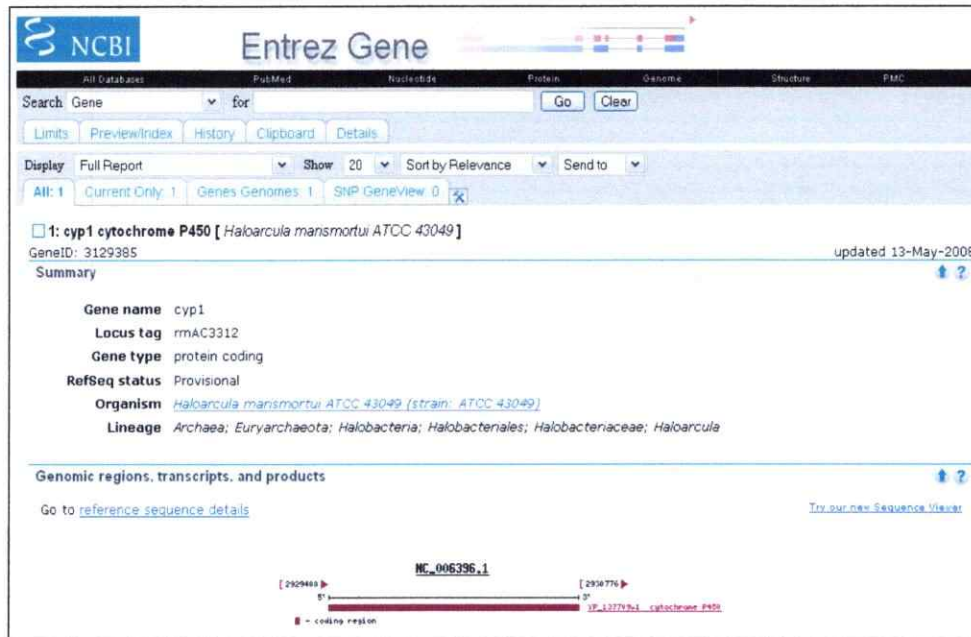


Figura 26. Citocromo P450 clase I en *Haloarcula marismortui*, monooxigenasa putativa en el microorganismo Asc3-ii. La presencia del *ORF* que codifica para un posible citocromo P450 clase I en el genoma *Haloarcula marismortui* ATCC 43049, hallado a través del alineamiento de las diferentes secuencias de enzimas monooxigenasas descritas.

Para corroborar estos resultados, son necesarios otros estudios enzimáticos que involucren el aislamiento y caracterización del citocromo P450 y de su relación con la degradación de diferentes hidrocarburos.

5. CONCLUSIÓN

- La presencia de microorganismos halófilos extremos en muestras provenientes del Salar de Ascotan se demostró por el aislamiento de seis microorganismos.
- La selección de cuatro microorganismos con la capacidad de crecer en 2% de keroseno mostró la presencia microorganismos con potencial de degradar hidrocarburos.
- Los microorganismos seleccionados correspondían a arqueas halófilas extremas, pertenecientes al grupo halobacteriales y cercanos al género *Haloarcula*.
- La velocidad de crecimiento en Asc3-ii fue mayor a 45 °C, pH neutro y una concentración del 27,5% de sal.
- La caracterización microbiológica usando protocolos para la descripción de un taxón en halobacteriales, sugiere que Asc3-ii corresponde a una nueva especie, *Haloarcula sp.*
- La actividad monooxigenasa involucrada en la degradación de hidrocarburos en el microorganismo *Haloarcula sp.*, se demostró a través de un zimograma para monooxigenasas tipo citocromo P450.

6. REFERENCIAS

- Abdennadher N.** y R. Boesch (2007). Porting PHYLIP phylogenetic package on the desktop GRID platform XtremWeb-CH. *Stud. Health. Technol. Inform.* 126: 55-64.
- Aislabie J., D. Saul y J. Foght** (2006). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10: 171-179.
- Alexander B., S. Leach y W. Ingledew** (1987). The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1171-1179.
- Alexander M.** (1999). Biodegradation and bioremediation, 2nd ed. Academic Press, London.
- Altschul S., W. Gish, W. Miller, E. Myers y D. Lipman** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ausubel F.** (2003). Current protocols in molecular biology. Kevin Struhl ed.
- Bernhardt R.** (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124: 128-145.
- Bertrand J., M. Almallah, M. Acquaviva y G. Mille** (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 260-263.
- Boone D., R. Castenholz y G. Garrity** (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volumen 1. The Archea and deeply branching and photrophic bacteria.* Springer-Verlag, New York, New York, USA
- Bordoloi N. y B. Konwar** (2008). Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces* 63: 73-82.
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Curtis T. y W. Sloan** (2005). Microbiology: exploring microbial diversity a vast below. *Science* 309: 1331-1333.
- Dassarma P. and S. Dassarma** (2008). On the origin of prokaryotic "species": the taxonomy of halophilic Archaea. *Saline Systems* 4: 5.
- Dassarma S.** (2006). *Saline Systems highlights for 2005.* *Saline Systems* 2: 1.

- Demergasso C, G. Chong, P. Galleguillos, L. Escudero, M. Martínez-Alonso y I. Esteve (2003).** Microbial mats from the Lllamará salt flat, northern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 485-499.
- Demergasso C., E. Casamayor, G. Chong, P. Galleguillos, L. Escudero y C. Pedros-Alio (2004).** Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 57-69.
- Dyall-Smith M. (2008).** Protocols for haloarchaeal genetics. Book Ver 7.0. Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, 3010 Australia. www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/Halohandbook_2008_v7.pdf
- Falb M., K. Müller, L. Königsmaier, T. Oberwinkler, P. Horn, S. von Gronau, O. Gonzalez, F. Pfeiffer, E. Bornberg-Bauer y D. Oesterhelt (2008).** Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 12: 177-196.
- Girguis P., A. Cozen y E. DeLong (2005).** Growth and population dynamics of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a continuous-flow bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3725-3733.
- Gutiérrez C. y C. González (1972).** Method for simultaneous detection of proteinase and esterase activities in extremely halophilic bacteria. *Appl. Microbiol.* 24: 516-517.
- Harayama S., Y. Kasai y A. Hara (2004).** Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 205-214.
- Horikoshi K. y W. Grant (1998).** *Extremophiles: microbial life in extreme environments.* New York, Wiley-Liss.
- Jetten M. (2008).** The microbial nitrogen cycle. *Environ. Microbiol.* 10: 2903-2909.
- Kulichevskaya I., E. Milekhina, I. Borzenkov, I. Zvyagintseva y S. Belyaev (1992).** Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology* 60: 596-601.
- Larraín-Linton J., E. Pinto y J. Blamey (2007).** *Extreme Microorganisms and their Biotechnological Applications*, Chapter 11. *Biotechnology for food, agriculture and environment V2.*
- Le Borgne S., D. Paniagua y R. Vazquez-Duhalt (2008).** Biodegradation of organic pollutants by halophilic Bacteria and Archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15: 74-92.

- Madigan M., J. Martinko y J. Parker (2006)** Brock's Biology of Microorganisms. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall.
- Maidak B., G. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. McCaughey y C. Woese (1997)**. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 25: 109-111.
- Maidak B., J. Cole, T. Lilburn, C. Parker, P. Saxman, R. Farris, G. Garrity, G. Olsen, T. Schmidt y J. Tiedje (2000)**. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28: 173-174.
- Mancinelli R. y L. Hochstein (1986)**. The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS. Microbiol. Letters* 35: 55-58.
- Margesin R. y F. Schinner (2001)**. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 650-663.
- Nicolaus B., L. Lama, E. Esposito, M. Manca, R. Improta, M. Bellitti, A. Duckworth, W. Grant y A. Gambacorta (1999)**. *Haloarcu*la sp. able to biosynthesize exo- and endopolymer. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 489-496.
- Ogunseitán O. (2005)**. Microbial diversity: form and function in prokaryotes. Malden, MA, Blackwell Pub.
- Ollivier B. y M. Magot (2005)**. Petroleum microbiology. Washington, D.C., ASM Press.
- Oren A., A. Ventosa y W. Grant (1997)**. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order halobacteriales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 233-238.
- Oren A, A. Ventosa, M. Gutiérrez y M. Kamekura (1999)**. *Haloarcu*la *quadrata* sp. nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 3: 1149-1155.
- Oren A. (2002)**. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 56-63.
- Oren A. (2005)**. Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Vol. 9
- Oren A. (2008)**. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2.
- Papke R., O. Zhaxybayeva, E. Feil, K. Sommerfeld, D. Muise y W. Doolittle (2007)**. Searching for species in haloarchaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14092-14097.

- Podar M y A. Reysenbach (2006).** New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:250-5
- Rainer H, H. Sickinger y D. Oesterhelt (1980).** Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3821-3825.
- Rainey F. y A. Oren (2006).** *Extremophiles*. Amsterdam ; Boston, Elsevier, Academic Press.
- Retief J. (2000).** Phylogenetic analysis using PHYLIP. *Methods Mol. Biol.* 132: 243-58.
- Risacher F., H. Alonso y C. Salazar (1999).** Geoquímica de aguas en cuencas cerradas: I, II, III regiones - Chile. Ministerio de Obras Públicas, Dirección General de Aguas, Universidad Católica del Norte, *Institut de Recherche pour le Developpement*.
- Rodriguez-Valera F., F. Ruiz-Berraquero y A. Ramos-Cormenzana (1979).** Isolation of extreme halophiles from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 164-165.
- Ron E. y E. Rosenberg (2002).** Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 249-252.
- Saul D., J. Aislabie, C. Brown, L. Harris y J. Foght (2005).** Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 141-155.
- Shand R. y A. Pérez (1999).** Haloarchaeal growth physiology. Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. Joseph Seckbach, Kluwer Academic Publishers, Chapter 32, 411-424.
- Schiraldi C., M. Giuliano y M. De Rosa (2002).** Perspectives on biotechnological applications of Archaea. *Archaea* 1: 75-86.
- Thompson J., T. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. Higgins (1997).** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Torsvik V., F. Daae, R. Sandaa y L. Ovreas (1998).** Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64: 53-62.
- Torsvik V. y L. Ovreas (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- van Beilen J. y E. Funhoff (2005).** Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 308-14.

- van Beilen J., E. Funhoff, A. van Loon, A. Just, L. Kaysser, M. Bouza, R. Holtackers, M. Röthlisberger, Z. Li y B. Beilen (2006). Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 59-65.
- van Beilen J. y E. Funhoff (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13-21.
- Wentzel A., T. Ellingsen, H. Kotlar S. Zotchev y M. Throne-Holst (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1209-1221.
- Woese C., O. Kandler y M. Wheelis (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
- Yang Y., H. Cui, P. Zhou y S. Liu (2007). *Haloarcula amylolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 103-106.
- Zazueta-sandoval R., V. Novoa, S. Jimenez y R. Cabrera (2003). A different method of measuring and detecting mono and dioxygenase activities: key enzymes in hydrocarbon biodegradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105: 725-736.
- Zyyagintseva I., S. Belyaev, I. Borzenkov, N. Kostrikina, E. Milekhina y M. Ivanov (1995). Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field. *Microbiology* 64: 67-71.