



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Capacidad de remoción de iones de calcio y producción
de exopolisacáridos de bacterias halotolerantes
provenientes del Refugio de Vida Silvestre Los
Pantanos de Villa, Lima – Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Luz Xiomara SALCEDO CASTILLO

ASESOR

Dr. Marcos Alejandro SULCA LOPEZ

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Salcedo, L. (2023). *Capacidad de remoción de iones de calcio y producción de exopolisacáridos de bacterias halotolerantes provenientes del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, Lima – Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Luz Xiomara Salcedo Castillo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	48075620
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0000-4650-4878
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Marcos Alejandro Sulca Lopez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41283664
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9056-0068
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Susana Monica Gutierrez Moreno
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08060631
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Pedro Luis Castellanos Sánchez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09649588
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07576929

Datos de investigación	
Línea de investigación	No aplica.
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. B20100851.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.05968 Longitud: -77.08213
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Ecología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.13 Biología marina, Biología de agua dulce, Limnología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.12



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA MICROBIÓLOGA
PARASITÓLOGA**

(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 09:07 horas del 23 de noviembre del 2023, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **LUZ XIOMARA SALCEDO CASTILLO**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230100827, la titulando expuso su tesis: **CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE IONES DE CALCIO Y PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS DE BACTERIAS HALOTOLERANTES PROVENIENTES DEL REFUGIO DE VIDA SILVESTRE LOS PANTANOS DE VILLA, LIMA – PERÚ**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9 calificativo: Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **LUZ XIOMARA SALCEDO CASTILLO** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 10:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de noviembre de 2023.

Dra. SUSANA MONICA GUTIERREZ MORENO
(PRESIDENTA)

Dr. MARCOS ALEJANDRO SULCA LOPEZ
(ASESOR)

Dr. PEDRO LUIS CASTELLANOS SANCHEZ
(MIEMBRO)

Mg. DEBORA ELIZABETH ALVARADO IPARRAGUIRRE
(MIEMBRO)



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo MARCOS ALEJANDRO SULCA LÓPEZ en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000299-2022-D-FCB/UNMSM de la tesis de investigación, cuyo título actual es CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE IONES DE CALCIO Y PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS DE BACTERIAS HALOTOLERANTES PROVENIENTES DEL REFUGIO DE VIDA SILVESTRE LOS PANTANOS DE VILLA, LIMA – PERÚ, presentado por la bachiller LUZ XIOMARA SALCEDO CASTILLO para optar el Título profesional de bióloga microbióloga parasitóloga, CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **7%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título profesional correspondiente.

Firma del Asesor
DNI: 41283664
Dr. Marcos Alejandro Sulca López



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi asesor, el Dr. Marcos Alejandro Sulca López, y a la Mg. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre, por sus orientaciones, paciencia inquebrantable y constante apoyo. Sus consejos siempre fueron invaluablemente útiles cuando necesitaba dar forma a mis pensamientos e ideas en este trabajo. Ustedes formaron parte esencial de esta historia y sus contribuciones profesionales han sido cruciales en este camino académico.

A mis estimados docentes, cuyas palabras sabias y conocimientos rigurosos y precisos han enriquecido mi formación. Les debo una deuda de gratitud por compartir su sabiduría de manera profesional e invaluable. Llevaré sus enseñanzas conmigo en mi trayecto profesional.

A mi familia, ustedes han sido siempre mi principal motor y fuente de inspiración. Durante las horas de estudio más intensas y las noches más largas, estuvieron a mi lado, brindándome su apoyo inquebrantable.

Al Laboratorio de Microbiología Acuática y Aplicaciones Tecnológicas y el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, agradezco por brindarme el apoyo necesario para llevar a cabo la parte experimental de esta investigación. Su colaboración fue esencial para el éxito de este proyecto.

También quiero expresar mi agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación y Postgrado (VRIP) de la UNMSM por la subvención otorgada, mediante RR N° 01686-R-20 con código B20100851, el financiamiento de esta tesis como parte del Programa de Desarrollo de Tesis de Pregrado de la universidad. Esta financiación fue un pilar fundamental para la realización de este estudio.

ABREVIATURAS

- **[Ca²⁺]**: Concentración del ion calcio, en ppm o mg/L
- **°GH**: Grado de dureza total
- **μ**: Constante específica de crecimiento
- **AC**: Anhidrasa carbónica
- **ACC**: Ácido calcón carboxílico
- **AHA**: Ácido acetohidroxámico
- **ANOVA**: Análisis de la varianza
- **ATP**: Adenosín trifosfato
- **Ca²⁺**: Ion calcio
- **CE**: Conductividad Eléctrica
- **Células/mL**: Células por mililitro.
- **DO**: Densidad óptica, se mide en nanómetros
- **dS/m**: Decisiemens por metro
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético
- **kwh/m³**: kilovatios hora de energía por metro cubico de agua.
- **LB**: Caldo Luria Bertani
- **LN**: Medio de cultivo compuesto de medio LB, urea y CaCl₂x2H₂O
- **m.s.n.m.**: Metros sobre el nivel del mar
- **MBC**: Mineralización biológicamente controlada
- **MBI**: Mineralización biológicamente inducida
- **Mg²⁺**: Ion magnesio
- **min**: Minutos

- **MS:** Medio manitol Salado.
- **OMS:** Organización mundial de la salud
- **p/v:** Relación peso/volumen
- **PCMI:** Precipitación de carbonatos microbiológicamente inducida
- **pH:** Potencial de hidrogeno
- **pKa:** Logaritmo negativo (-log) de la constante de disociación ácida Ka
- **ppm:** Partes por millón
- **RVSPV:** Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa
- **SERNANP:** Servicio Nacional de Áreas Protegidas por el Estado
- **SG:** Medio Sehgal and Gibbons
- **SPE:** Sustancias poliméricas extracelulares
- **v/v:** Relación volumen/volumen

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. EL REFUGIO DE VIDA SILVESTRE LOS PANTANOS DE VILLA.....	4
2.2. MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES	5
2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES.....	5
2.2.2. APLICACIONES DE LOS MICROORGANISMOS HALÓFILOS Y HALOTOLERANTES	7
2.3. RELACIONES ENTRE LOS MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES Y OTROS IONES.....	8
2.4. PROBLEMÁTICA DEL USO DE AGUAS CON ALTA DUREZA	9
2.5. BIOMINERALIZACIÓN Y REMOCIÓN DEL CALCIO SOLUBLE.....	12
2.5.1. ENZIMA UREASA.....	15
2.6. ANTECEDENTES	19
III. OBJETIVOS.....	22
3.1. OBJETIVOS GENERALES	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
4.1. VERIFICACIÓN DE LA PUREZA EN LOS AISLADOS BACTERIANOS	23
4.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS	23
4.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS SEGÚN CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO.....	25
4.3. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DEL ION SODIO	26
4.3.1. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MÁS APROPIADO PARA LA MEDICIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE).....	26
4.3.2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS.....	26
4.3.3. LECTURA DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE).....	27
4.4. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD UREASA	27
4.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	28
4.6. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DEL ION CALCIO	28

4.6.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	28
4.6.2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS.....	31
4.6.3. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO SIN UREA.....	32
4.6.4. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO CON UREA.....	32
4.6.4.1. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO LN A 140 PPM DE CALCIO	32
4.6.4.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO LN A 400 PPM DE CALCIO	33
4.7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA	36
4.7.1. PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA	36
4.7.1.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MICROPLACA	36
4.7.1.2. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA	37
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
V. RESULTADOS.....	39
5.1. VERIFICACIÓN DE LA PUREZA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS	39
5.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS	39
5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS SEGÚN CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO.....	41
5.3. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DE SODIO	43
5.4. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD UREASA.	44
5.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS	47
5.6. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DEL ION CALCIO	50
5.6.1. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO SIN UREA.....	50
5.6.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO CON UREA.....	52
5.7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MICROPLACA DE LAS CEPAS UREASA POSITIVAS.....	56
5.7.1. CRECIMIENTO EN MEDIO LB Y LN	56
5.7.2. CRECIMIENTO EN MEDIO LB A DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE INÓCULO Y MEDIO LN A DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE CALCIO	57
5.7.3. CRECIMIENTO EN MEDIO LN, LN SIN CALCIO Y LN SIN UREA	60
5.8. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA.....	64
VI. DISCUSIÓN	69
6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS	70
6.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO.....	72

6.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA	76
VII. CONCLUSIONES	79
VIII. RECOMENDACIONES	79
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
X. ANEXO	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de microorganismos halófilos (Oren, 2006; Daoud y Ben Ali, 2020).	6
Tabla 2. Clasificación de la dureza por CaCO_3 en el agua, según la World Health Organization (2004).	8
Tabla 3. Características culturales de las cepas en medio LB a los 4 días de incubación.	46
Tabla 4. Remoción de calcio en medio LN.	52
Tabla 5. Condiciones que favorecieron el crecimiento de las cepas ureolíticas en medio LB y medio LN.	60
Tabla 6. Condiciones que favorecieron el crecimiento de las cepas ureolíticas en medio LN, LN sin CaCl_2 y LN sin urea.	63
Tabla 7. Clasificación según la producción de biopelículas de las cepas a 24 °C, a las 48 y 72 horas de incubación estacionaria.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tubería afectada por los precipitados de calcio y magnesio, debido al paso de aguas de alta dureza.	10
Figura 2. Esquema del funcionamiento de una celda de flotación. Las partículas minerales se adhieren a las burbujas de aire y son llevadas a la superficie.....	11
Figura 3. Principio de la prueba de la ureasa. Se determina la capacidad de una bacteria de hidrolizar la urea en amoníaco y CO ₂ . (Frías-Ordoñez y Regino, 2017).	16
Figura 4. Descripción general de la precipitación de calcita mediada por ureólisis. <i>S. pasteurii</i> sirve como sitio de nucleación para la precipitación de CaCO ₃ en las partículas de arena, la urea se descompone dentro del microorganismo. El NH ₃ y CO ₂ se difunden a través de la pared celular hacia la solución circundante (DeJong et al., 2010).	18
Figura 5. Procedimiento para la valoración complejométrica de iones de Ca ²⁺ , utilizando el Kit comercial Aquaforest.....	31
Figura 6. Metodología en valoración complejométrica para evaluar la remoción del ion calcio. (1) Preparación de la muestra y (2) Valoración con EDTA. En la parte inferior se observa el matraz izquierdo (último rastro de color púrpura justo antes del punto final) y el matraz derecho (color azul claro en el punto final).	35
Figura 7. Procedimiento de tinción de microplaca para evaluar la formación de biopelícula.	38
Figura 8. Diagrama en pastel de la característica macroscópica del color (A) y la forma microscópica (B) de las 53 cepas aisladas del RVSPV.....	39
Figura 9. Tinción de Gram de las cepas ureasa positivo a 1000X de aumento. Se pueden observar que todas las cepas son cocos Gram (+) en racimo.....	40
Figura 10. Caracterización de las 6 cepas bacterianas ureasa positiva respecto a un gradiente de concentración de NaCl con lectura a las 24 horas de incubación, a excepción	

de la placa a 20% NaCl, la cual se leyó también a las 72 horas y 5 días de incubación. Cada cepa bacteriana se replicó en el mismo número de posición de cada cuadrícula de la placa 1QL (1), 5EL (2), II3BR (3), II3KR (4), II3OR (5), III4VR (6), las ultimas 3 placas de abajo corresponden a crecimiento a 20% de NaCl, todas las placas se replicaron por duplicado.....	42
Figura 11. Comparación de los tratamientos con diferentes cepas respecto a los valores de CE (dS/m) para cada 7 días de medición en medio SG (CE inicial 43.9 dS/m). El blanco es el medio SG no inoculado.....	43
Figura 12. Comparación de los tratamientos con diferentes cepas respecto a los valores de CE (dS/m) para cada 7 días de medición en medio LB (CE inicial 10.4 dS/m). El blanco fue el medio no inoculado.	44
Figura 13. Tubos inoculados con 11 cepas en medio urea de Christensen incubados por 72 horas; se encuentran ubicadas de izquierda a derecha las cepas 1QL, 5EL, I2QR, II2SR, II3KR, II3OR, III2LR, III3FFR, III4VR, III5WWR y IV2YR. Las cepas ureasa positivas son la 1QL, 5EL, II3KR, II3OR y III4VR. La cepa II3BR no aparece en la imagen debido a que se identificó posteriormente como ureasa positiva.	45
Figura 14. Cepas de estudio en placas con medio agar LB después de 4 días de incubación a 24 °C; se puede observar la formación de pigmentos naranjas en las cepas 1QL, II3KR y II3OR; las cepas 5EL, II3BR y III4VR no evidencian formación de pigmentos.	46
Figura 15. Pruebas bioquímicas realizadas para las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR. Todas son ureasa (+); A/NC y SH ₂ (-) en medio LIA; Motilidad (-), Indol (-) y K/NC en medio MIO; A/NC y sin producción de gas en TSI; citrato (-); manitol (+); nitrato reductasa (+); rojo de metilo (-); ninguna hidroliza el Tween 80 (-); y son gelatinasa (-), a excepcion de la cepa III4VR (+).....	49

Figura 16. Remoción de calcio por la cepa II2SR en medio LB suplementado a diferentes concentraciones de Ca^{2+} (70 ppm y 140 ppm). La línea punteada representa la tasa de remoción del 78.57% de Ca^{2+} cuando la concentración inicial era de 140ppm en un periodo de 21 días.	50
Figura 17. Remoción de calcio en medio LB suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se utilizaron cepas ureolíticas (5EL y II3KR) y no ureolíticas (I2QR, II2SR, III2LR y III3FFR). La concentración de Ca^{2+} inicial fue de 140ppm.	51
Figura 18. En todos los matraces se vieron dos fases, en el fondo se pudo evidenciar una precipitación blanquecina con la biomasa.	53
Figura 19. Tasa de remoción de calcio de las 6 cepas ureasa positivo. Las bacterias fueron cultivadas en medio LN a 24 °C en condiciones estáticas. En la gráfica se representa la tasa de remoción de calcio según la fórmula (8). Cada símbolo representa la media de remoción de calcio (%), con su respectiva desviación estándar como barras de error, realizada por la cepa 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR, respectivamente. El grupo control es la cepa E. coli ATCC 25922, y el blanco es el medio de cultivo sin bacteria. Se realizó la prueba de ANOVA unidireccional de la remoción de calcio (%), cuyo **** representa una diferencia significativa cuyo valor de p es < 0.0001. Todas las cepas se diferencian significativamente (p < 0.0001) respecto al control negativo.	54
Figura 20. Variación del pH con respecto al tiempo para las cepas ureasa positiva incubadas en matraz para la prueba de remoción biológica de Ca^{2+} . En promedio el pH se elevó hasta 9.33.	55
Figura 21. Matraces de las cepas E. coli (izquierda) y III4VR (derecha) después de 14 días de incubación a 24 °C. Se puede apreciar la precipitación de cristales en el matraz III4VR, probablemente debido a la biomineralización. En cambio, en el matraz inoculado con E. coli ATCC 25922 (ureasa negativa) no se observa ninguna precipitación.	56

Figura 22. Cinética de crecimiento en medio LB (A) y LN (B), las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR fueron inoculadas al 0.5% (1.5×10^6 células/mL).	57
Figura 23. Cinética de crecimiento de las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR en medio LB a diferente concentración de inóculo (0.5-2.5%) y medio LN a diferente concentración de calcio (140-400 ppm).	59
Figura 24. Cinética de crecimiento de las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR en medio LN, LN sin CaCl_2 y LN sin urea.	63
Figura 25. Biopelícula en microplaca teñida con cristal violeta. Las filas A-F fueron inoculadas con las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR, respectivamente. La columna 1-3, 4-6, 7-9 y 10-12, contiene los medios que fueron previamente inoculados que son LB, LN, LN sin CaCl_2 y LN sin urea, respectivamente. La fila G1-3 y G7-9 contienen al control positivo (<i>E. coli</i> ATCC 25922) y la fila G4-6 y G10-12 al control negativo (<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600) inoculados en LB (G1-6) Y LN (G7-12). La fila H contiene a los medios sin inocular (blancos), la prueba se realizó por triplicado.	64
Figura 26. Formación de la biopelícula a 48 y 72 horas de las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR utilizando la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 12600 como control negativo. Los medios utilizados fueron (A) LB, (B) LN, (C) LN sin calcio y (D) LN sin urea. Las barras representan ± 1 desviación estándar. Los asteriscos diferencias significativas entre las cepas y el control, para las 48 horas de incubación ($p < 0.05$).	66
Figura 27. Formación de biopelícula para las cepas (A)1QL, (B)5EL, (C)II3BR, (D)II3KR, (E)II3OR y (F) III4VR a las 48 y 72 horas de incubación.	69

RESUMEN

El Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa (RVSPV) presenta gran diversidad de microorganismos halotolerantes, la cual ha sido poco estudiada. La investigación tuvo como objetivo caracterizar, seleccionar y evaluar cepas bacterianas halotolerantes con potencial de disminuir la concentración de iones de Ca^{2+} en aguas de alta dureza; para ello, se evaluó la producción de la enzima ureasa, que facilita la remoción de esta por biomineralización. Se caracterizaron 53 cepas bacterianas halotolerantes y se seleccionaron 26 cepas representativas para evaluar la actividad ureasa, de las cuales, 6 cepas fueron ureasa positiva y estas últimas fueron seleccionadas para evaluar su capacidad de remover iones de Ca^{2+} en aguas con alta dureza, similar a la encontrada en el agua de mar. La concentración de calcio se midió utilizando el Test kit Calcium de la marca Aquaforest, posteriormente se usaron reactivos utilizados en las valoraciones complejométricas, como el indicador colorimétrico ácido calcón carboxílico y EDTA como el agente quelante. Las cepas ureasa positivas fueron cocos Gram positivos con un rango de tolerancia desde 0 hasta 20% de NaCl, y todas removieron exitosamente el calcio soluble del medio de cultivo, de 447.5 ± 2.5 ppm a 37.2 ± 4.2 ppm. La mayor eficiencia en la remoción de Ca^{2+} ocurrió en el día 14, logrando una tasa de remoción del 92% en promedio, siendo la cepa II3BR la que presentó la mayor tasa de remoción (93.1%). No se pudo observar una relación significativa entre la producción de biopelícula y la tasa de remoción de calcio, lo cual sugiere que no actúa como sitio de nucleación para la biomineralización del calcio soluble. Se observó precipitados blanquecinos, probablemente carbonato de calcio, en los cultivos tratados. Estos resultados demuestran que la biomineralización mediada por hidrólisis bacteriana de la urea es factible en aguas de alta dureza, y se propone su aplicación como tecnología alternativa para mejorar la calidad del agua para riego y/o uso industrial.

Palabras clave: Bacterias halotolerantes; desalinización parcial; remoción de calcio; biomineralización; ureasa; agua dura, biopelícula.

ABSTRACT

The Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa (RVSPV) has a great diversity of halotolerant microorganisms, most of which hasn't been studied yet. The objective of this research was to characterize, select and evaluate halotolerant bacterial strains with the potential to reduce the concentration of Ca^{2+} ions in high hardness waters; for this, the production of the enzyme urease was evaluated, because it facilitates its removal by biomineralization. 53 halotolerant bacterial strains from RVSPV were characterized, and 26 representative strains were selected to evaluate the urease activity, of which, 6 strains were urease positive and selected to evaluate their ability to remove Ca^{2+} ions in waters with high hardness; like that found in sea water. The calcium concentration was measured using the Calcium Test kit from the Aquaforest brand, subsequently reagents used in complexometric titrations were used, such as the colorimetric indicator calcon carboxylic acid and EDTA as the chelating agent. The urease positive strains were Gram positive cocci with a tolerance range from 0 to 20% NaCl, and all of them remove successfully soluble calcium from the culture medium, from 447.5 ± 2.5 ppm to 37.2 ± 4.2 ppm. The highest efficiency in Ca^{2+} removal occurred on day 14, achieving a removal rate of ~92% on average, with strain II3BR having the highest removal rate (93.1%). No significant relationship could be observed between biofilm production and calcium removal rate, suggesting that biofilms do not act as a nucleation site for the biomineralization of soluble calcium. Whitish precipitates, probably calcium carbonate, were observed in the treated cultures. These results demonstrate that biomineralization mediated by bacterial hydrolysis of urea is feasible in high hardness waters, and its application is proposed as an alternative technology to improve water quality for irrigation and/or industrial use.

Keywords: Halotolerant bacteria; Partial desalination; Calcium removal; Biomineralization; Urease; Hard water; Biofilm.

I. INTRODUCCIÓN

Las aguas ricas en Ca^{2+} generan problemas operativos con implicaciones económicas generalizadas en las industrias ya que generan sarro en tuberías, reactores y equipamiento, debido a su precipitación en forma de cristales de fosfatos y/o carbonatos (Van Langerak *et al.*, 1997; Arias *et al.*, 2020). Desde el punto de vista sanitario, las aguas duras, ricas en iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} , son usadas para el consumo humano como las aguas blandas. Sin embargo, el agua dura requiere demasiado jabón para la formación de espuma y crea problemas en el lavado; además deposita sarro sobre las superficies con las cuales entra en contacto, así como en los recipientes, calderas o calentadores. En el caso del agua dura utilizada para riego, los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes son micronutrientes esenciales para las plantas, siendo por tanto beneficioso; sin embargo, cuando la dureza del agua es demasiado elevada, en el sistema de riego podrían producirse precipitaciones de estos iones, los cuales crean capas blanquecinas en la superficie de la tierra, que afecta la asimilación de nutrientes por las plantas y la actividad microbiana del suelo (Vargas Rojas *et al.*, 2018), por lo cual es importante retirar el exceso de estos iones.

La desalación, que es la eliminación de sales contaminantes y otros iones indeseables, es un proceso ampliamente aceptado como una alternativa viable para suministrar agua dulce en regiones áridas ya que casi el 98% del suministro de agua disponible proviene del mar o de recursos salobres (Alaei Shahmirzadi *et al.*, 2018). Se han desarrollado varias tecnologías para la eliminación de la sal de los recursos hídricos; como, por ejemplo, a) los diversos métodos de destilación, entre los que está incluido el *flash* multietapa, la destilación múltiple efecto y la destilación con compresión de vapor; b) el intercambio de iones; c) los procesos de membrana como la ósmosis inversa, nanofiltración, electrodiálisis, etc. Respecto a la osmosis inversa, tecnología más utilizada actualmente (Wittholz *et al.*, 2008; González *et al.*, 2015), el consumo energético actual en una planta desaladora de

agua de mar es alto, siendo de 3 kWh/m³ (Gude, 2016); en contraste, el consumo de las estaciones de tratamiento de agua potable convencionales, que desaliniza aguas de embalses y de otras fuentes superficiales y subterráneas, está entre 0.1 y 1 kWh/m³ (Wittholz *et al.*, 2008; González *et al.*, 2015). Otra forma de separar las sales disueltas del agua es a través de su precipitación en minerales no solubles, proceso llamado mineralización; en la naturaleza esto ocurre principalmente mediante la biomineralización.

La biomineralización es el proceso que involucra la formación de minerales por parte de los organismos vivos, como resultado de la actividad celular, que promueve las condiciones fisicoquímicas requeridas para favorecer la formación y precipitación de biominerales, siendo esta una forma de separar los iones del agua. Este conocimiento ha motivado a los científicos de todo el mundo a su aplicación en procesos de bioingeniería. Dentro de este último punto, se han identificado varios procesos biológicos que crean las condiciones necesarias para la precipitación del mineral; estos incluyen vías metabólicas de los microorganismos desnitrificantes, reductores de hierro, reductores de sulfato y la acción de las enzimas anhidrasa carbónica (AC) y ureasa (Bachmeier *et al.*, 2002; Hammes *et al.*, 2003; Achal y Pan, 2011; Zhao *et al.*, 2019). Para biomineralizar las sales de un cuerpo de agua salada, se necesita que el microorganismo utilizado tenga tolerancia al ambiente salino, pueda crecer adecuadamente y realizar la actividad metabólica requerida, como es el caso de los microorganismos halotolerantes o halófilos.

Las bacterias halotolerantes, así como las halófilas, son aquellas que se encuentran en ambientes salinos; no obstante, las halotolerantes son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas tanto en presencia como en ausencia de sal (Kushner, 1978); por lo que ya están adaptadas a los entornos salinos, como las aguas salobres, y esto las hace excelentes candidatas para estudiar su capacidad de desalinizar el agua. Por lo descrito, el presente estudio propone una solución para disminuir los costos de la

desalinización del agua salobre por la falta de agua apta para riego o para los diversos procesos industriales en la costa peruana mediante el uso de diversos microorganismos con capacidad de desalinizarla. Actualmente se presenta un escenario para la desalinización parcial de aguas duras, cuyos costos de inversión y operación son muy altos, para convertirlos en proyectos más sostenibles (Bayoumi *et al.*, 2007), esta investigación, se enfoca en estudiar la capacidad de las bacterias halotolerantes aisladas del RVSPV para remover Ca^{2+} de aguas con alta dureza, como aguas residuales de determinados procesos industriales o agua de mar, donde la concentración de Ca^{2+} es alrededor o superior a los 400 ppm (Hammes *et al.* , 2003; Castro *et al.*, 2016).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. EL REFUGIO DE VIDA SILVESTRE LOS PANTANOS DE VILLA

El Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa (RVSPV) está situado en el Departamento de Lima, Provincia de Lima, Distrito de Chorrillos, a 18 km al sur de Lima, tiene 263 hectáreas (Pulido, 2018; Eyewitness, 2023) y forma parte del cono de eyección hidrológica de la cuenca del río Rímac. Su altitud varía entre los 0 y 5 m.s.n.m. Las aguas subterráneas provenientes del río Rímac afloran en una depresión natural de humedales moderadamente profundos, con suelos de drenaje pobre, afloramiento de la capa freática muy cerca de la superficie y con escurrimiento superficial lento, siendo susceptibles de inundación (León, *et al.*, 1995). Los espejos de agua del RVSPV varían con relación a la salinidad dependiendo de la cantidad de agua dulce almacenada y de su proximidad al litoral marino. En el caso del espejo grande se registró una concentración de sales que varió de entre 60 a 110 ppm, por lo que se las consideraba aguas ligeramente salobres (León *et al.*, 1995). También, se determinó que los valores promedio del pH del agua fluctuaban entre 7,3 y 7,8 (CDC - UNALM 1996). Mediciones más recientes realizadas en el 2017 por Paredes Contreras (2022) revelaron variaciones significativas en las condiciones ambientales de las lagunas. Los resultados indican que la conductividad eléctrica (CE) oscilaba entre 3.14 dS/m y 16.29 dS/m. La concentración de sales del agua varió en un amplio rango, desde 1520 ppm hasta 8180 ppm, clasificándose estas aguas como de salinidad muy alta según la clasificación de Álvarez *et al.* (2004). En cuanto al pH, se registraron valores que oscilaron entre 7.54 y 9.29, y en lo que respecta a la temperatura, fluctuaron entre 19.6 °C y 32.3 °C.

El RVSPV es una zona de reserva que se estableció el 29 de mayo de 1989, y a partir de 1997 la Convención de Ramsar reconoció esta zona como Humedal de Importancia

Internacional para Aves Acuáticas (Díaz Solano, 2012). Posteriormente, fue declarado Área Natural Protegida por la SERNANP (2006). En la actualidad sigue siendo la única área natural protegida de la ciudad de Lima (IDEAS, 2005; El comercio, 2022).

Respecto a los estudios relacionados a los microorganismos procariotas heterótrofos aislados del RVSPV, se aislaron microorganismos del orden *Myxococcales* a partir de muestras del suelo (Díaz Solano, 2012), *Bacillus thuringiensis* de agua estancada para evaluar su actividad larvicida frente a *Aedes aegypti* (L) (Ramirez Ortiz, 2019). Sin embargo, hasta la fecha, solo se ha llevado a cabo un estudio relacionado con la diversidad de procariotas heterótrofos halotolerantes y halófilos presentes en las lagunas que conforman el RVSPV (Paredes Contreras, 2022). En dicho estudio, se observó que prácticamente la totalidad de los microorganismos encontrados son halotolerantes.

2.2. MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES

2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES

En la mayoría de los casos, los microorganismos tienen un rango restringido en la concentración de sal que permite su crecimiento. A pesar de que varios iones están involucrados en la nutrición de los halófilos, su principal requerimiento tanto para el crecimiento como para el mantenimiento de su estabilidad celular es el NaCl (Stanier, 2005). Algunas bacterias viven solo en salmueras saturadas y casi saturadas y no pueden crecer en concentraciones de NaCl por debajo de 15-20% (p/v), denominándolos como halófilos. Algunas otras son capaces de crecer a altas concentraciones de NaCl y otras sales, pero con un crecimiento óptimo en ausencia de NaCl. Este último grupo se denomina microorganismos halotolerantes y las especies de *Staphylococcus* son un ejemplo bien conocido de ellos. Los microorganismos halotolerantes pueden crecer en ausencia o presencia de NaCl, con concentraciones superiores al 10-15% de NaCl o incluso más, y

esta característica es una propiedad importante a menudo explotada en forma selectiva en el diseño y diagnóstico de medios de cultivo (Horstmann, 2021). Cabe señalar que la tolerancia y el requerimiento de sal pueden depender de la temperatura. De hecho, hay muchas investigaciones que informan la mejora de la tolerancia y el requisito de sal para mejorar su termotolerancia (Vreeland y Martin, 1980; Oren, 2006).

La clasificación de los microorganismos halófilos y halotolerantes es algo variable según el autor. La primera clasificación fue propuesta en 1962 por Larsen, quien definió tres categorías de microorganismos halófilos según el rango de concentraciones de NaCl exigido para un crecimiento óptimo: de 2 a 5% NaCl, de 5 a 20% y del 20 a 30% para bacterias débilmente halófilas, halófilas moderadas y halófilas extremas, respectivamente (Larsen, 1962; Daoud y Ben Ali, 2020). Gibbons (1969) considera que los microorganismos débilmente halófilos, halófilos moderados y extremos son aquellos que crecen a 3%, de 3 a 15%, y mayor al 15% de NaCl, respectivamente. Los parámetros entre las concentraciones de NaCl han sido refinados desde entonces por Kushner (1978, 1985) y la clasificación obtenida fue entonces la más aceptada. La Tabla 1 presenta esta clasificación con pocas modificaciones propuestas por Oren (2006).

Tabla 1. Clasificación de microorganismos halófilos (Oren, 2006; Daoud y Ben Ali, 2020).				
Categoría	NaCl (M)		NaCl (g/L)	
	Rango	Óptimo	Rango	Óptimo
No halófilo	0-1	<0.2	0-60	<10
Débilmente halófilo	0.2-2	0.2-0.5	10-115	10-30
Moderadamente halófilo	0.4-3.5	0.5-2	25-200	30-115
Limítrofe extremo halófilo	1.4-4	2-3	80-230	115-175
Extremadamente halófilo	2-5.2	>3	115-300	>175
Halotolerante	0-1	<0.2	0-60	<10
Haloversátil	0-3	0.2-0.5	0-175	10-30

2.2.2. APLICACIONES DE LOS MICROORGANISMOS HALÓFILOS Y HALOTOLERANTES

El uso de los microorganismos halófilos y halotolerantes en procesos biotecnológicos tiene muchas ventajas por su bajo potencial de patogenicidad (Stabnikov *et al.*, 2013) y que no se vean afectadas por el efecto inhibitorio del magnesio, a diferencia de los microorganismos no halotolerantes (Angustias Rivadeneyra *et al.*, 2006).

En el Perú, los estudios sobre aplicaciones de las bacterias halófilas se han hecho en salinas. Se ha investigado la producción de amilasas por bacterias aisladas de suelos salinos costeros de Lima (Alcarraz Curi y Vásquez D., 2014), ambientes salinos de Pilluana, Huacho, Maras, Chilca, Paracas y ventanilla (Flores *et al.*, 2010); y las salinas de San Blas en Junín (Mormontoy *et al.*, 2014). También se estudió la producción de proteasas y lipasas (Flores *et al.*, 2010; Alcarraz Curi y Vásquez D., 2014), exopolisacáridos de bacterias halófilas aisladas de melaza de caña de azúcar (Fuentes *et al.*, 2013); y polihidroxicanoatos producidos por halófilos aislados de salinas en Lambayeque, San José (Cardinali-Rezende *et al.*, 2016; Guzmán *et al.*, 2017), Santa Rosa (Guzmán *et al.*, 2017) y Morrope (Flores Vásquez *et al.*, 2018). Respecto a las bacterias halotolerantes, se ha estudiado la producción de hidrolasas termoestables de microorganismos aislados de aguas termales en Tarapoto (Borja *et al.*, 2012) y lipasas de microorganismos aislados de las Salinas de Pilluana, San Martín (Flores-Fernández *et al.*, 2010). En una reciente investigación, se utilizó bacterias halotolerantes ureolíticas aisladas de suelos arcillosos para la fabricación de biomateriales de construcción por biomineralización (García Avelino, 2021). Sin embargo, aún falta investigar aplicaciones de microorganismos halotolerantes y halófilos de otros ambientes salobres como los humedales y si tienen un papel en la remoción selectiva de iones del medio líquido.

Una de las aplicaciones actuales más destacadas es la biomineralización, que se utiliza tanto para aprovechar los minerales formados debido a sus características únicas en comparación con los minerales producidos de manera inorgánica, como para eliminar estos iones solubles del entorno.

2.3. RELACIONES ENTRE LOS MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES Y OTROS IONES

Los compuestos químicos que contienen Ca^{2+} están presentes en varios tipos de rocas, liberándose en solución acuosa, detectándose comúnmente en las aguas de entornos naturales donde a menudo precipitan como minerales de carbonato de calcio (CaCO_3), como la calcita y dolomita. Estudios previos de tales precipitados de carbonato sugirieron tanto la presencia de bacterias e interacciones específicas de estos microorganismos con los minerales precipitados (Riding, Awramik, 2013).

La dureza total del agua es básicamente la suma de las concentraciones de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} que se encuentran disueltas en el agua y son expresadas en ppm (partes por millón) de CaCO_3 . La clasificación del agua según su dureza total se presenta en la Tabla 2 (World Health Organization, 2004; Zamora, 2009; Mora-Alvarado *et al.*, 2015; OMS, 2017).

Tipo	$[\text{CaCO}_3]$ ppm	$[\text{Ca}^{2+}]$ ppm
Blanda	0-60	0-24
Moderadamente dura	61-120	25-48
Dura	121-180	49-72
Muy dura	>180	>73

2.4. PROBLEMÁTICA DEL USO DE AGUAS CON ALTA DUREZA

De acuerdo a la norma establecida por la OMS, la dureza total expresada en la concentración de CaCO_3 , es aceptable hasta los 180 ppm como límite máximo, ya que superior a 200 ppm comienzan a formarse sarro en las cañerías (Galvín, 2012). Si se obtuvieran valores mayores al máximo permitido; por un lado, es bueno para el consumo humano ya que el cuerpo necesita Ca^{2+} y Mg^{2+} para los procesos metabólicos, pero en exceso los beneficios o consecuencias son todavía tema de discusión, argumentándose que podría desarrollar desde una dermatitis atópica (S. Chan y Y. Shi, 2023) hasta cálculos renales (Alvarado, 2009); sin embargo, otros estudios no han encontrado una relación significativa entre el consumo de agua dura y la formación de cálculos (Alan J. Wein, 2008).

Por lo descrito anteriormente, desde el punto de vista sanitario, las aguas duras son tan satisfactorias para el consumo humano como las aguas blandas; sin embargo, el agua dura requiere demasiado jabón para la formación de espuma y crea problemas en el lavado (Dickerson, 1992); además deposita sarro sobre las superficies con las cuales entra en contacto, así como en los recipientes, calderas o calentadores. El límite de dureza en el agua potable, de caldera de presión intermedia, de caldera de presión alta y de enfriamiento es de 160 (64 ppm de Ca^{2+}), 1, 0.07 y 650 mg/L de CaCO_3 (260 ppm de Ca^{2+}), respectivamente (Carlos Hernán y Rocio del Pilar, 2007).

La dureza del agua, cuando supera aproximadamente 200 ppm y dependiendo de la interacción con otros factores, como el pH (la alcalinidad), puede provocar la formación del sarro en los sistemas de tratamiento y distribución de aguas, tuberías (ver Figura 1), tanques de los edificios (OMS, 2017), así como en los reactores anaerobios (van Langerak *et al.*, 1997). Específicamente, las aguas ricas en Ca^{2+} generan problemas operativos con implicaciones económicas generalizadas en las industrias. Esto se debe a la formación de sarro en tuberías, reactores y equipamiento, debido a la precipitación de diversas sales

(Hammes *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2020) de sulfato de calcio (CaSO_4), carbonato de calcio (CaCO_3) fluoruro de calcio (CaF_2) y fosfato de calcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] (Arias *et al.*, 2020).



Figura 1. Tubería afectada por los precipitados de calcio y magnesio, debido al paso de aguas de alta dureza.

Las aguas residuales ricas en calcio Ca^{2+} (500–1500 mg/L) provienen de diversas industrias como la del reciclaje del papel, el procesamiento de huesos, la producción de ácido cítrico y de los lixiviados en vertederos (Habets y Knelissen, 1997; Hammes *et al.*, 2003). La industria minera realiza procesos de concentración de minerales a través de la flotación por espuma (ver Figura 2) para obtener cobre (Cu) y molibdeno (Mo) a partir de minerales de sulfuro de Cu-Mo (minerales hidrofóbicos), por lo que requiere gran cantidad de agua. La calidad de este es un factor importante para lograr un alto enriquecimiento de los minerales y alto rendimiento de estos procesos. El Ca^{2+} y Mg^{2+} forman hidroxicomplejos que se adhieren a los metales de interés, interfiriendo en su flotación y también desestabilizan las burbujas de aire (Castro *et al.*, 2016).

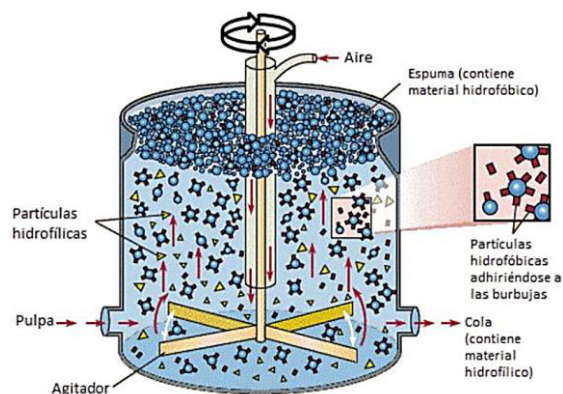


Figura 2. Esquema del funcionamiento de una celda de flotación. Las partículas minerales se adhieren a las burbujas de aire y son llevadas a la superficie.

Algunas plantas mineras utilizan el sistema de ósmosis inversa para la obtención de grandes volúmenes de agua y de buena calidad. Sin embargo, este proceso requiere la quema de 10 000 toneladas de carbón por año para producir 1000 m³/día de agua desalinizada, lo que genera gases de efecto invernadero y causa un impacto en el ecosistema marino debido al derrame de salmueras dentro del mar (Arias *et al.*, 2020).

Los metales iónicos de Ca²⁺ y Mg²⁺ solubles en agua pueden convertirse en metales insolubles o carbonatos por mineralización, esto se realiza en los reactores de cristalización química y se basan en la adición de un agente alcalino [NaOH o Ca(OH)₂] en presencia de sitios de nucleación (granos de arena); sin embargo, tales reactores son a menudo costosos, complejos y algunas veces dan lugar a efluentes altamente alcalinos, con pH alrededor de 11 (Arias *et al.*, 2017; Nikolenko *et al.*, 2020). La mineralización química es una tecnología bien establecida actualmente, con disponibilidad de equipamiento y muchos reactivos químicos; sin embargo, conlleva ciertas desventajas, las cuales mencionaremos a continuación (Litz y Taylor, 2000):

- Las reacciones competitivas, los niveles variantes de alcalinidad y otros factores hace que calcular los dosajes de los reactivos químicos a un nivel adecuado sea muy difícil; por esta razón, se hace necesario efectuar frecuentes pruebas para confirmar las

condiciones óptimas de tratamiento. Agregar más reactivos químicos de lo debido puede disminuir la efectividad del tratamiento.

- La precipitación química puede requerir trabajar con químicos corrosivos, incrementando las preocupaciones sobre la seguridad del operador.
- La adición de químicos, especialmente cal, puede incrementar el volumen de lodos residuales a más del 50%.
- Grandes cantidades de químicos pueden necesitar ser transportados a la locación donde se hace el tratamiento.
- Los polímeros utilizados pueden ser caros.

Ante esto, existen otros procesos de mineralización en el que participan diversos tipos de microorganismos halófilos, llamado biomineralización.

2.5. BIOMINERALIZACIÓN Y REMOCIÓN DEL CALCIO SOLUBLE

El concepto de biomineralización se define como el proceso que involucra la formación de minerales por parte de organismos vivos como resultado de la actividad celular que promueve las condiciones físico-químicas requeridas para llevar a cabo su formación (DeJong *et al.*, 2010). Cada biomineral tiene propiedades específicas, como tamaño único, estructura cristalina y composición isotópica de oligoelementos (Arias *et al.*, 2019). Los procesos de biomineralización se basan en dos tipos según el grado de control biológico existente (Reddy, 2013):

- **Mineralización biológicamente controlada (MBC).** Los minerales se sintetizan directamente en un lugar específico dentro o sobre la célula y sólo bajo ciertas condiciones.
- **Mineralización biológicamente inducida (MBI).** Los minerales se forman extracelularmente como resultado de la actividad metabólica del organismo (Achal *et al.*,

2015). La producción extracelular de estos biominerales invitó a científicos de todo el mundo a aprovechar esta capacidad de los microorganismos para diversas aplicaciones en bioingeniería. Dentro de este último punto, se han identificado varios procesos biológicos que crean las condiciones necesarias para la precipitación de estos minerales, estos incluyen vías metabólicas de los microorganismos desnitrificantes, reductores de hierro y sulfato y la acción de las enzimas anhidrasa carbónica (AC) y ureasa (Bachmeier *et al.*, 2002; Hammes *et al.*, 2003; Achal y Pan, 2011; Zhao *et al.*, 2019). La precipitación de carbonato de calcio inducida por microorganismos es un proceso químico bastante sencillo regido principalmente por cuatro factores clave: (1) la concentración de calcio, (2) la concentración de carbono inorgánico disuelto, (3) el pH y (4) la disponibilidad de sitios de nucleación (Hammes y Verstraete, 2002).

En condiciones naturales, la precipitación de carbonatos ocurre muy lentamente durante tiempos geológicos prolongados, pero para producir grandes cantidades de carbonatos en poco tiempo, es necesario buscar microorganismos con la capacidad de crear condiciones para su precipitación en tiempos más breves. Diferentes especies bacterianas precipitan carbonatos en ambientes alcalinos ricos en Ca^{2+} y se han propuesto varios mecanismos que podrían inducir la precipitación por bacterias en hábitats naturales (Ehrlich, 1996; Rivadeneyra *et al.*, 2004).

Se ha descrito ampliamente que las bacterias pueden servir como núcleos de precipitación de carbonato al absorber los cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} en su superficie debido a que poseen una carga neta superficial negativa (Stocks-Fischer *et al.*, 1999; Achal y Pan, 2011). Como consecuencia de estos cambios en la carga iónica general, las bacterias se agregan para aumentar el tamaño del biomineral, convirtiéndose en su núcleo (Rivadeneyra *et al.*, 1998). Las bacterias presentan diversos componentes químicos en su superficie celular que da

como resultado una carga superficial diferente entre estas. La formación del complejo mediado por el ion amonio y Ca^{2+} , junto con el aumento del pH, favorece la unión de las células (cargadas negativamente) con el Ca^{2+} , ya que se absorbe con mayor selectividad, por sobre el Mg^{2+} (Maier *et al.*, 2000; Arias, 2017). Las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) también juegan un papel importante en los cambios en la carga iónica general, se ha demostrado que las SPE producidas por bacterias están involucradas en el proceso de precipitación de carbonatos microbiológicamente inducida (PCMI) al atrapar y servir como sitio de nucleación, ya que influyen positivamente en la precipitación del carbonato de calcio (Merz-Preiß y Riding, 1999; Tsuneda *et al.*, 2003). Las SPE desempeñan un papel importante en la cobertura de la superficie por biopelículas (Achal *et al.*, 2009), la adhesión celular y la precipitación, ya sea mediante inmovilización y concentración de los iones o mediante la acción de proteínas específicas en su composición que influyen en la precipitación (Reddy, 2013). Se ha demostrado que la capacidad de biomineralizar carbonato está directamente relacionada en la formación de biopelículas en microorganismos como *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y la inhibición de la ureasa y AC inhibe la formación de biopelícula (Cohen-Cymerknoh *et al.*, 2022). Los iones de calcio en la solución son atraídos hacia la pared celular bacteriana debido a la carga negativa de esta. Tras la adición de urea en el microambiente de las bacterias, el carbono inorgánico disuelto y el amonio liberado, sumado con la presencia de iones de Ca^{2+} , pueden resultar en una sobresaturación local y, por lo tanto, la precipitación heterogénea de carbonato de calcio en la pared celular bacteriana (Achal y Pan, 2011). Esto demuestra claramente que las bacterias no actúan simplemente como sitio de nucleación para la biomineralización, sino que actúan como mediadores activos en el proceso (Sánchez-Román *et al.*, 2007; Silva-Castro *et al.*, 2013).

El uso de procesos biológicos, como la biomineralización, realizada por bacterias ureolíticas productoras de ureasa, son capaces de formar diferentes precipitados a partir de aguas residuales, subterráneas y de mar, a través de la PCMI propuesta como una valiosa y eco sustentable alternativa a los pretratamientos químicos de remoción de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Arias, 2017; Arias *et al.*, 2020).

2.5.1. ENZIMA UREASA

La ureasa (urea amidohidrolasa; EC 3.5.1.5) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la urea, descomponiéndola en amoníaco (NH_3) y CO_2 . Esta enzima, catalíticamente activa, requiere la incorporación de dos átomos de níquel para su expresión (McGee *et al.*, 1999; Van Vliet *et al.*, 2001). El níquel participa en el metabolismo de los compuestos que contienen nitrógeno (Carter *et al.*, 2009; Rodríguez-Jiménez *et al.*, 2016). Esta enzima muestra una mayor afinidad por la urea en un entorno alcalino, donde la precipitación de la calcita (CaCO_3) es más favorable (Stocks-Fischer y Galinat, Bang, 1999).

La formación de la ureasa en bacterias diferentes a *Helicobacter pylori* rara vez es constante, cualesquiera sean las condiciones externas (constitutiva), sino que se regula en respuesta a cambios en el entorno, como el pH, la disponibilidad de urea, la disponibilidad de nitrógeno o la fase de crecimiento (Van Vliet *et al.*, 2001). Las bacterias ureolíticas utilizan la urea como fuente de nitrógeno y de energía, aumentando el pH del entorno (Burne y Chen, 2000; Mobley, 2001). Producen amoníaco, molécula que se une a los H^+ presentes en el entorno para formar ion amonio, lo cual hace que incremente el pH del medio e induce la precipitación de diferentes elementos cristalinos formados por los iones presentes (Arias *et al.*, 2020). La urea representa una fuente de nitrógeno asimilable para las bacterias que pueden colonizar el cuerpo animal, hay evidencia que sugiere que la asimilación de amoníaco a partir de la urea se produce *in vivo*; como ilustración, una proporción

significativa de la urea producida en el hígado termina en los intestinos, donde puede ser hidrolizado y asimilado por varias especies diferentes de bacterias anaeróbicas, ureolíticas (McLean *et al.*, 1988; Mobley y Hausinger, 1989), estimándose que solo el 17-30% de los microorganismos aerófilos, microaerófilos o anaerobios son capaces de hidrolizar la urea (Lloyd y Sheaffe, 1973). En la Figura 3 se observa la capacidad de las bacterias ureolíticas para hidrolizar la urea, liberando amoníaco, por acción de la enzima ureasa.

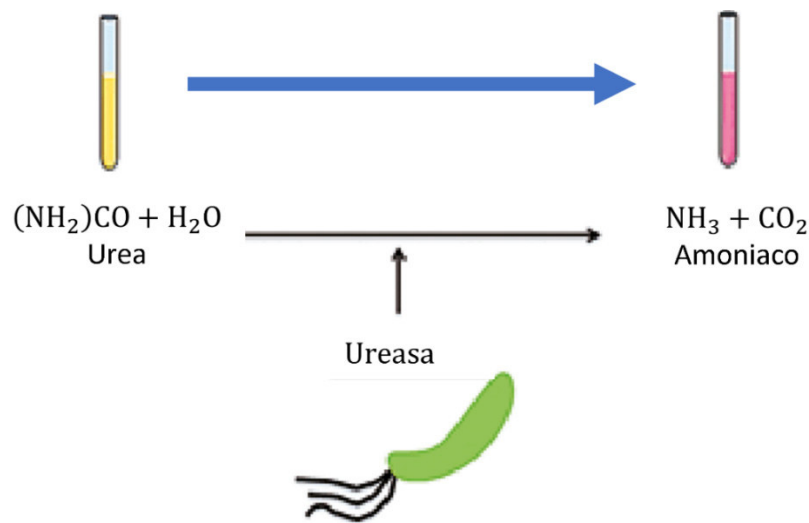


Figura 3. Principio de la prueba de la ureasa. Se determina la capacidad de una bacteria de hidrolizar la urea en amoníaco y CO_2 . (Frías-Ordoñez y Regino, 2017).

Las bacterias ureolíticas producen ATP a través de la hidrólisis de la urea, liberando así amoníaco (NH_3) y ácido carbónico (H_2CO_3) en el ambiente, de acuerdo con las ecuaciones (1) y (2)

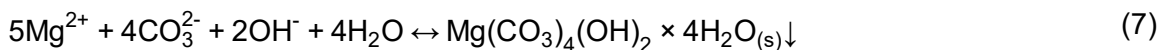


Ambos productos alcanzan condiciones de equilibrio químico en el ambiente acuoso formando ion amonio (NH_4^+) e iones hidroxilo (OH^-) a partir del NH_3 , bicarbonato (HCO_3^-) y

los iones H^+ a partir del H_2CO_3 , de acuerdo con las siguientes dos ecuaciones (3) y (4), de esa forma aumentan los iones OH^- en medio acuoso, elevando el pH:



El proceso global regido por las ecuaciones (2) a (4) da como resultado el aumento del pH. El pH alto, junto con la disponibilidad de HCO_3^- [cuya conversión a carbonato (CO_3^{2-}) en agua ocurre a pH alcalino] y OH^- , promueve la precipitación de Ca^{2+} y Mg^{2+} de acuerdo con las siguientes tres ecuaciones (5) a (7) (Achal y Pan, 2011):



Respecto a los estudios relacionados a la utilización de bacterias ureolíticas para la biomineralización del calcio, los cuales se han realizado en condiciones de laboratorio utilizando un medio de cultivo con dureza similar al agua de mar, se ha demostrado que el aumento del pH a medida que aumenta la concentración de urea no supera el valor de 9.3 debido al equilibrio del tampón de amonio; también se comprobó que existe una relación directa entre la concentración de la urea, la producción de amonio y la eliminación de los iones de interés (Arias *et al.*, 2020). Además, hay una tendencia a precipitar primero iones de Ca^{2+} , y luego los de Mg^{2+} , posiblemente debido a que el primero es absorbido más frecuentemente en la envoltura celular cargada negativamente (selectividad iónica) que el segundo (Rivadeneira *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2019). Como resultado de la precipitación de cristales a base de Ca^{2+} y Mg^{2+} , las concentraciones de estos iones disueltos en el medio líquido disminuyen progresivamente. La utilidad de usar urea para la precipitación de calcio

es la disponibilidad directa de iones de carbonato, lo cual promueve su precipitación, incluso a valores de pH moderados (Hammes *et al.*, 2003).

Existen numerosos estudios con la bacteria Gram positiva *Sporosarcina pasteurii*, la cual fue aislada en muestras de suelo, en el proceso de biomineralización y coprecipitación de CaCO_3 , debido a que no es patógena y tiene alta actividad ureasa (Whiffin *et al.*, 2007; Achal *et al.*, 2009; DeJong *et al.* 2010; Al-Thawadi, 2011). Sin embargo, los estudios de especies alternativas son escasos, especialmente las microbianas ecológicamente relevantes capaces de subsistir en determinados lugares negativamente afectados para la biorremediación. En la Figura 4 se muestra una descripción general de la precipitación de calcita por *S. pasteurii* mediada por la hidrólisis de la urea.

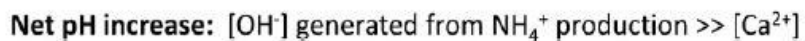
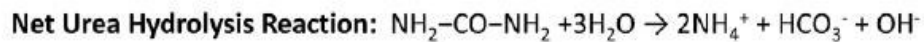
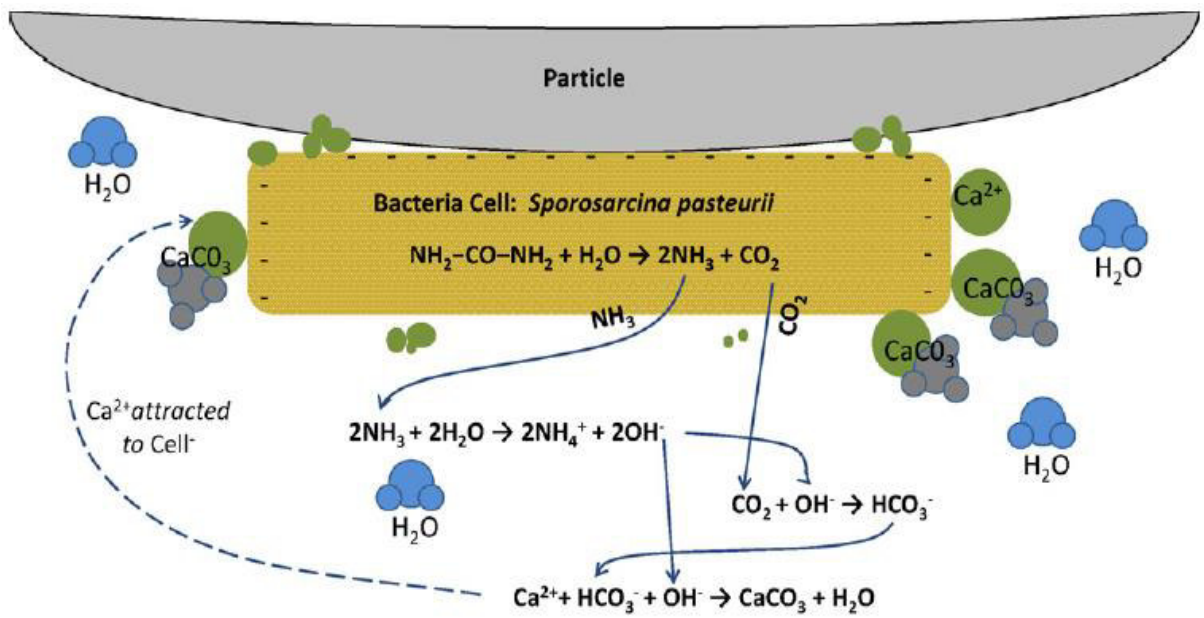


Figura 4. Descripción general de la precipitación de calcita mediada por ureólisis. *S. pasteurii* sirve como sitio de nucleación para la precipitación de CaCO_3 en las partículas de arena, la urea se descompone dentro del microorganismo. El NH_3 y CO_2 se difunden a través de la pared celular hacia la solución circundante (DeJong *et al.*, 2010).

2.6. ANTECEDENTES

En el Perú, la investigación sobre biomineralización bacteriana de Ca^{2+} y Mg^{2+} es aún limitada. Alhuay Torres (2011) se enfocó en comprender los principios fundamentales necesarios para la formación de biominerales, con el objetivo de aplicar estos conocimientos en la química sintética. Esto es relevante ya que los biominerales presentan propiedades distintas a los minerales producidos mediante procesos geológicos. En una línea similar, García Avelino (2021) evaluó la precipitación bacteriana de carbonato en un medio de biomineralización que contenía por litro 10 g de CaCO_3 y 30 g de urea, a pH 8, y agitando la solución durante 21 días, con el fin de elaborar piezas de concreto con mejores propiedades mecánicas. Los cristales obtenidos fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersa de rayos X, confirmando que dichos cristales estaban formados por carbonato de calcio.

A nivel internacional, Bachmeier *et al.* (2002) utilizaron una cepa de *E. coli* recombinante, la cual contenía el plásmido pBU11, que contenía el gen de la ureasa de *Sporosarcina pasteurii* (antes conocido como *Bacillus pasteurii*) para precipitar calcita. Aunque la precipitación de calcita por la cepa recombinante no fue tan eficiente en comparación con *S. pasteurii*, la adición de níquel (5-100 μM), cofactor de la ureasa, aumentó la precipitación de calcita por parte de la cepa recombinante, esto es debido a la baja afinidad del sistema transportador de níquel en la membrana citoplasmática de *E. coli*, comparado con *S. pasteurii*. Se confirmó la inhibición de la precipitación de calcita cuando se utilizó el ácido acetohidroxámico (AHA), un inhibidor de la enzima ureasa. Posteriormente, la ureasa parcialmente purificada de *S. pasteurii* fue inmovilizada en espuma de poliuretano para comparar la eficacia de la precipitación de la calcita entre las enzimas libres e inmovilizadas. La ureasa inmovilizada mostró mayor K_m y menor V_{\max} , que se reflejaron en la precipitación más lenta de la calcita, posiblemente debido a la limitación en la difusión dentro de las

matrices. La microscopia electrónica de barrido mostró que la precipitación de calcita ocurría dentro y en la superficie del polímero, pero debido a que la estructura molecular de los cristales dentro de este es más organizada, esta funciona como sitio adicional de nucleación. Por último, la ureasa inmovilizada mantuvo alta actividad enzimática a altas temperaturas y en presencia de la alta concentración de pronasa (proteasa), lo que indica que la inmovilización protege la actividad enzimática de la ureasa de los factores ambientales.

Como señalaron Arias *et al.* (2020), a pesar de la existencia de investigaciones previas relacionadas al empleo de bacterias ureolíticas en la biomineralización de suelos y restauración del concreto (Bachmeier *et al.*, 2002), el proceso de PCMI basado en microorganismos ureolíticos, pocas veces se ha utilizado para eliminar iones del agua. Uno de los primeros intentos exitosos fue realizado por Hammes *et al.* (2003), quienes realizaron sus estudios en aguas residuales municipales ricas en calcio y urea a diferentes concentraciones, obteniendo una tasa de eliminación del 90% de los iones de Ca^{2+} haciendo funcionar un biorreactor en modo semicontinuo durante 6 días. El agua residual sin tratar utilizada en estos experimentos contenía aproximadamente 12 mM (equivalente a 489 ± 39 mg/L) de Ca^{2+} . En base a las ecuaciones teóricas, se pudo argumentar que se requiere un mínimo de 12 mM de urea (equivalente a 0.72 g/L) para precipitar 12 mM de Ca^{2+} , lo cual se pudo reflejar en la práctica. El pH aumentó debido a las altas concentraciones de urea pero no fue mayor a 9.3, debido al efecto tamponante del amonio ($\text{pK}_a = 9.25$ a 25°C) (Hammes *et al.*, 2003).

En relación con el proceso de desalinización en medios acuosos sin la adición de urea, Bayoumi *et al.* (2007) llevaron a cabo un estudio en el que seleccionaron tres cepas bacterianas halotolerantes aisladas del agua y suelo. Las cepas fueron capaces de desalinizar el agua de mar, tanto en cultivos puros como en consorcios microbianos. El

equipo de investigación también confirmó que usando extracto de levadura como suplemento mejoró el proceso de desalinización.

En el contexto de la biomineralización bacteriana, es fundamental comprender el papel de las enzimas ureasa y AC en el proceso de precipitación de la calcita inducido por microorganismos. Un estudio relevante realizado por Achal & Pan (2011) arroja luz sobre esta cuestión. En su investigación, caracterizaron tres cepas de *Bacillus* aisladas del suelo que demostraron ser productoras de ureasa y AC. Los resultados de su estudio sugieren que la precipitación de carbonato de calcio no depende exclusivamente de la actividad de la ureasa, sino que también la AC juega un papel importante, ya que la producción de ureasa y AC intracelular fue hasta las 120 horas de incubación, aumentando la eficiencia en la precipitación de la calcita.

En el ámbito de la investigación, sobre biomineralización por bacterias ureolíticas en Latinoamérica, destaca el trabajo realizado en Chile por Arias *et al.* (2017), quienes llevaron a cabo un estudio centrado en la precipitación de cristales de calcio y magnesio, mediada por bacterias ureolíticas, con el propósito de aplicar estos procesos en la industria. En sus experimentos, se observó que todas las cepas con actividad ureolítica fueron capaces de inducir la formación de cristales en medio LB suplementado con NaCl, urea y CaCl₂. Esto contrastó con los grupos de control, donde no se observó formación de cristales. De manera destacable, *Rhodococcus erythropolis* logró precipitar aproximadamente el 95% de calcio soluble en 7 días de bioensayo. Posteriormente, Arias *et al.* (2019) ampliaron la investigación evaluando la capacidad de precipitación de sales en cepas ureolíticas halotolerantes en géneros bacterianos como *Bacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Salinivibrio* y *Halomonas*, aislados de la Laguna Salada en Chile. En condiciones de cultivo, en agua dulce con urea y CaCl₂, todas las especies demostraron la capacidad de biomineralizar carbonato de calcio a diferentes concentraciones. Con agua de mar, tanto

Bacillus subtilis LN8B como *Halomonas* sp. lograron precipitar iones de calcio en un rango de 96-97% en un lapso de 5 días, destacando la viabilidad de la biomineralización bacteriana en ambientes marinos. Además, se confirmó que el uso de células inmovilizadas en perlas de alginato facilita la precipitación de las sales, la separación de la biomasa y su aplicación en reactores de flujo continuo, lo cual es de gran relevancia en aplicaciones industriales.

Arias *et al.* (2020) continuaron su investigación enfocándose en la desalinización parcial del agua de mar para aplicaciones mineras a través del uso de un biorreactor de lecho fluidizado llenado con células inmovilizadas de la cepa ureolítica *Bacillus subtilis* LN8B. El estudio operó en modo *Batch* y logró mayor eficiencia en la remoción del 100% de Ca^{2+} en el cuarto día. Los controles sin bacterias inmovilizadas y urea no mostraron signos de precipitación de iones, manteniendo sus niveles constantes.

Estos estudios resaltan la importancia de las bacterias ureolíticas en la precipitación de sales y ofrecen valiosas perspectivas sobre su aplicación en la desalinización y el tratamiento de aguas en diversos ambientes industriales.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GENERALES

- Seleccionar microorganismos halotolerantes provenientes del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa con la capacidad de remover iones de calcio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar la pureza, seleccionar y caracterizar aislados bacterianos provenientes de los cuerpos de agua del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa.

- Clasificar las cepas de acuerdo con su halotolerancia.
- Evaluar la capacidad de remoción de iones de sodio por las cepas halotolerantes.
- Seleccionar a las cepas productoras de la enzima ureasa.
- Determinar la capacidad de remoción de iones de calcio en las cepas halotolerantes seleccionadas.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 53 cepas bacterianas halotolerantes aisladas de diversas muestras de agua provenientes de 7 puntos de muestreo, en 4 temporadas diferentes, del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa y almacenadas en el Laboratorio de Microbiología Acuática y Aplicaciones Tecnológicas-UNMSM.

4.1. VERIFICACIÓN DE LA PUREZA EN LOS AISLADOS BACTERIANOS

Se utilizó el medio Sehgal & Gibbons (SG), cuya composición se describe en el Anexo 1, el cual es utilizado para el aislamiento de arqueas, bacterias halófilas y halotolerantes (Gibbons 1969; Lizama *et al.*, 2001; Schneegurt, 2012). Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente ($23.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Se trabajó con cepas que crecieron de 1 a 7 días en placa, en condiciones de aerobiosis. Después del tiempo de incubación se seleccionaron dos o tres colonias con las mismas características culturales, las cuales fueron almacenadas en cepario, a temperatura ambiente hasta su posterior reactivación. Se realizó previamente la tinción de Gram para verificar la pureza de las cepas. Posteriormente se criopreservaron a -80°C en medio LB con 20% de glicerol.

4.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas fueron caracterizadas taxonómicamente observando las características culturales de las colonias, la morfología microscópica (forma, tinción de Gram), la motilidad,

prueba de KOH (Gilchrist *et al.*, 2005) y la producción de las enzimas catalasa y oxidasa, siguiendo los criterios establecidos en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Holt *et al.*, 1993).

- **Descripción cultural:** Las colonias previamente seleccionadas fueron descritas de acuerdo con caracteres como tamaño (mm), color, superficie, forma, borde, elevación, luz transmitida y luz reflejada.
- **Crecimiento en medio líquido:** Se describió el tipo de crecimiento de cada cepa en medio SG, considerando la apariencia de la superficie, turbidez y/o sedimento, según el tiempo de incubación descrito para cada cepa (Pérez Davó, 2014).
- **Prueba de la Catalasa:** Se determinó si las cepas poseen la capacidad de reducir el H₂O₂ hasta O₂ y H₂O (Vanegas *et al.*, 2014). La prueba se realizó a partir de colonias reactivadas y se consideró como resultado positivo cuando hubo formación de burbujas al contacto de la colonia con el H₂O₂ (Pérez Davó, 2014).
- **Prueba de la Oxidasa:** Se examinó si las cepas sintetizan la enzima citocromo c oxidasa en la cadena transportadora de electrones. La prueba se efectuó con colonias reactivadas. Se utilizó tiras de oxidasa comercial (Microbiology Bactident® Oxidase, Merck) y se consideró como resultado positivo cuando se confirmó el cambio de color de la tira al azul o púrpura a los 20-60 segundos debido a la reducción del reactivo NaDi (α -naftol y dimetil-para-fenilendiamina) por el sistema citocromo c oxidasa de las bacterias, con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. (Pérez Davó, 2014).
- **Prueba de KOH:** Se corroboró si las cepas son presuntamente Gram negativas; es decir, si hubo rompimiento de la pared celular y liberación de ADN debido al KOH. La prueba se llevó a cabo utilizando colonias reactivadas y una solución de KOH 3%; se mezcló la solución con las colonias en láminas portaobjetos. Se consideró como

resultado positivo cuando, después de unos segundos, se formó una solución viscosa y un hilo; de 0.5 a 2 cm o más, al levantar dicha solución con el uso del asa de siembra (Gregersen, 1978; Gilchrist *et al.*, 2005; Pérez Davó, 2014).

- **Tinción de Gram:** El procedimiento se realizó con cultivos reactivados de cada cepa. Luego de realizar el procedimiento estándar de tinción, se observó la pared celular, la morfología y la agrupación celular. Los resultados de la tinción de la pared se corroboraron con la prueba de KOH 3% (Dussault, 1955; Birbir *et al.*, 2004; Tortora *et al.*, 2007; Davó, 2014).

4.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS SEGÚN CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO

Se prepararon placas con agar SG (Anexo 1) a diferentes concentraciones de NaCl (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 20%) para clasificar los aislados según su crecimiento en condiciones salinas. Los cultivos fueron incubados hasta por una semana a 24 °C.

Las cepas bacterianas se clasificaron basándose en los criterios de Kushner (1978, 1985), el cual se basa en la concentración de NaCl que permite el crecimiento óptimo de los microorganismos halófilos, estas fueron clasificadas según estos cuatro criterios:

- No halotolerante, <0.2M (aproximadamente <1%) NaCl
- Ligeramente halotolerante, 0.2-0.5M (≈1-3%) NaCl
- Moderadamente halotolerante, 0.5-2.5 (≈3-15%) NaCl
- Halotolerante extremo, 2.5-4.0M (aproximadamente >15%) NaCl

4.3. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DEL ION SODIO

4.3.1. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MÁS APROPIADO PARA LA MEDICIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE)

Se probaron dos medios de cultivo, el medio SG (Anexo 1), y el medio Luria Bertani (LB) (Anexo 2). Ambos fueron suplementados con una concentración determinada de NaCl. El medio utilizado para la preparación de las soluciones fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 Psi por 15 minutos. Se utilizaron matraces de 250 mL y el volumen inicial del medio para el ensayo fue de 50 mL. La CE presente en el medio SG se debe sobre todo a la concentración de NaCl, la cual se preparó similar a la concentración encontrada en el agua de mar (aproximadamente 50 dS/m).

4.3.2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Se reactivó cada cepa seleccionada para el ensayo en el medio SG y LB; luego, un inóculo del cultivo fue estriado en placa con agar SG y LB, y se incubó a temperatura ambiente, el tiempo de incubación de las colonias en placa dependió de la velocidad de crecimiento de cada cepa. Para preparar el inóculo, se resuspendieron colonias reactivadas de cada cepa en tubos de 16x100 mm con solución PBS 1X estéril, previa agitación del tubo con agitador vórtex por 15 segundos, se midió la densidad celular usando un densitómetro McFarland, hasta alcanzar una turbidez del tubo 1 de la escala McFarland (3×10^8 células/mL). Se transfirió 1000 μ L del tubo a un microtubo de 1500 μ L y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 1000 μ L del medio a tratar y se inoculó en los 49 mL del medio SG y LB modificado dispensado en matraz de 250 mL. El medio terminó con una concentración bacteriana inicial de 3×10^6 células/mL.

4.3.3. LECTURA DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE)

Para medir la CE, se utilizó el multiparámetro portátil HANNA de pH/TDS/Conductividad de rango bajo (HI98129) que tiene un rango de CE de 0 a 3999 $\mu\text{S}/\text{cm}$, previamente calibrado con el estándar de conductividad H7031 marca HANNA de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm} \pm 5 \mu\text{S}/\text{cm}$. La calibración y la medición de la CE se realizó siguiendo el protocolo indicado en el Manual de Instrucciones del modelo HI 98129 (Hanna Instruments, 2012). Previamente se diluyó el medio tratado para que esté dentro del rango de lectura del conductímetro (Gan *et al.*, 2016; Aristizabal *et al.*, 2019).

Para el procesamiento de la muestra antes de la lectura, se vertió la totalidad del medio inoculado en el matraz en un tubo Falcon estéril de 50 mL y se centrifugó a 7500 rpm por 20 minutos. A partir del sobrenadante se extrajo una muestra de 1000 μL y se dispensó en una fiola de 25 mL, la cual se enrasó, de modo que se diluyó en una fracción de 1:25. Luego se vertieron 20 mL de la dilución en un vaso de precipitado de plástico de 50 mL (previamente lavado 3 veces con agua desionizada y una vez con la muestra problema) y se sumergió completamente el sensor del multiparámetro portátil. Se midió la CE del medio tratado y como blanco se utilizó el medio sin inocular. La lectura de la CE se realizó cada siete días por 2 semanas.

4.4. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD UREASA

Para determinar la presencia de actividad de la enzima ureasa, las cepas bacterianas fueron cultivadas en tubos con medio de agar urea modificado de Christensen (20 g/L de urea, 1 g/L de peptona, 5 g/L de cloruro de sodio, 2 g/L de fosfato dihidrógeno de potasio, 20 g/L de agar, 1 g/L de glucosa y 0.012 g/L de rojo fenol, pH 6.5), la urea fue esterilizada por filtración utilizando un filtro estéril con tamaño de poro de 0.22 μm . Este medio de cultivo permite la detección rápida de la actividad de la enzima ureasa, las bacterias que hidrolizan

la urea liberan NH_3 y CO_2 , estos productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador rojo de fenol del color amarillo al fucsia. Las 26 cepas bacterianas fueron sembradas en la superficie del medio de cultivo, se incubaron a $24\text{ }^\circ\text{C}$ durante 6 días y se observó si se producía o no el cambio de color en el medio de amarillo a rosa-fucsia (MacFaddin, 2003; Silva García y García Bermejo, 2004). El ensayo se realizó por duplicado. Se utilizó *Proteus mirabilis* ATCC 43071 como control positivo y *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo.

4.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas para diferenciar y caracterizar a las 6 cepas ureasa positivas seleccionadas. Se utilizaron los medios MIO, LIA, TSI, citrato de Simmons, gelatina nutritiva, caldo RM-VP, medio para hidrólisis del Tween 80, caldo nitrato y agar manitol salado.

4.6. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DEL ION CALCIO

Para calcular el porcentaje de remoción del Ca^{2+} durante las pruebas se utilizó la ecuación (8), la cual es utilizada por varios autores (Bayoumi *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2020). En esta ecuación, ppm_i y ppm_f representan la concentración inicial y final de Ca^{2+} en ppm, respectivamente:

$$\text{Tasa de remoción de } \text{Ca}^{2+} = \left(1 - \frac{\text{ppm}_f}{\text{ppm}_i}\right) \times 100 \quad (8)$$

4.6.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para preparar el medio LB a una determinada concentración de Ca^{2+} se realizaron los siguientes cálculos:

Se partió de la base teórica según la cual 10 mg/L de CaO equivale a 1 grado de dureza total del medio, °GH o grado alemán de dureza (Soffiantini, 2013); lo cual equivale a 17.848 mg/L de carbonato de calcio (CaCO₃) ya que tiene una masa molar de 100.09 g/mol; entonces, de la misma forma se puede calcular la concentración de Ca²⁺ a la cual equivale 1 °GH como se ve en la siguiente relación:

$$17.848 \text{ mg/L de CaCO}_3 \rightarrow 7.144 \text{ mg/L Ca}^{2+}$$

El componente utilizado como fuente de calcio fue el cloruro de calcio dihidrato (CaCl₂·2H₂O), el cual se descompone en medio acuoso en las siguientes moléculas representadas en la ecuación (9):



Por lo que se puede calcular cuántos miligramos de CaCl₂·2H₂O se necesita para subir 1 °GH por litro de medio.

$$7.144 \text{ mg/L de Ca}^{2+} \rightarrow 26.2049 \text{ mg/L de CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$$

Teniendo en cuenta lo anterior, se preparó una solución madre de concentración de Ca²⁺ conocida. Para la preparación se diluyó 9827 mg de CaCl₂·2H₂O con agua destilada en una fiola de 100 mL, obteniéndose una solución madre con concentración de Ca²⁺ final de 98270 mg/L de CaCl₂·2H₂O.

$$98270 \text{ mg/L de CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 26790.44 \text{ mg/L de Ca}^{2+}$$

Utilizando la denominada ecuación de la dilución, $V_1C_1 = V_2C_2$, se determinó el volumen de la solución madre ($V_{\text{sol. madre}}$) que se necesita agregar para preparar un determinado volumen de medio (V_{medio}) a una determinada concentración de calcio ($C_{\text{Ca}^{2+} \text{ medio}}$), esta se ve representada en la ecuación (10).

$$(V_{\text{sol. madre}})(26790.44 \text{ ppm de Ca}^{2+})=(V_{\text{medio}})(C_{\text{Ca}^{2+} \text{ medio}}) \quad (10)$$

Se verificó la concentración de Ca^{2+} en el medio preparado utilizando el kit comercial Aquaforest® (Referencia AFPTCA00). Siguiendo las siguientes instrucciones de uso (Figura 5):

1. Se centrifugó 4 mL del medio inoculado en tubos Falcon de 15 mL a 7830 rpm x 10 minutos. Luego, se recolectó una muestra de 2 mL del sobrenadante utilizando una pipeta de 1000 μL y se transfirió a un vaso de prueba.
2. Se agregó alrededor de 0.05 g del reactivo A (indicador) con una cucharita medidora, sin agitar. Posteriormente se agregó 0.4 mL del reactivo B (hidróxido de sodio) con una jeringa de 1 mL para elevar el pH a 10, se agitó la muestra unos 10 segundos; la cual adquirió un color rosado por la presencia del Ca^{2+} .
3. Se tituló agregando gota a gota el reactivo C con una jeringa de 1mL, previamente enrasada, hasta que el medio cambió de color de rosado a azul estable, lo que indicó el final de la valoración. Por último, se comparó el volumen de reactivo C que permaneció en la jeringa con una tabla que lo correlaciona con la concentración de Ca^{2+} en el medio en ppm.

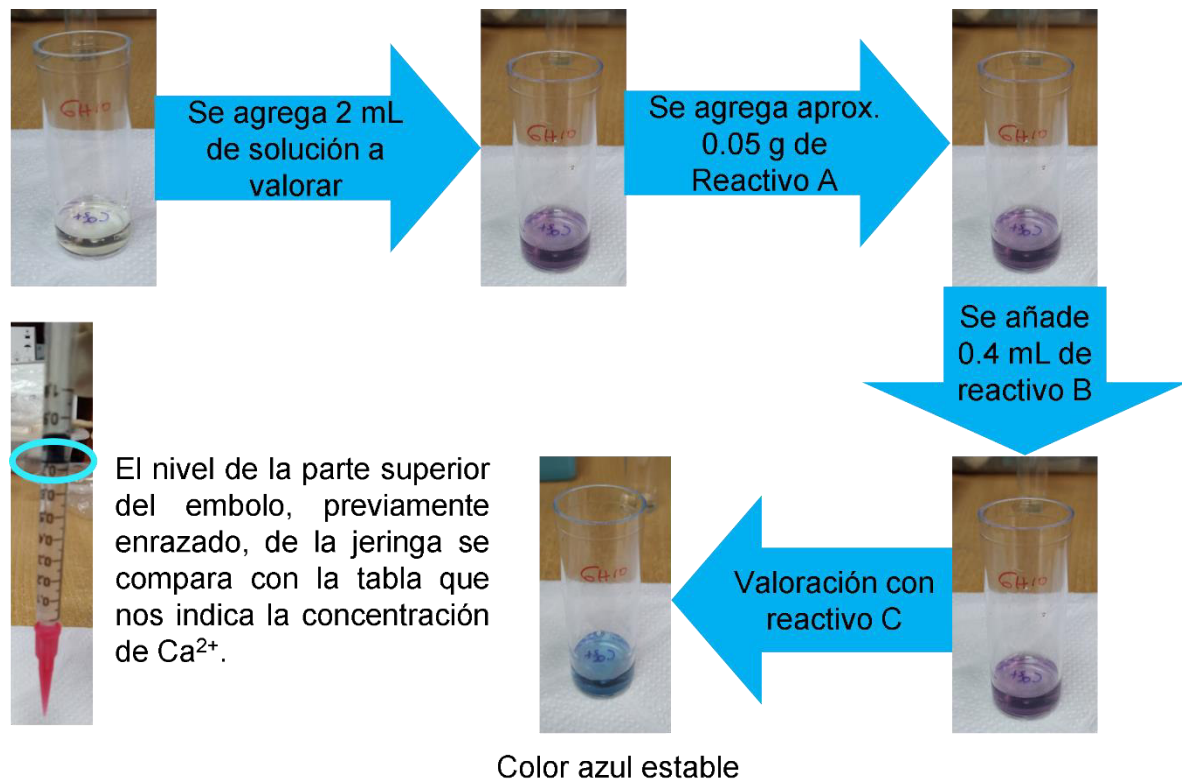


Figura 5. Procedimiento para la valoración complejométrica de iones de Ca^{2+} , utilizando el Kit comercial Aquaforest.

4.6.2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Las cepas se reactivaron en medio LB y se incubaron a 24 °C hasta que alcanzaron la turbidez correspondiente al tubo 1 de la escala de McFarland, equivalente a la concentración de 3×10^8 células/mL. A continuación, se centrifugó 2 mL de cada tubo con la cepa reactivada a 13000 rpm por 10 minutos. Después, la biomasa se resuspendió en 2 mL del medio de cultivo a tratar y se inoculó en los tubos o matraces en una concentración del 0.5%, lo que resultó en la concentración final de 1.5×10^6 células/mL.

4.6.3. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO SIN UREA

Se empleó el medio LB suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para obtener una concentración de Ca^{2+} de 140 ± 10 ppm. Se evaluó la capacidad bacteriana de remover el Ca^{2+} en solución acuosa sin la presencia de urea. Para esto, se inocularon por duplicado tubos de 16x150 mm que contenían 15 mL de este medio, con 75 μL de cultivo joven previamente reactivado en LB. A lo largo de 21 días de incubación, se midió la concentración de Ca^{2+} cada 7 días. Esta medición se realizó utilizando el Kit comercial Aquaforest (Figura 5), utilizando como blanco el medio no inoculado. Para la prueba se utilizaron 2 cepas ureasa positivas (5EL, II3KR) y 5 cepas ureasa negativas (I2QR, II2SR, II3KR, III2LR y III3FR).

4.6.4. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO CON UREA

4.6.4.1. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO LN A 140 PPM DE CALCIO

Se usó el medio LN, el cual se compone del medio LB suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y urea (Arias *et al.*, 2017; Arias *et al.*, 2019). Con el propósito de evaluar la capacidad bacteriana para la remoción del Ca^{2+} soluble en solución acuosa, debido a la actividad de la enzima ureasa, se inocularon 5 cepas ureasa positivas (1QL, 5EL, II3KR, II3OR y III4VR) en medio LB suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y urea filtrada (20 g/L), obteniéndose una concentración de Ca^{2+} final de 140 ± 10 ppm. Se inocularon, por duplicado, tubos de 16x150mm conteniendo 15 mL de medio con 75 μL de cultivo joven reactivado en LB. La medición de la concentración de Ca^{2+} se llevó a cabo a los 7 días de incubación utilizando el Kit comercial Aquaforest (Figura 5), el blanco utilizado fue el medio no inoculado.

4.6.4.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO LN A 400 PPM DE CALCIO

Se elevó la concentración de Ca^{2+} en el medio LN a 400 ppm, debido a que es una concentración cercana a la encontrada en el agua de mar (Castro *et al.*, 2016) y a las aguas residuales de alta dureza (Hammes *et al.*, 2003; Castro, 2016).

Se inocularon las 6 cepas ureasa positivas (1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR) en medio LB (HIMEDIA M1245) suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y urea filtrada (20 g/L), obteniéndose una concentración de Ca^{2+} final de 400 ± 10 ppm. Se inocularon matraces con 80 mL - 400 μL de medio LN con 400 μL de cultivo joven que se resuspendió en medio LN (3×10^8 células/mL), por triplicado. Se midió la concentración de Ca^{2+} a los 2, 6, 7, 10 y 14 días de incubación, el blanco utilizado fue el medio LN sin inocular.

La determinación del Ca^{2+} se realizó mediante valoración complejométrica según (Vogel y Jeffery, 1989), método que ha sido utilizado por otros autores (Bayoumi *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2019). Como se observa en la Figura 6, se recolectó 14 mL del medio y se centrifugó a 7830 rpm x 10 minutos para separar la biomasa, luego se tomó una muestra de 10 mL del sobrenadante y se pasó a un matraz de capacidad de 100 mL. Los iones de calcio se determinaron utilizando aproximadamente 0.01 g de ACC, indicador para valoraciones de calcio. Previo a la valoración, la muestra se acondicionó a pH 12 mediante la adición de NaOH (1 M), verificando el pH con tiras reactivas, y se valoró con EDTA 0.01 M. El volumen de EDTA consumido fue directamente proporcional a la concentración de Ca^{2+} en el medio.

$$M_{\text{Ca}^{2+}} = \frac{V_2 \times M_{\text{EDTA}}}{V_{\text{muestra}}}$$

$$\text{Dureza cálcica (ppm)} = M_{\text{Ca}^{2+}} \times \frac{100.091 \text{ g CaCO}_3}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

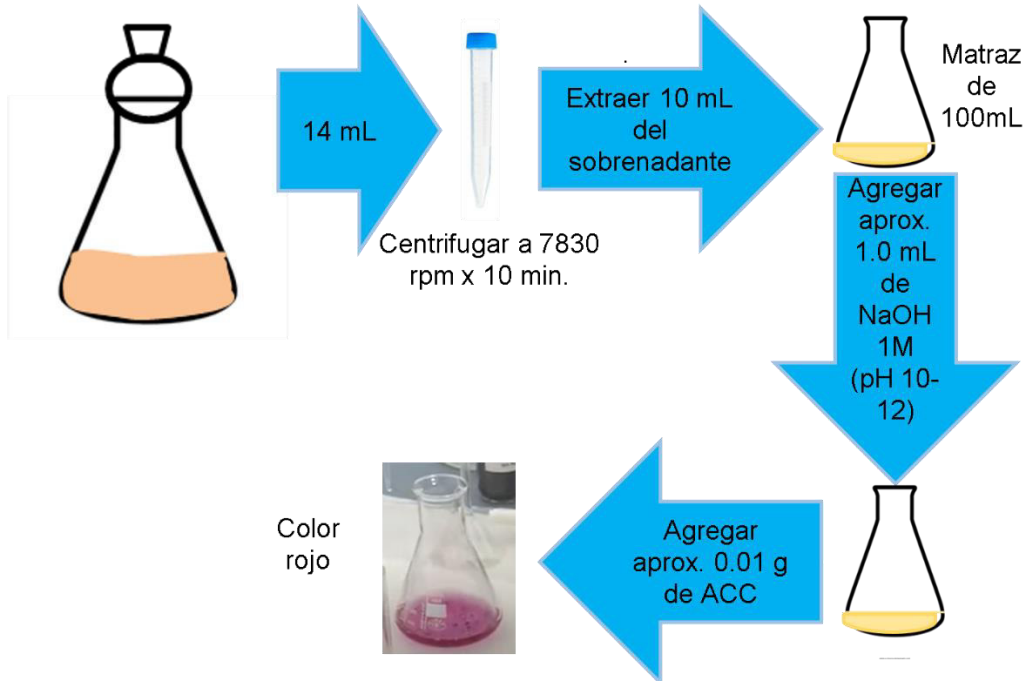
A partir de las ecuaciones anteriores (Rigalli y Lupo, 2021) se puede calcular la concentración de Ca^{2+} utilizando la ecuación (11):

$$[\text{Ca}^{2+}] = M_{\text{Ca}^{2+}} \times \frac{40.0769 \text{ g Ca}^{2+}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{0.01 \times V_{\text{EDTA}} \times 40076.9}{V_{\text{muestra}}} \quad (11)$$

El ACC libre es de color azul, pero cambia a rosa/rojo cuando forma un complejo con los Ca^{2+} . El EDTA forma un complejo más estable con el calcio que el ACC, por lo que la adición de EDTA al complejo Ca-ACC provoca la formación de Ca-EDTA, lo que lleva a la reversión al color azul del ACC libre (Figura 6).

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA A VALORAR



2. VALORACIÓN



Figura 6. Metodología en valoración complejométrica para evaluar la remoción del ion calcio. (1) Preparación de la muestra y (2) Valoración con EDTA. En la parte inferior se observa el matraz izquierdo (último rastro de color púrpura justo antes del punto final) y el matraz derecho (color azul claro en el punto final).

4.7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

4.7.1. PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA

Se reactivaron las 6 cepas ureasa positivas, previamente criopreservadas, en tubos de 16x100 mm con 10 mL de medio LB y se incubaron a 24 °C en agitación hasta que la turbidez llegó a la escala 1 de McFarland (3×10^8 células/mL). Inmediatamente después, se inoculó 25 µL del cultivo reactivado en tubos de 12x75 mm con 5 mL del medio de prueba, por triplicado. Para la prueba de tinción de biopelícula se prepararon dos microplacas iguales, una se coloreó a las 48 horas y la otra a las 72 horas de incubación. Como control negativo a la formación de biopelícula se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, que carece de los genes *icaA* e *icaB*, los cuales están fuertemente asociados a la síntesis de exopolisacáridos, el gen *icaA* codifica la N-acetilglucosaminil-transferasa, mientras que el gen *icaB* codifica la desacetilasa de adhesina intercelular de polisacáridos (Senobar Tahaei *et al.*, 2021; Abdel-Shafi *et al.*, 2022; Donadu *et al.*, 2022). *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control positivo en base a investigaciones previas (Martínez *et al.*, 2021) que lo identificaron como un modelo de formación de biopelícula.

4.7.1.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MICROPLACA

Los medios utilizados fueron LB y LN. En ausencia de mención adicional, el inóculo en los medios fue del 0.5% (1.5×10^6 células/mL), y la concentración de Ca^{2+} en el medio LN fue 400 ppm. Los medios tenían pH inicial de 7.0.

Las pruebas se llevaron a cabo en los siguientes medios bajo diferentes condiciones:

- Medio LB a diferente concentración de inóculo (0.5%-2.5%).
- Medio LN a diferente concentración de Ca^{2+} (140 ppm-400 ppm).
- Medio LN, LN sin $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y LN sin urea.

Inmediatamente después de inocular los pocillos, se colocó la microplaca en el espectrofotómetro para microplacas Epoch 2 (Marca BioTek Instruments), previamente configurado en el modo de cinética. Se programó una incubación a 24 °C durante 48 horas, tomando lecturas a intervalos de media hora a densidad óptica (DO) de 600 nm, previa agitación de 6 segundos antes de cada lectura.

4.7.1.2. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

Para cuantificar la formación de biopelícula en microplaca, se realizó el siguiente procedimiento (Coffey y Anderson, 2014; Philips *et al.*, 2017; López Pérez *et al.*, 2019). A las placas incubadas estáticamente durante 48 y 72 horas, se les realizaron 3 lavados suaves con PBS 1X para retirar las células planctónicas no adheridas. Luego, la placa fue invertida y secada en la estufa a 56 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió 200 µL de la solución de cristal violeta al 1% (p/v) a cada pocillo utilizando una micropipeta multicanal de 200 µL. Tras permitir que el colorante se fije a la biopelícula durante 30 minutos, se retiró el exceso de cristal violeta y se lavó suavemente los pocillos tres veces con agua desionizada estéril. Finalmente, se agregó 200 µL de la solución etanol:acetona al 80:20 (v/v) a cada pocillo para solubilizar el cristal violeta adherido a la biopelícula. La cantidad de biopelícula sintetizada fue cuantificada midiendo la absorbancia máxima del cristal violeta, a 590 nm (Leyton *et al.*, 2015; Salcedo, 2017), previa agitación de 10 segundos dentro del lector de microplaca. Las cepas se clasificaron según su capacidad de producir biopelículas, comparando su DO con la del control negativo *S. aureus* ATCC 12600 (DOc), como: débil ($DO < 2DOc$), moderado ($2DOc < DO < 4DOc$) y fuerte ($4DOc < DO$). En la Figura 7 se describe de manera gráfica este procedimiento.

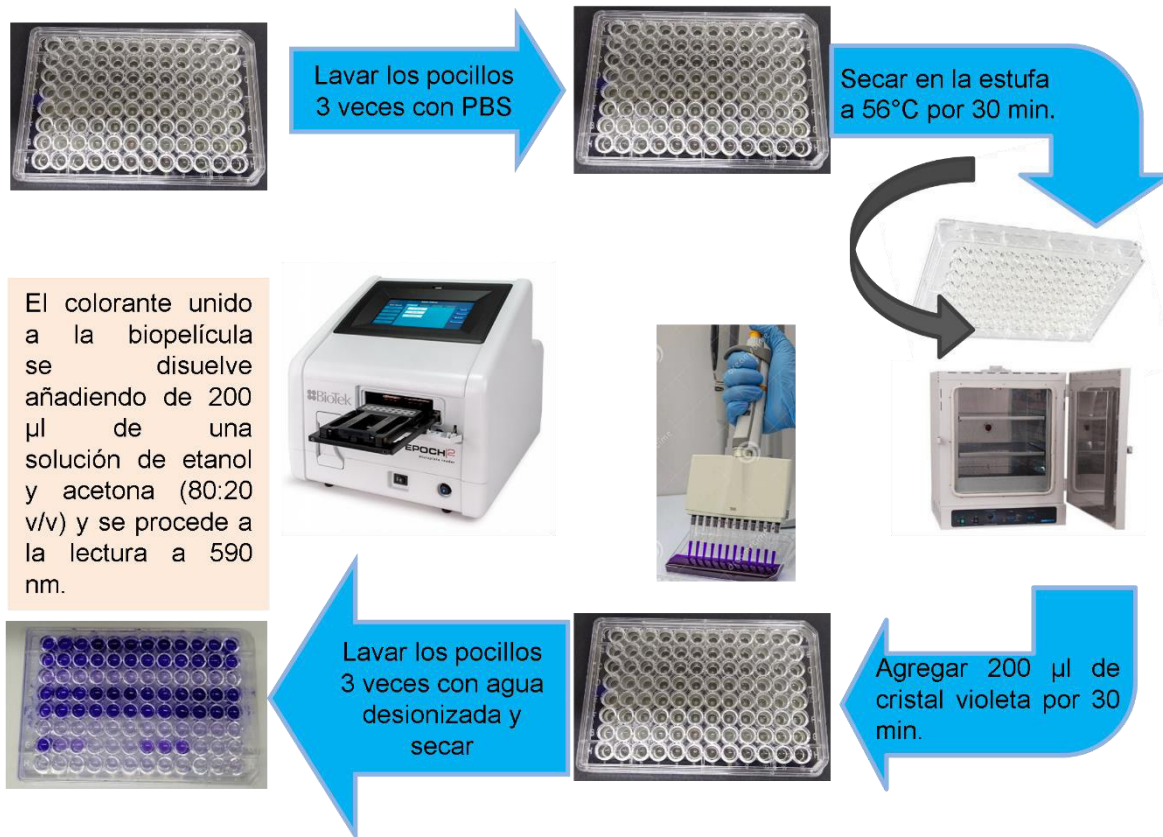


Figura 7. Procedimiento de tinción de microplaca para evaluar la formación de biopelícula.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la significancia estadística de las comparaciones de la tasa de remoción media de calcio entre las cepas bacterianas seleccionadas con respecto al control negativo (*E. coli* ATCC 25922), se realizaron pruebas utilizando el software GraphPad mediante ANOVA unidireccional y bidireccional y prueba de Tukey *a posteriori*. En todos los casos, se consideraron significativas las comparaciones en las que $p < 0.05$, y los asteriscos fueron utilizados para resaltar estas diferencias estadísticamente significativas. Las desviaciones estándar de cada conjunto de experimentos se representan en la figura correspondiente como barras de error.

V. RESULTADOS

5.1. VERIFICACIÓN DE LA PUREZA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Se trabajó con 53 aislados provenientes del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa. Para verificar su pureza se sembraron en medio SG, que contiene NaCl 4%, lo que da cierta selectividad, y se realizaron tinciones de Gram de las colonias aisladas en placa para comprobar su pureza.

5.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

En términos generales, se observó gran diversidad en la morfología y coloración de las colonias aisladas, el más frecuente fue el color crema (59%) que se considera no pigmentado, seguido del naranja (35%), amarillo (3%) y blanco (3%) (ver Figura 8-A). En cuanto a la morfología microscópica de las células, la mayoría de los aislados fueron bacilos Gram positivos (43%), seguidos de los cocos Gram positivos (36%), bacilos Gram negativos (19%) y cocobacilos Gram negativos (2%), (ver Figura 8-B).

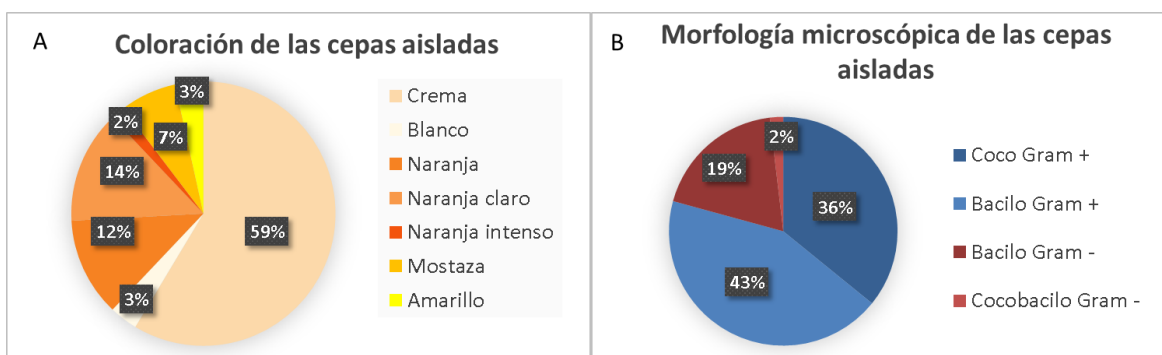


Figura 8. Diagrama en pastel de la característica macroscópica del color (A) y la forma microscópica (B) de las 53 cepas aisladas del RVSPV.

Todas las cepas ureasa positivas seleccionadas son cocos Gram (+) de crecimiento en racimo, como se puede observar en la Figura 9.

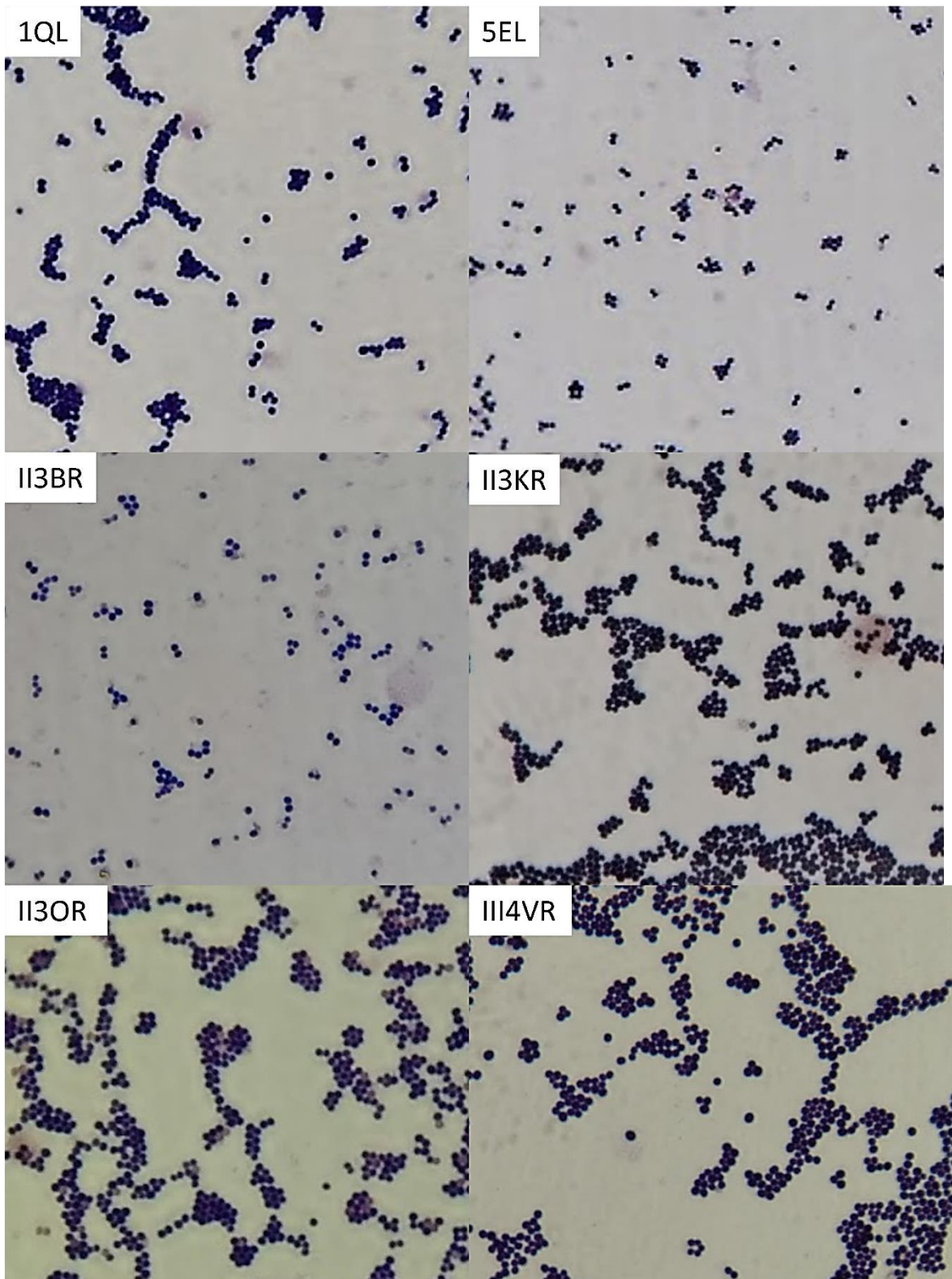


Figura 9. Tinción de Gram de las cepas ureasa positivo a 1000X de aumento. Se pueden observar que todas las cepas son cocos Gram (+) en racimo.

5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS SEGÚN CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO

De las 53 cepas, el 1.89% (n=1); 5.66% (n=3); 7.55% (n=4); 45.28% (n=24) y 39.62% (n=21), crecieron en rangos de hasta 4%, 6%, 8%, 10% y 20% de NaCl, respectivamente. La mayoría de las cepas crecieron en el rango de hasta 10% de NaCl, mientras que un menor porcentaje de cepas mostraron crecimiento en los otros rangos.

De las 26 cepas seleccionadas, el 3.85% (n=1); 7.69% (n=2); 15.38% (n=4); 38.46% (n=10) y 34.62% (n=9), crecieron en rangos de hasta 4%, 6%, 8%, 10% y 20%, respectivamente (Anexo 3). El mayor porcentaje de las cepas también crecieron en el rango de hasta 10% de NaCl, mientras que el porcentaje de cepas que creció en los otros rangos fue menor. Todas las 6 cepas ureasa positivas estudiadas crecían en el rango de hasta 20% de NaCl (Figura 10 y Anexo 3).

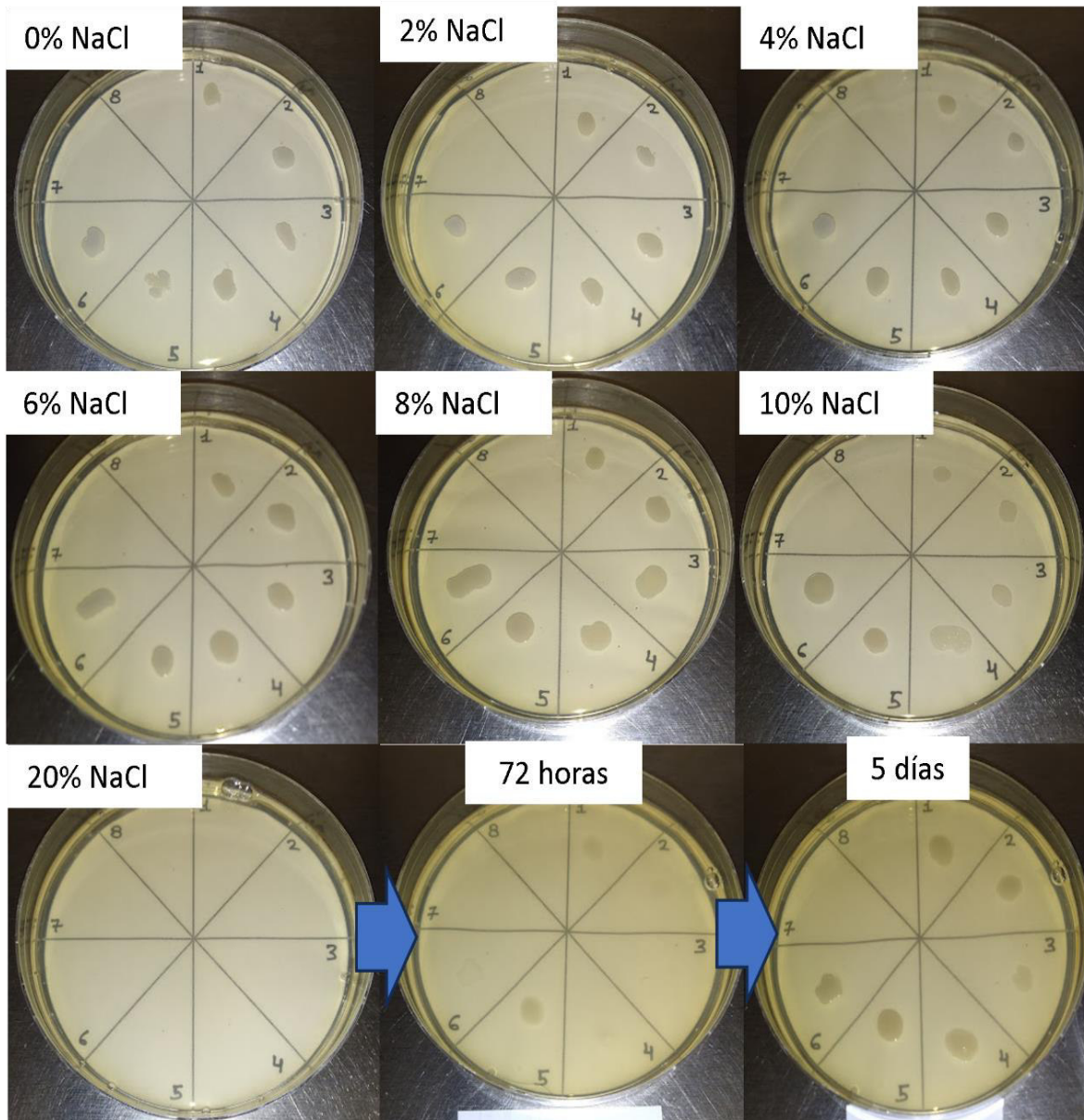


Figura 10. Caracterización de las 6 cepas bacterianas ureasa positiva respecto a un gradiente de concentración de NaCl con lectura a las 24 horas de incubación, a excepción de la placa a 20% NaCl, la cual se leyó también a las 72 horas y 5 días de incubación. Cada cepa bacteriana se replicó en el mismo número de posición de cada cuadrícula de la placa 1QL (1), 5EL (2), I13BR (3), I13KR (4), I13OR (5), I14VR (6), las ultimas 3 placas de abajo corresponden a crecimiento a 20% de NaCl, todas las placas se replicaron por duplicado.

5.3. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DE SODIO

Antes de llevar a cabo el experimento, se realizó una curva de calibración que relaciona la CE (dS/m) del medio SG con la concentración de NaCl agregada (Anexo 7). Se observó la relación directa que existe entre ambos, lo que significa que cualquier disminución en la CE podría atribuirse a una reducción en la concentración de Na⁺ soluble.

Los resultados de las pruebas de remoción biológica de sodio muestran que no hubo una disminución significativa de la CE durante los 14 días de incubación por ninguna de las cepas en medio SG ($p > 0.05$) (ver Figura 11; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) ni en medio LB (ver Figura 12) suplementados con NaCl.

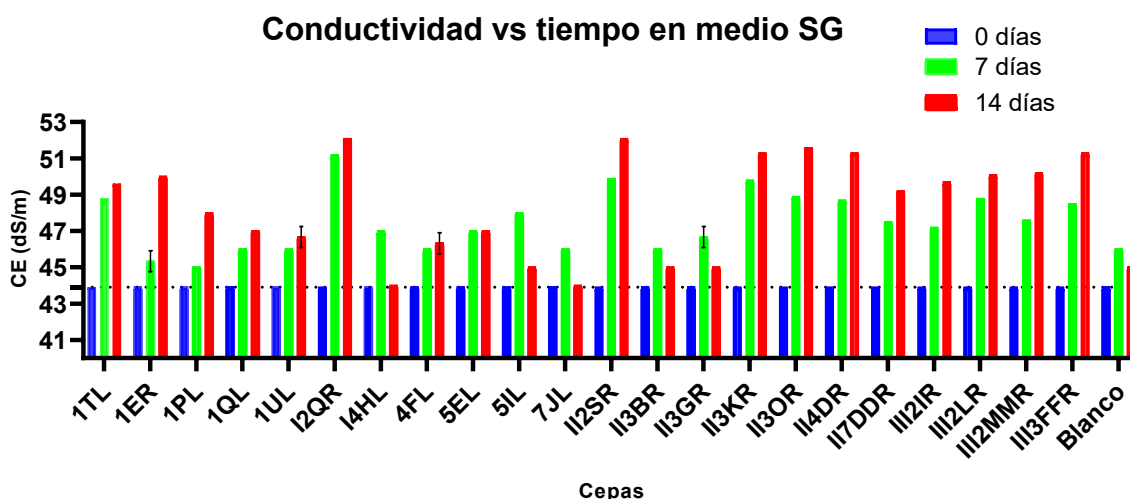


Figura 11. Comparación de los tratamientos con diferentes cepas respecto a los valores de CE (dS/m) para cada 7 días de medición en medio SG (CE inicial 43.9 dS/m). El blanco es el medio SG no inoculado.

Posteriormente, se empleó un medio diferente, el medio comercial LB (marca HIMEDIA), que contiene solo NaCl en baja concentración en su composición, con el fin de verificar si la CE disminuía sin la interferencia de otros iones. También, se suplementó con menor concentración de NaCl (CE inicial 10.4 dS/m) para determinar si las cepas eran capaces de reducir la CE en estas condiciones. Sin embargo, los resultados no mostraron una

disminución significativa de la CE en comparación con el valor inicial ($p > 0.05$) para ninguna de las cepas utilizadas (ver Figura 12).

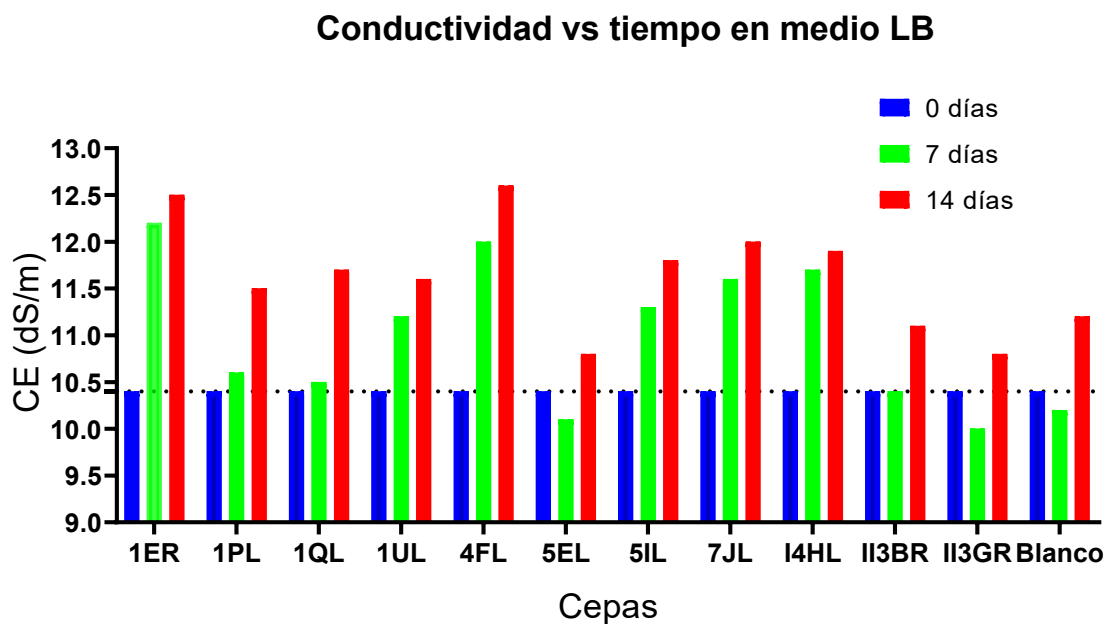


Figura 12. Comparación de los tratamientos con diferentes cepas respecto a los valores de CE (dS/m) para cada 7 días de medición en medio LB (CE inicial 10.4 dS/m). El blanco fue el medio no inoculado.

5.4. SELECCIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD UREASA.

Del total de las cepas, 6 (1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR) demostraron ser fuertes productoras de ureasa (Figura 13). Esto se evidenció por el cambio de color del medio de cultivo, que pasó de amarillo a fucsia en las primeras 24 horas de incubación en el medio urea de Christensen. El medio se mantuvo en observación hasta los 6 días de incubación, por si los microorganismos hidrolizaban la urea lentamente.

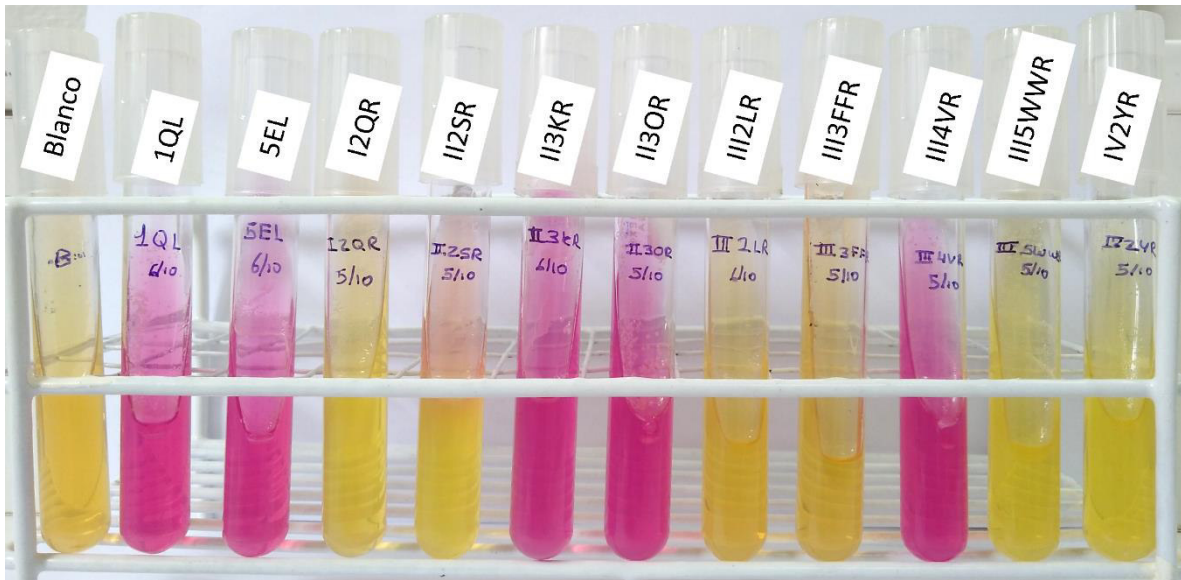


Figura 13. Tubos inoculados con 11 cepas en medio urea de Christensen incubados por 72 horas; se encuentran ubicadas de izquierda a derecha las cepas 1QL, 5EL, I2QR, II2SR, II3KR, II3OR, III2LR, III3FFR, III4VR, III5WWR y IV2YR. Las cepas ureasa positivas son la 1QL, 5EL, II3KR, II3OR y III4VR. La cepa II3BR no aparece en la imagen debido a que se identificó posteriormente como ureasa positiva.

Las cepas ureasa positivas fueron sembradas en medio TSA por 24 horas, se registraron sus características culturales, y se realizaron algunas pruebas bioquímicas (Anexo 4).

Las colonias también fueron sembradas en placas con agar LB. A las 24 horas de incubación, las colonias de las 6 cepas fueron puntiformes y no pigmentadas. Por lo tanto, se incubaron hasta los 4 días para observar sus características culturales y si formaban pigmentos (Tabla 3). De las cepas ureasa positivas, las cepas 1QL, II3BR y II3OR (50%) formaron un pigmento naranja a los 4 días de incubación (Figura 14).

Tabla 3. Características culturales de las cepas en medio LB a los 4 días de incubación.

Característica	Cepa					
	1QL	5EL	II3BR	II3KR	II3OR	III4VR
Tiempo de crecimiento	4 días	4 días	4 días	4 días	4 días	4 días
Tamaño	2.2 mm	2.5-3.0 mm	4.0 mm	3.0-4.0 mm	3.5-4.0 mm	5.0 mm
Color	naranja claro	blanco perla	blanco marfil	ligeramente naranja	ligeramente naranja	blanco marfil
Superficie	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	rugosa
Forma	circular	circular	circular	circular	circular	Irregular
Borde	entero	entero	entero	entero	entero	aserrado
Elevación	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa	elevada
Luz transmitida	opaca	opaca	semitraslúcida	opaca	opaca	opaca
Luz reflejada	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante

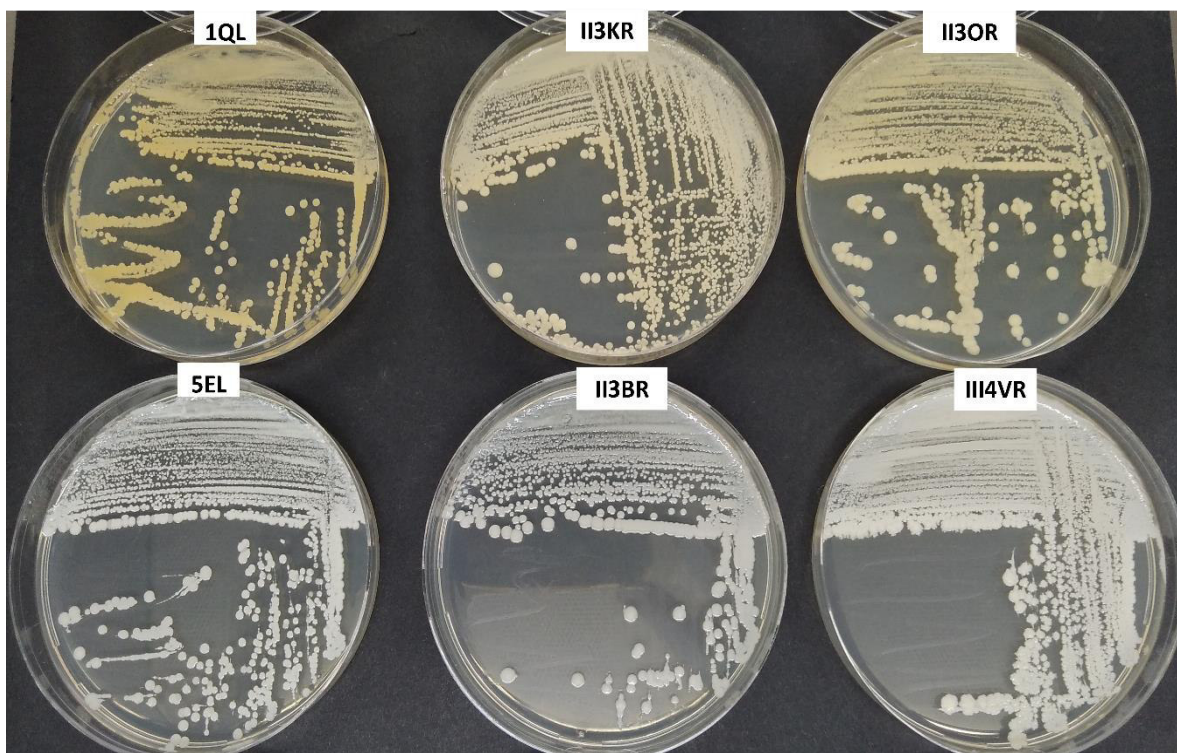


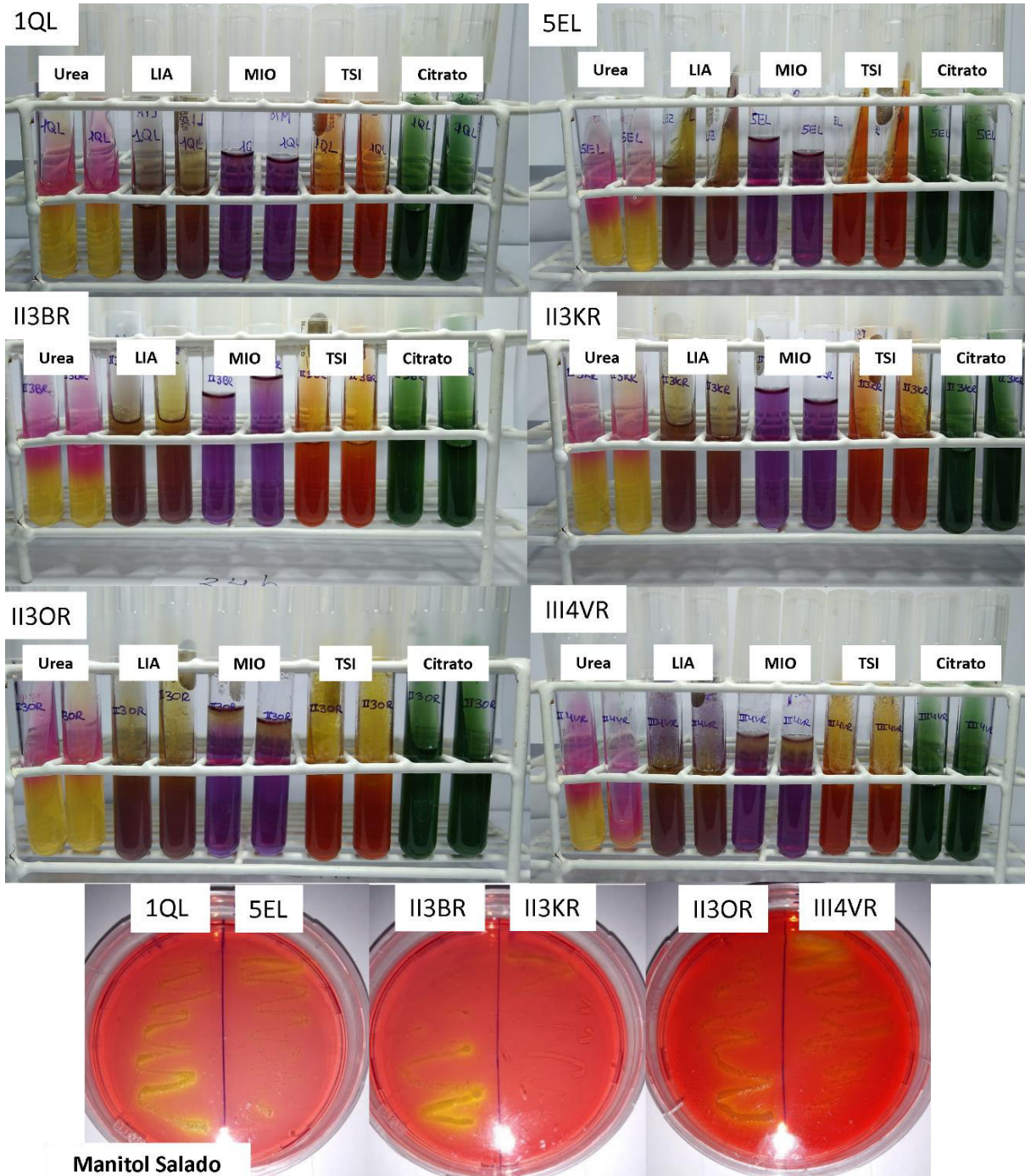
Figura 14. Cepas de estudio en placas con medio agar LB después de 4 días de incubación a 24 °C; se puede observar la formación de pigmentos naranjas en las cepas 1QL, II3KR y II3OR; las cepas 5EL, II3BR y III4VR no evidencian formación de pigmentos.

5.5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se realizaron pruebas bioquímicas a las 6 cepas ureasa positivas (Figura 15 y Anexo 5), se corroboró que todas las 6 cepas seleccionadas fueron ureasa positivas repitiendo la prueba de la ureasa junto a las demás.

En medio LIA todas se leen como A/NC (superficie ligeramente ácida/ profundidad alcalina o púrpura) y ninguna produce ácido sulfhídrico (sin ennegrecimiento del medio). En el medio MIO, todas mostraron las mismas características a las 24 horas de incubación: a) no son móviles (no se desplazan fuera del área de puntura), b) son indol negativas (no se formó el anillo rojo con la adición del reactivo de Kovacs) y se leen como K/NC (superficie alcalina o purpura/ profundidad alcalina o purpura). En medio TSI todas crecieron en la superficie en plano inclinado a las 24 horas de incubación, ninguna fermentaba alguno de los 3 azúcares (NC/NC), no creciendo en el área anaeróbica. A las 48 horas de incubación todas mostraron un cambio de color a amarillo en la superficie y el fondo no cambió de color (A/NC) por lo que se interpretaría que acidifican el medio por la utilización de los azúcares, pero no crecen en la zona anaeróbica. La no alcalinización (rojo) del medio indica que no utilizan las peptonas presentes. Cabe señalar que el medio TSI fue diseñado para enterobacterias por lo que las cepas ureasa positivas, al no ser enterobacterias, no suelen realizar las reacciones que el medio TSI está diseñado para detectar. Los controles, *E. coli* (A/A) y *Enterococcus faecalis* (A/K) coinciden con lo descrito por la literatura (Millipore, 2018). En medio Citrato de Simmons, todas fueron citrato permeasa negativo (no hubo crecimiento). En agar manitol salado, todas fueron manitol positivas a las 24 horas (las zonas alrededor de la colonia viraron a amarillo). En caldo nitrato todas redujeron los nitratos a nitritos (color rojo al agregar unas gotas de los reactivos A y B de Peter Griess). En medio Tween 80 ninguna hidrolizaba el Tween 80 hasta los 10 días de incubación (no se formó un halo opaco alrededor del área de estriado). Todas las cepas son Rojo de Metilo negativas a las 48

horas de incubación, lo cual indica que no sigue la ruta ácido-mixta de la fermentación. En medio Gelatina nutritiva todas las cepas seleccionadas mostraron ser gelatinasa negativas hasta los 14 días que se dejó en incubación, a excepción de la cepa III4VR, la cual mostró actividad gelatinasa a las 48 horas de incubación.



Continuación en la siguiente página.

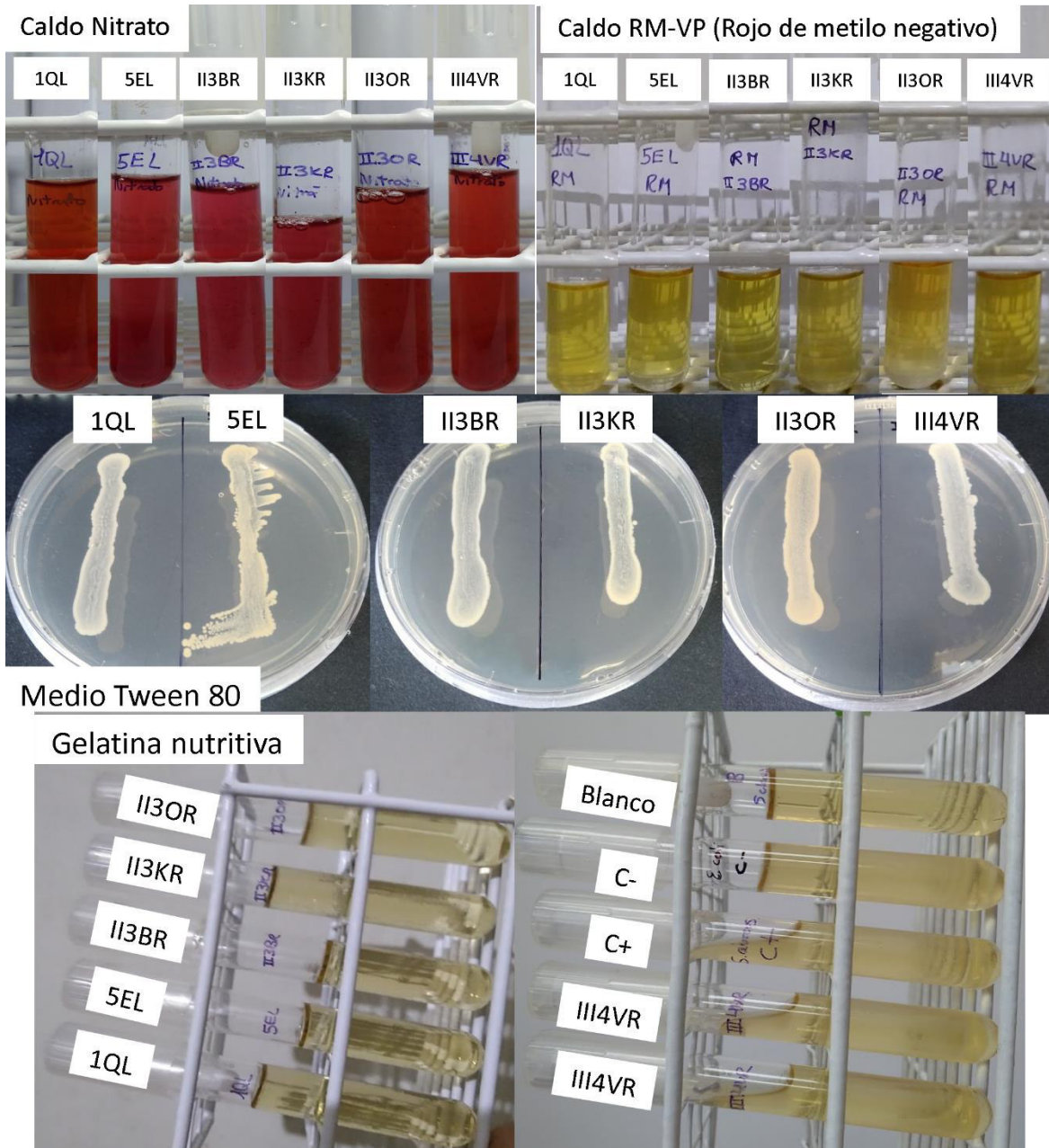


Figura 15. Pruebas bioquímicas realizadas para las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR. Todas son ureasa (+); A/NC y SH₂(-) en medio LIA; Motilidad (-), Indol (-) y K/NC en medio MIO; A/NC y sin producción de gas en TSI; citrato permeasa (-); manitol (+); nitrato reductasa (+); rojo de metilo (-); ninguna hidroliza el Tween 80 (-); y son gelatinasa (-), a excepción de la cepa III4VR (+).

5.6. PRUEBA DE REMOCIÓN BIOLÓGICA DEL ION CALCIO

5.6.1. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO SIN UREA

En primer lugar, se llevó a cabo un experimento utilizando la cepa II2SR (ureasa negativa) en medio LB suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con el propósito de evaluar la remoción de Ca^{2+} a diferentes concentraciones iniciales (70 ppm y 140 ppm). Se pudo observar que la tasa de remoción de Ca^{2+} aumenta cuando la concentración de este es alta en el medio de cultivo. En particular, se consiguió la disminución del calcio soluble de 140 ppm a 30 ppm en un período de 21 días, lo que representó una tasa de remoción del 78.57%. Cabe destacar que la concentración de calcio en el blanco del medio se mantuvo inalterada (

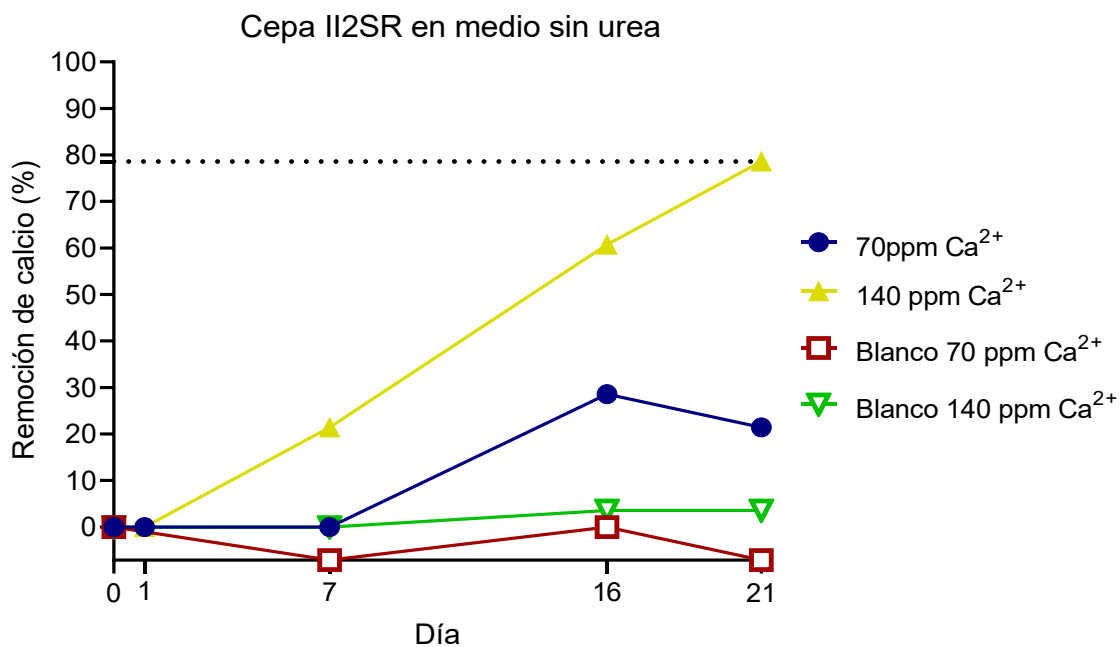


Figura 16).

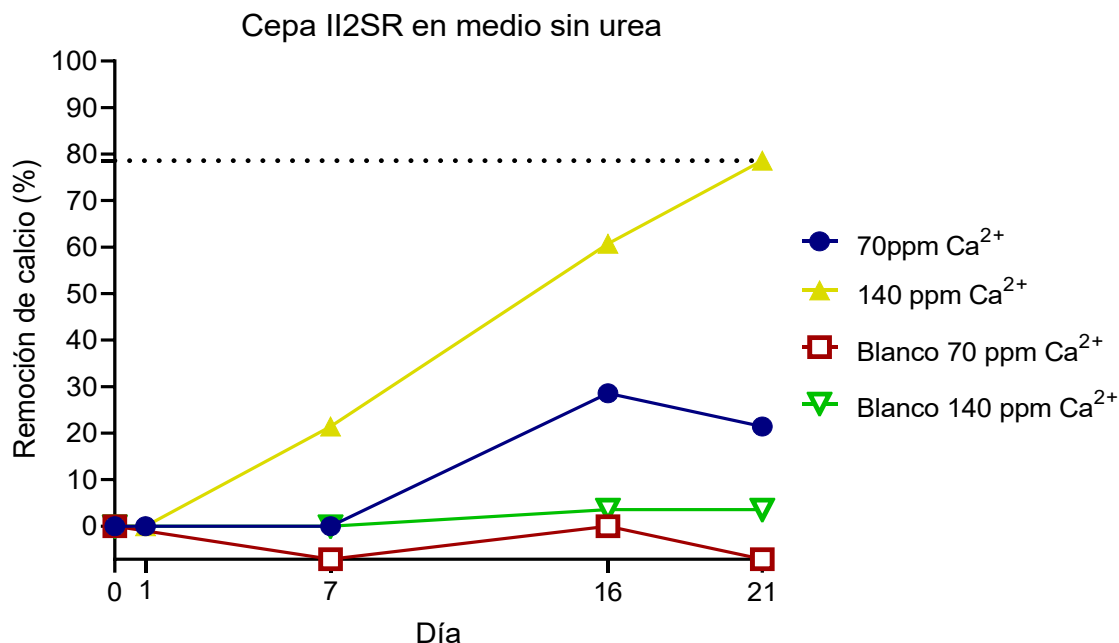


Figura 16. Remoción de calcio por la cepa II2SR en medio LB suplementado a diferentes concentraciones de Ca²⁺ (70 ppm y 140 ppm). La línea punteada representa la tasa de remoción del 78.57% de Ca²⁺ cuando la concentración inicial era de 140 ppm en un periodo de 21 días.

Posteriormente, se realizó una prueba incluyendo a las cepas 5EL, II3KR (ureasa positiva), y I2QR, III2LR, III3FFR (ureasa negativa) en medio LB suplementado con CaCl₂·2H₂O para probar su tasa de remoción a 140 ppm de Ca²⁺ (Figura 17). En comparación con las demás, la tasa de remoción a los 21 días fue mayor para la cepa II2SR (78.57%); en segundo lugar, las cepas I2QR, III2LR y III3FFR, tuvieron en promedio una disminución de la concentración de Ca²⁺ de 140 ppm a 72.5 ± 2.5 ppm, alcanzando una tasa de remoción promedio del 48.2 ± 1.8%; en tercer lugar, las cepas 5EL y II3KR, tuvieron en promedio una disminución de la concentración de Ca²⁺ de 140 ppm a 102.5 ± 5 ppm y alcanzaron una tasa de remoción promedio del 26.79 ± 3.58%. La concentración de Ca²⁺ del blanco prácticamente no experimentó cambios.

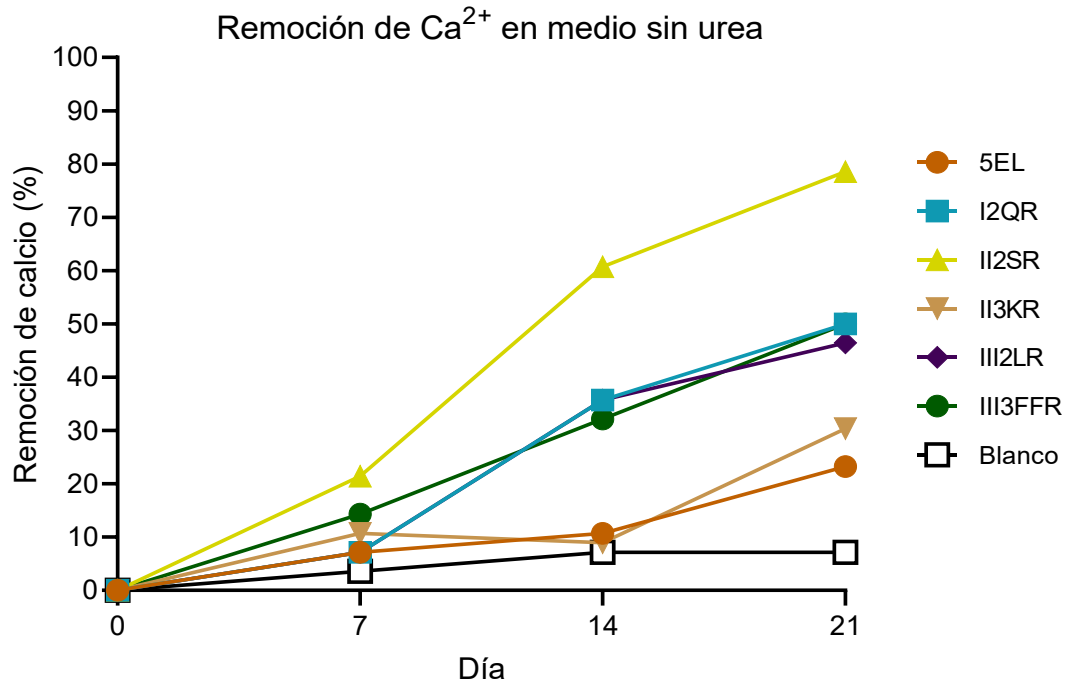


Figura 17. Remoción de calcio en medio LB suplementado con $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se utilizaron cepas ureolíticas (5EL y I13KR) y no ureolíticas (I2QR, I12SR, I112LR y I113FFR). La concentración de Ca^{2+} inicial fue de 140ppm.

5.6.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO EN MEDIO CON UREA

Previamente se realizó una curva de calibración para medir la concentración de Ca^{2+} en medio LN (Anexo 8). Se usó el kit comercial Aquaforest para realizar la curva de concentración de Ca^{2+} , y se empleó como referencia para ajustar y corregir los datos obtenidos a través del otro método complejométrico.

Para esta prueba, realizada en matraces con 25 mL de medio, todas las cepas ureasa positivas mostraron una tasa de remoción de calcio del 100% para el día 7 (Tabla 4); sin embargo, no se midió la concentración de Ca^{2+} en días anteriores por lo que no se sabe cuánto tiempo exactamente les tomó remover totalmente el calcio soluble del medio. El blanco permaneció con casi la misma concentración de calcio inicial (130 ppm).

Tabla 4. Remoción de calcio en medio LN.		
Cepa	Tasa de remoción de calcio (%)	
	0 días	7 días
1QL	0	100
5EL	0	100
II3KR	0	100
II3OR	0	100
III4VR	0	100
Blanco	0	0

En los matraces tratados se pudo observar dos fases, una cristalina y otra blanquecina (Figura 18).



Figura 18. En todos los matraces se vieron dos fases, en el fondo se pudo evidenciar una precipitación blanquecina con la biomasa.

Posteriormente, se realizó otra prueba en matraces con 80 mL de medio LN con una concentración de Ca^{2+} de 400 ppm. A los 6 días de incubación se observó una mayor diferencia significativa entre las cepas respecto a la tasa de remoción de calcio con un $p < 0.05$ (Figura 19), siendo la cepa II3OR la que obtuvo mayor tasa de remoción de Ca^{2+} (78.3%), seguido por la cepa II3BR (74.7%), 1QL (68.7%), III4VR (64.7%), II3KR (64.0%) y la 5EL (62.8%).

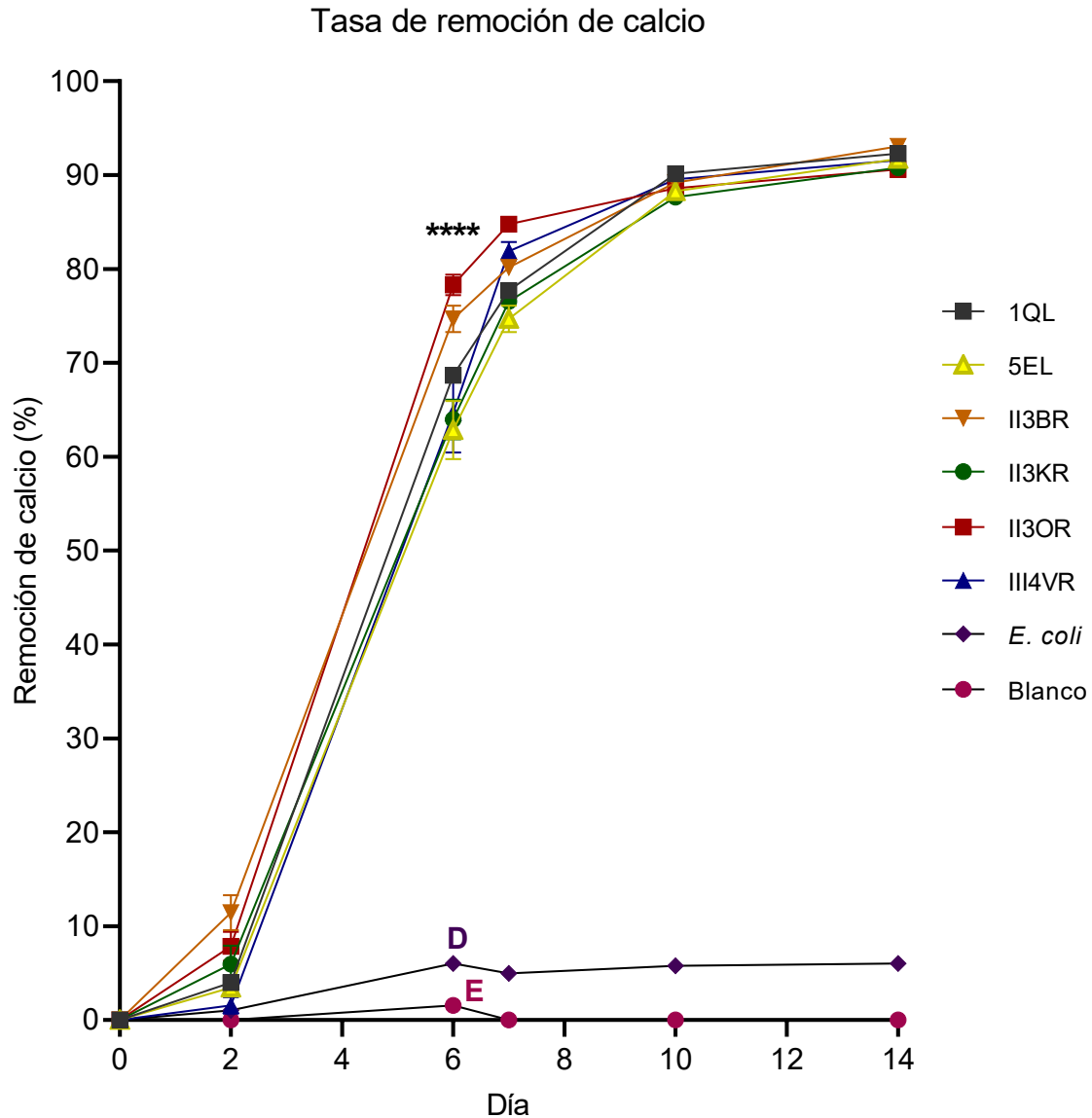


Figura 19. Tasa de remoción de calcio de las 6 cepas ureasa positivo. Las bacterias fueron cultivadas en medio LN a 24 °C en condiciones estáticas. En la gráfica se representa la tasa de remoción de calcio según la fórmula (8). Cada símbolo representa la media de remoción de calcio (%), con su respectiva desviación estándar como barras de error, realizada por la cepa 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR, respectivamente. El grupo control es la cepa *E. coli* ATCC 25922, y el blanco es el medio de cultivo sin bacteria. Se realizó la prueba de ANOVA unidireccional de la remoción de calcio (%), cuyo **** representa una diferencia significativa cuyo valor de p es < 0.0001. Todas las cepas se diferencian significativamente (p < 0.0001) respecto al control negativo.

En cuanto a la variación del pH a lo largo del tiempo, se pudo observar que en promedio todas las cepas ureasa positivas modificaron este factor fisicoquímico en el medio de cultivo hasta pH 9.33 (Figura 20). El control negativo *E. coli*, también elevó el pH del medio hasta 8.78, y el pH del blanco permaneció prácticamente inalterado.

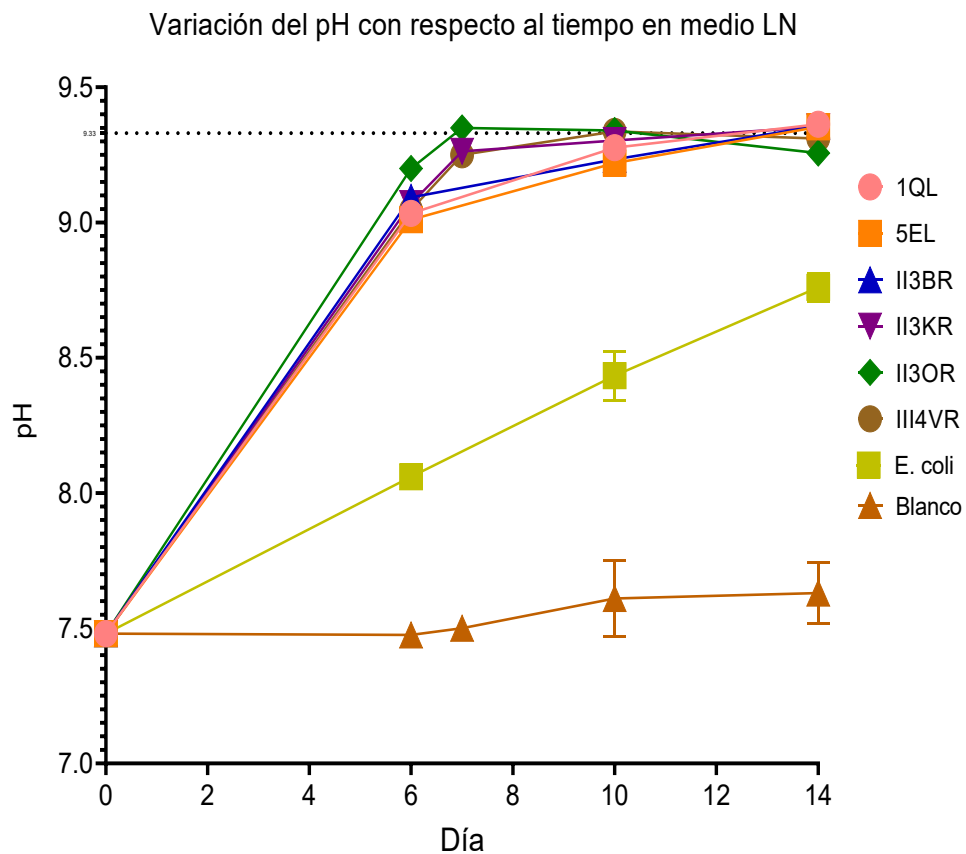


Figura 20. Variación del pH con respecto al tiempo para las cepas ureasa positiva incubadas en matraz para la prueba de remoción biológica de Ca^{2+} . En promedio el pH se elevó hasta 9.33.

En todos los matraces tratados se observó la presencia de precipitados blanquecinos, probablemente de carbonato de calcio (Figura 21).

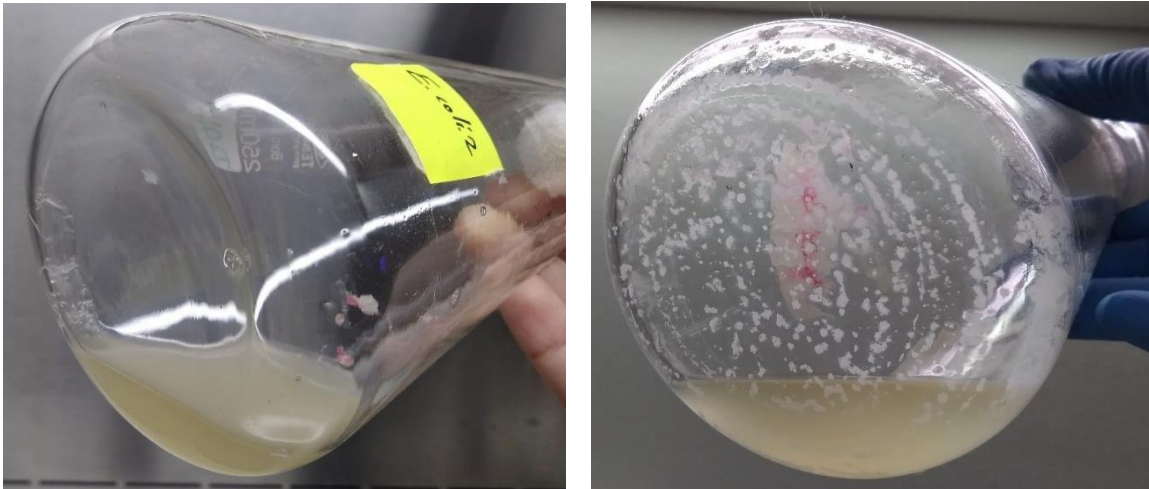


Figura 21. Matraces de las cepas *E. coli* (izquierda) y III4VR (derecha) después de 14 días de incubación a 24 °C. Se puede apreciar la precipitación de cristales en el matraz III4VR, probablemente debido a la biomineralización. En cambio, en el matraz inoculado con *E. coli* ATCC 25922 (ureasa negativa) no se observa ninguna precipitación.

5.7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MICROPLACA DE LAS CEPAS UREASA POSITIVAS

Para el análisis estadístico, se usó la prueba de múltiples comparaciones de Tukey ($p < 0.05$) y el análisis de varianza de una vía (ANOVA) ordinario ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

5.7.1. CRECIMIENTO EN MEDIO LB Y LN

Las cepas fueron inoculadas al 0.5% (1.5×10^6 células/mL) del volumen total. En la

Figura 22 se puede observar que la cepa III4VR muestra mayor constante específica de crecimiento (2.087 h^{-1} , 1.249 h^{-1}), seguida de la cepa II3BR (1.149 h^{-1} , 0.773 h^{-1}), 5EL (0.622 h^{-1} , 0.458 h^{-1}), II3KR (0.272 h^{-1} , 0.334 h^{-1}), II3OR (0.149 h^{-1} , 0.190 h^{-1}) y 1QL (0.062 h^{-1} , 0.159 h^{-1}) en medio LB y LN, respectivamente (Anexo 6). Sin embargo, todas las cepas muestran un crecimiento robusto en menos de 24 horas, la cepa 1QL, con menor tasa de

crecimiento, alcanza una densidad celular de 8.5×10^8 células/mL en medio LB, a las 24 horas de incubación.

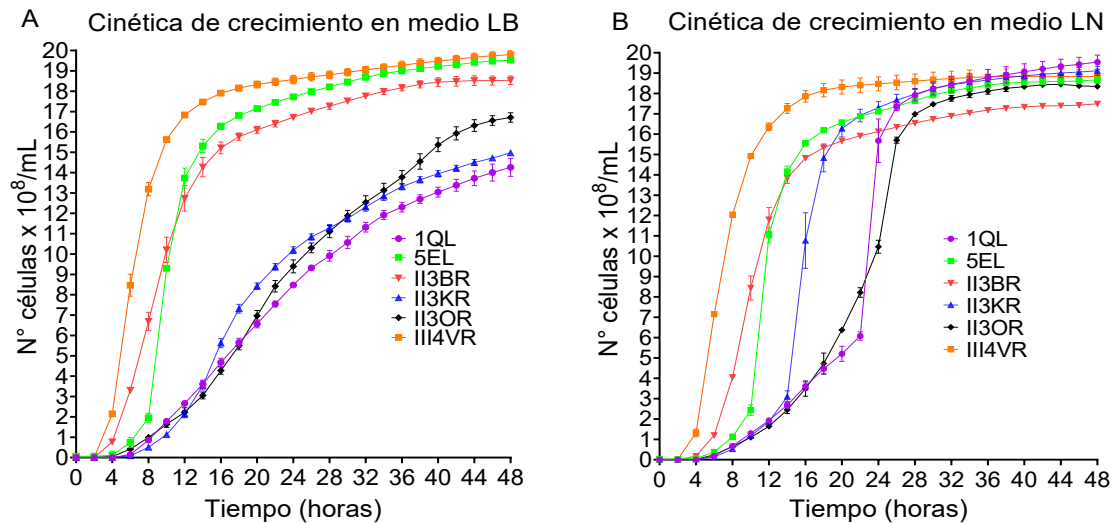


Figura 22. Cinética de crecimiento en medio LB (A) y LN (B), las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR fueron inoculadas al 0.5% (1.5×10^6 células/mL).

5.7.2. CRECIMIENTO EN MEDIO LB A DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE INÓCULO Y MEDIO LN A DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE CALCIO

En relación con la cepa 1QL (Figura 23-A), se observó que el medio LN con 400 ppm de Ca^{2+} promueve su crecimiento de manera significativa ($p < 0.05$). Además, se observó que el crecimiento en medio LB es ligeramente más rápido a concentraciones más altas de inóculo, pero esta diferencia no resulta significativa ($p > 0.05$).

En relación con la cepa 5EL (Figura 23-B), durante su fase exponencial se observó un mayor crecimiento a una menor concentración de Ca^{2+} ($p < 0.05$); por lo tanto, el calcio no favoreció su crecimiento. A las 10 horas de incubación, se pudo observar que la cepa crece más rápido en el medio LB que en el medio LN ($p < 0.05$); por lo tanto, el medio que más favoreció su crecimiento fue el LB. Durante su fase exponencial, se observó un mayor crecimiento a una concentración de inóculo mayor ($p < 0.05$).

En relación con la cepa II3BR (Figura 23-C), no se observó una diferencia significativa en su crecimiento a diferentes concentraciones de calcio ($p > 0.05$); por lo tanto, una mayor concentración de Ca^{2+} no favoreció el crecimiento en medio LN. A las 6 horas de incubación, el crecimiento en medio LB fue mayor que su crecimiento en medio LN ($p < 0.05$). Durante su fase exponencial, se observó un mayor crecimiento a una mayor concentración de inóculo ($p < 0.05$).

Con respecto a la cepa II3KR (Figura 23-D), hasta las 20 horas se evidenció mayor crecimiento en medio LN en comparación con su crecimiento en medio LB ($p < 0.05$); además, se observó un mayor crecimiento en medio LN a 400 ppm de Ca^{2+} que en el medio LN a 140 ppm de Ca^{2+} ($p < 0.05$), creciendo más rápido a una mayor concentración de Ca^{2+} . No se observó un crecimiento significativo mayor a 2.5% de inóculo en comparación con 0.5% de inóculo ($p > 0.05$).

Respecto al crecimiento de la cepa II3OR (Figura 23-E) no se observa diferencia significativa entre su crecimiento en medio LB a 2.5% de inóculo y en medio LB a 0.5% de inóculo ($p > 0.05$). Tampoco se encontró diferencia significativa entre su crecimiento en medio LN a 140 ppm y a 400 ppm de Ca^{2+} , por lo que el calcio no favoreció significativamente su crecimiento ($p > 0.05$). A las 30 horas de incubación, se evidencia un mayor crecimiento en medio LN que en medio LB ($p < 0.05$).

En relación con la cepa III4VR (Figura 23-F), no se evidencia diferencia significativa en el crecimiento en medio LN a diferentes concentraciones de calcio, por lo que una mayor concentración de Ca^{2+} no favoreció su crecimiento en medio LN ($p > 0.05$). Además, no existe una diferencia significativa en el crecimiento en medio LB con respecto al medio LN ($p > 0.05$). A las 6 horas de incubación, en la fase exponencial, su crecimiento es mayor al utilizar una mayor concentración de inóculo (2.5%) ($p < 0.05$).

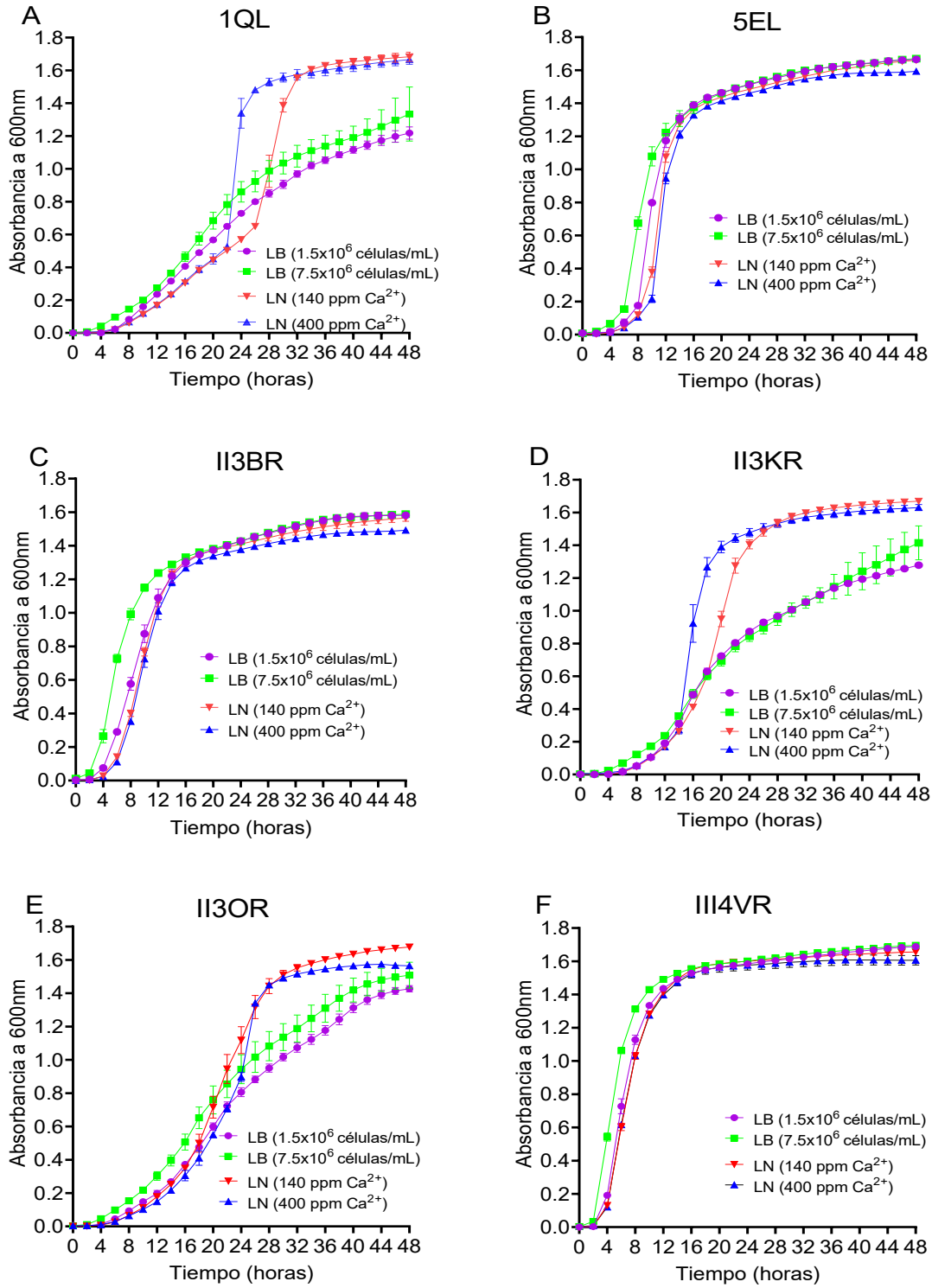


Figura 23. Cinética de crecimiento de las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR en medio LB a diferente concentración de inóculo (0.5-2.5%) y medio LN a diferente concentración de calcio (140-400 ppm).

A partir de las interpretaciones de la Figura 23, se crea la Tabla 5, que resume los resultados obtenidos.

Tabla 5. Condiciones que favorecieron el crecimiento de las cepas ureolíticas en medio LB y medio LN.			
Cepa	Concentración de inóculo en medio LB (células/mL)	Concentración de Ca ²⁺ en medio LN (ppm)	Medio
1QL	7.5x10 ⁶	400*	LN*
5EL	7.5x10 ⁶ *	140*	LB*
II3BR	7.5x10 ⁶ *	140	LB*
II3KR	7.5x10 ⁶	400*	LN*
II3OR	7.5x10 ⁶	140	LN*
III4VR	7.5x10 ⁶ *	140	LB

*Diferencia estadísticamente significativa (p <0.05).

5.7.3. CRECIMIENTO EN MEDIO LN, LN SIN CALCIO Y LN SIN UREA

Respecto al crecimiento de la cepa 1QL (Figura 24-A), a las 38 horas de incubación, se observó mayor crecimiento en el medio LN sin CaCl₂ que en LN sin urea (p < 0.05); lo cual significa que en el medio LN, la presencia de urea favoreció el crecimiento de la cepa más que el CaCl₂. Además, el crecimiento en el medio LN, que contiene urea y calcio, es mayor en comparación al crecimiento en LN sin CaCl₂ y LN sin urea (p < 0.05).

Respecto al crecimiento de la cepa 5EL (Figura 24-B), no existe diferencia significativa entre su crecimiento en medio LN, LN (sin urea) y LN (sin CaCl₂) (p > 0.05); por lo tanto, concordando con la Figura 23-B respecto a la concentración de Ca²⁺, ni el calcio ni la urea favorecen su crecimiento en medio LN.

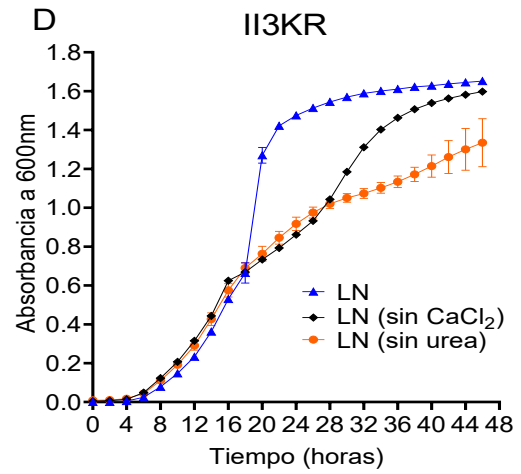
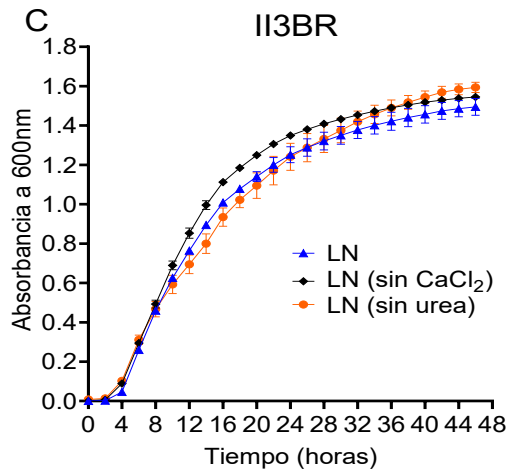
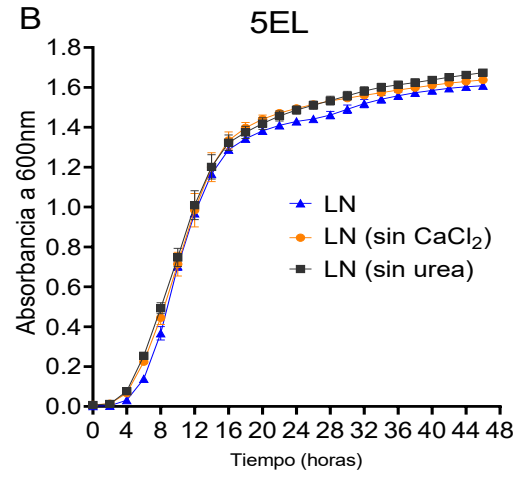
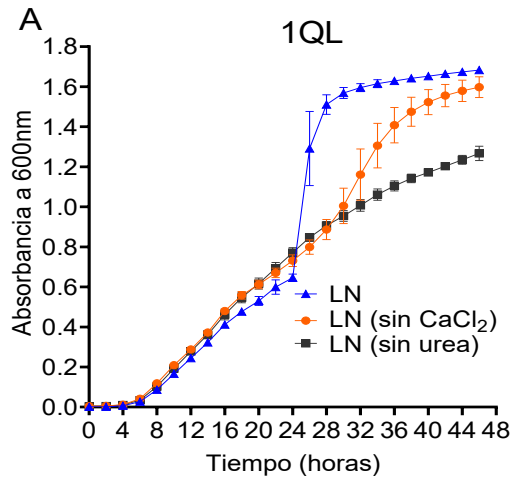
Respecto al crecimiento de la cepa II3BR (Figura 24-C), a las 16 horas de incubación, la cepa muestra un mayor crecimiento en medio LN sin CaCl₂ que en LN sin urea (p < 0.05);

por lo tanto, en medio LN, la urea favorece su crecimiento más que el calcio. A las 18 horas, se observa un mayor crecimiento en medio LN sin CaCl_2 que en medio LN ($p < 0.05$), lo cual significa que el CaCl_2 presente en el medio LN disminuye su crecimiento.

Respecto al crecimiento de la cepa II3KR (Figura 24-D), a las 32 horas creció mejor en medio LN sin CaCl_2 que en medio LN sin urea ($p < 0.05$); por lo tanto, la urea favorece más su crecimiento que el calcio en el medio LN. También se pudo evidenciar un mayor crecimiento en medio LN, el cual contiene calcio y urea, que en el medio LN sin alguno de los dos componentes ($p < 0.05$).

No existe diferencia significativa entre el crecimiento de la cepa II3OR (Figura 24-E) en medio LN sin calcio y LN sin urea, tampoco entre su crecimiento en medio LN sin calcio y medio LN ($p > 0.05$). Se puede observar a las 24 horas un mejor crecimiento en medio LN sin urea lo que puede indicar que la urea presente en el medio LN disminuye su velocidad de crecimiento a diferencia de lo que ocurre con las otras cepas estudiadas, pero esta diferencia no es significativa ($p > 0.05$).

No existe diferencia significativa entre el crecimiento de la cepa III4VR en medio LN, LN (sin urea) y LN (sin CaCl_2) ($p > 0.05$). Estos resultados evidenciados en la Figura 24-F concuerdan con los mostrados en la Figura 23-F, donde se observa que el medio LN no favorece su crecimiento a comparación con el medio LB.



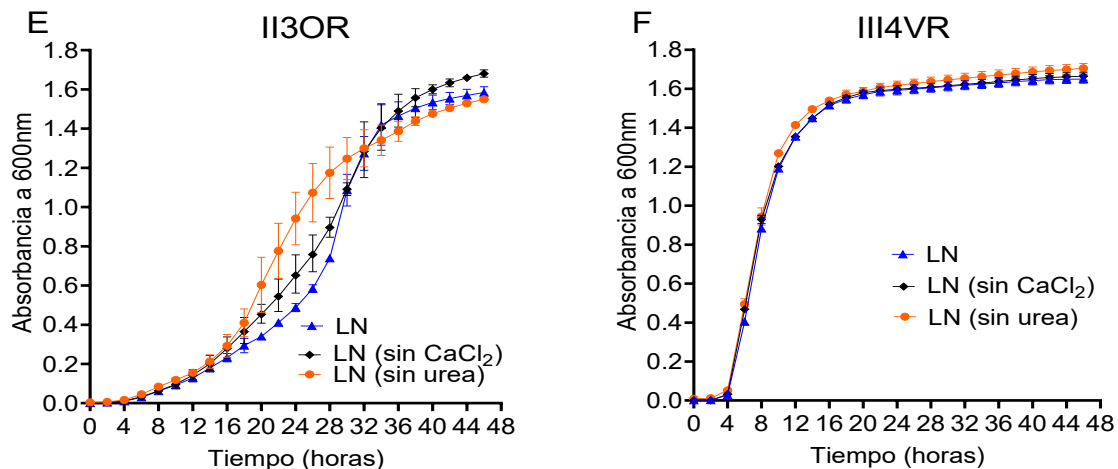


Figura 24. Cinética de crecimiento de las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR en medio LN, LN sin CaCl₂ y LN sin urea.

A partir de las interpretaciones de la Figura 24, se crea la Tabla 6, que muestra la relación entre el componente que más favorece el crecimiento de la cepa en medio LN con relación al medio donde crece más rápido.

Tabla 6. Condiciones que favorecieron el crecimiento de las cepas ureolíticas en medio LN, LN sin CaCl ₂ y LN sin urea.		
Cepa	Componente del medio LN	Medio
1QL	Urea*	LN*
5EL	Crece igual	Crece igual
II3BR	Urea*	LN sin CaCl ₂ *
II3KR	Urea*	LN*
II3OR	CaCl ₂	LN sin urea
III4VR	Crece igual	Crece igual

*Su diferencia es estadísticamente significativa (p < 0.05).

5.8. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

Los resultados mostraron que las cepas 1QL, 5EL, II3KR y II3OR son fuertes formadoras de biopelícula; por el contrario, las cepas II3BR y III4VR no mostraron adherencia a la pared del pocillo de la microplaca hasta las 72 horas (Figura 25 y Tabla 7). Esto se confirmó a partir de los valores de absorbancia obtenidos de las lecturas a las 48 horas, tiempo en el que se evidenció la mayor formación de biopelícula por parte de las cepas estudiadas; como control negativo se usó la cepa *S. aureus* ATCC 12600 por ser una cepa sin capacidad de sintetizar biopelículas y como control positivo a la cepa *E. coli* ATCC 25922.

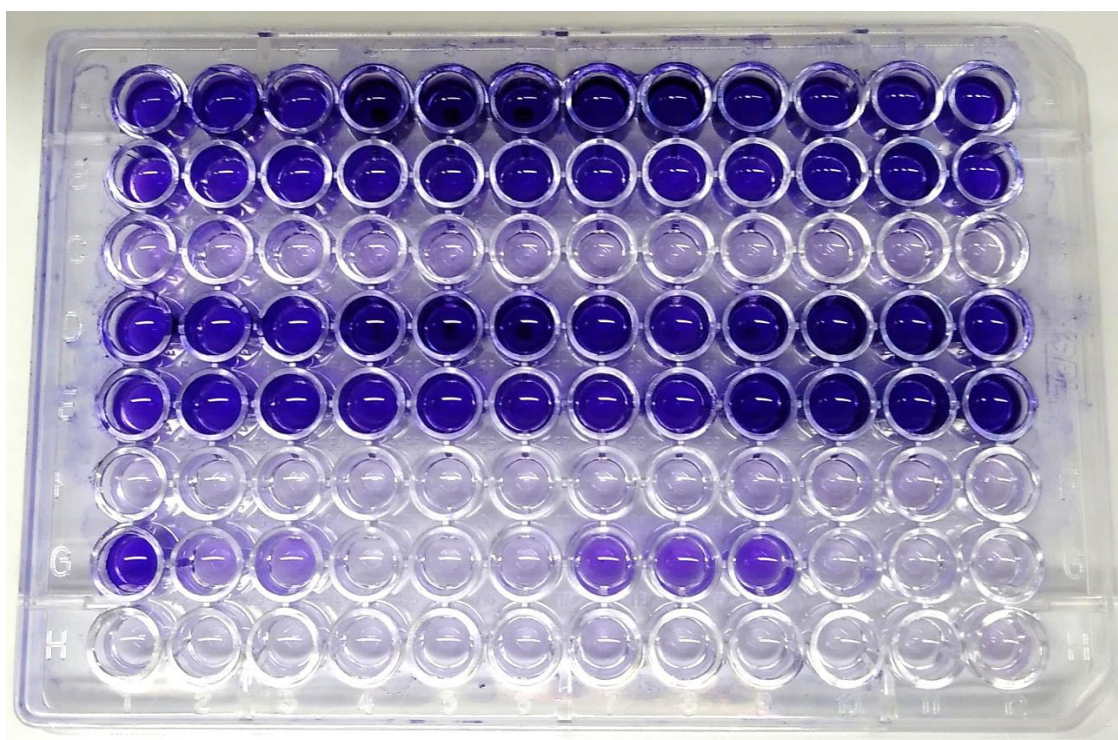
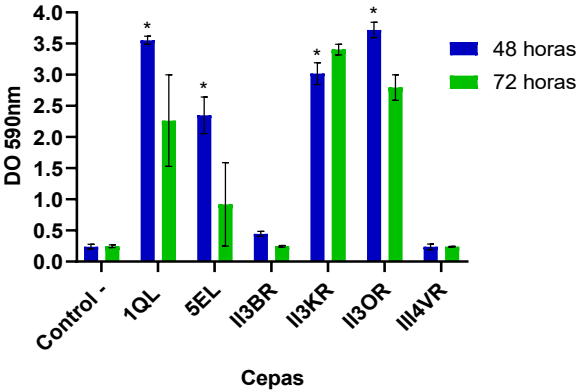


Figura 25. Biopelícula en microplaca teñida con cristal violeta. Las filas A-F fueron inoculadas con las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR, respectivamente. La columna 1-3, 4-6, 7-9 y 10-12, contiene los medios que fueron previamente inoculados que son LB, LN, LN sin CaCl₂ y LN sin urea, respectivamente. La fila G1-3 y G7-9 contienen al control positivo (*Escherichia coli* ATCC 25922) y la fila G4-6 y G10-12 al control negativo (*Staphylococcus aureus* ATCC 12600) inoculados en LB (G1-6) Y LN (G7-12). La fila H contiene a los medios sin inocular (blancos), la prueba se realizó por triplicado.

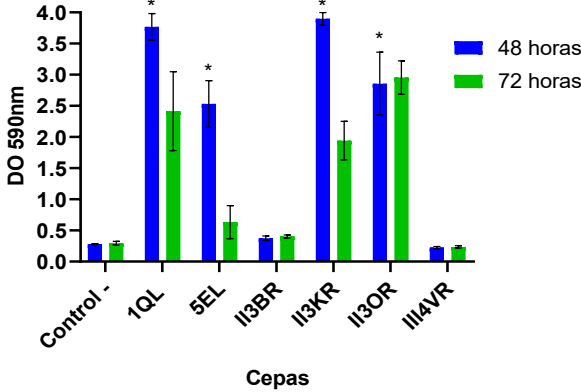
Cepa	LB	LN	LN sin CaCl ₂	LN sin urea
1QL	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
5EL	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
II3BR	No productora	No productora	No productora	No productora
II3KR	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
II3OR	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
III4VR	No productora	No productora	No productora	No productora

Es importante resaltar que fue comparada la DO de los aislados con el control negativo y se consideró formadora de biopelícula cuando la absorbancia fue superior a 0.4. En cuanto a la comparación del comportamiento, la mayoría de las cepas disminuyeron la biomasa de las 48 a las 72 horas, a excepción de la cepa II3KR en medio LB (Figura 26-A). Las diferencias significativas que se muestran en la siguiente gráfica corresponden a las cepas 1QL, 5EL, II3KR y II3OR respecto al control negativo ($p < 0.05$) a las 48 horas.

A Formación de biopelícula en medio LB



B Formación de biopelícula en medio LN



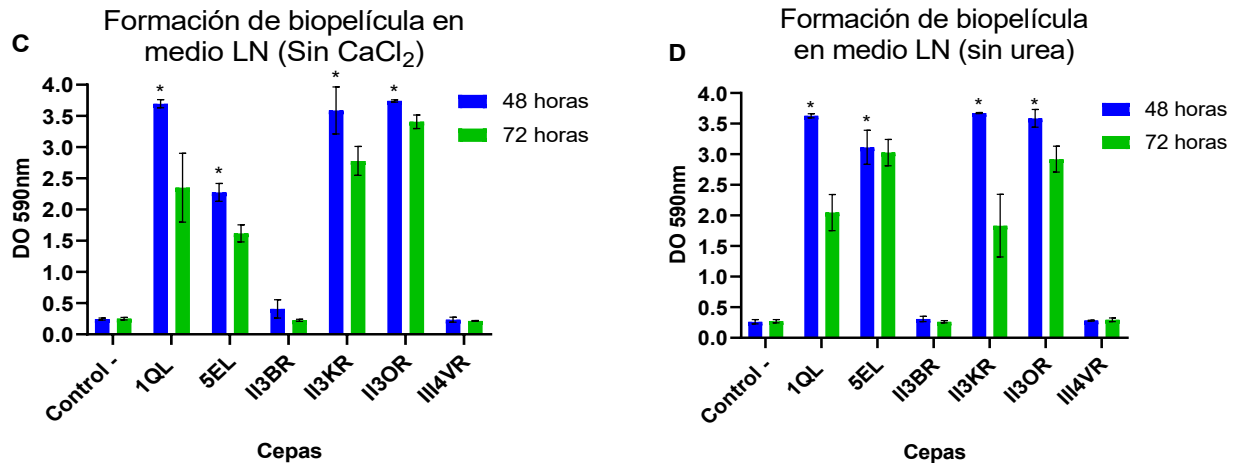
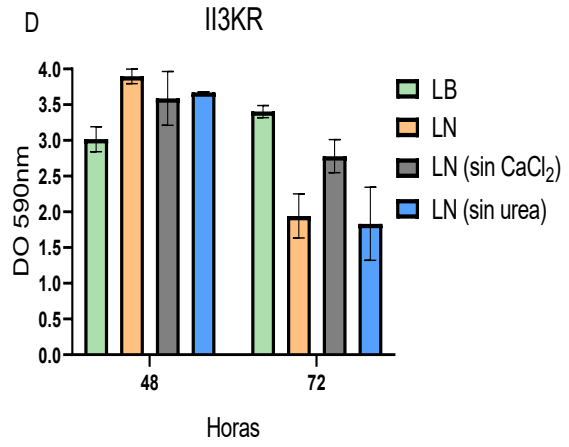
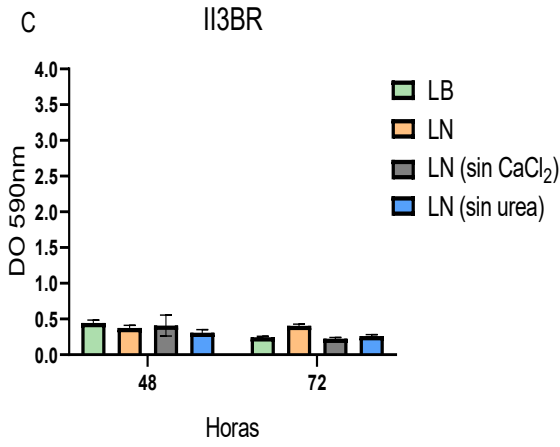
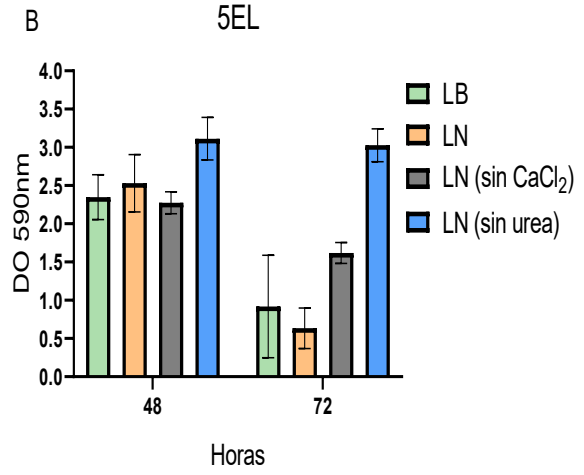
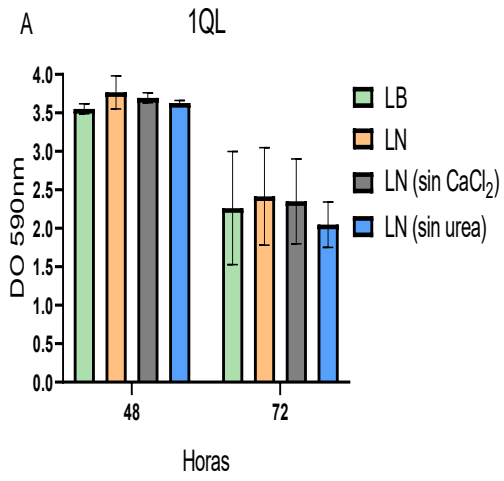


Figura 26. Formación de la biopelícula a 48 y 72 horas de las cepas 1QL, 5EL, II3BR, II3KR, II3OR y III4VR utilizando la cepa *S. aureus* ATCC 12600 como control negativo. Los medios utilizados fueron (A) LB, (B) LN, (C) LN sin calcio y (D) LN sin urea. Las barras representan ± 1 desviación estándar. Los asteriscos diferencias significativas entre las cepas y el control, para las 48 horas de incubación ($p < 0.05$).

Respecto al comportamiento de cada cepa en diferentes medios (Figura 27), la cepa 1QL no evidencia diferencia significativa en la formación de biopelícula entre los diferentes medios probados ($p > 0.05$). En el caso de la cepa 5EL, a las 48 y 72 horas existe una mayor producción de biopelícula en el medio LN (sin urea) que en el medio LB y en el medio LN (sin CaCl₂) ($p < 0.05$). Para la cepa II3BR, a las 48 horas, no se evidencia diferencia significativa en la formación de biopelícula entre los diferentes medios ($p < 0.05$). En cuanto a la cepa II3KR, a las 48 horas hay una mayor formación de biopelícula en medio LN y LN (sin urea) que en el medio LB ($p < 0.05$), cosa que cambia a las 72 horas, donde hay una mayor formación de biopelícula en el medio LB con respecto a los demás medios probados. En el caso de la cepa II3OR, a las 48 horas, hay diferencia significativa en la formación de biopelícula entre los medios LB y LN, entre el LN y LN (sin CaCl₂) y entre el LN y LN (sin urea) ($p < 0.05$). Para la cepa III4VR, no existe diferencia significativa en la formación de biopelícula entre los diferentes medios ($p > 0.05$).



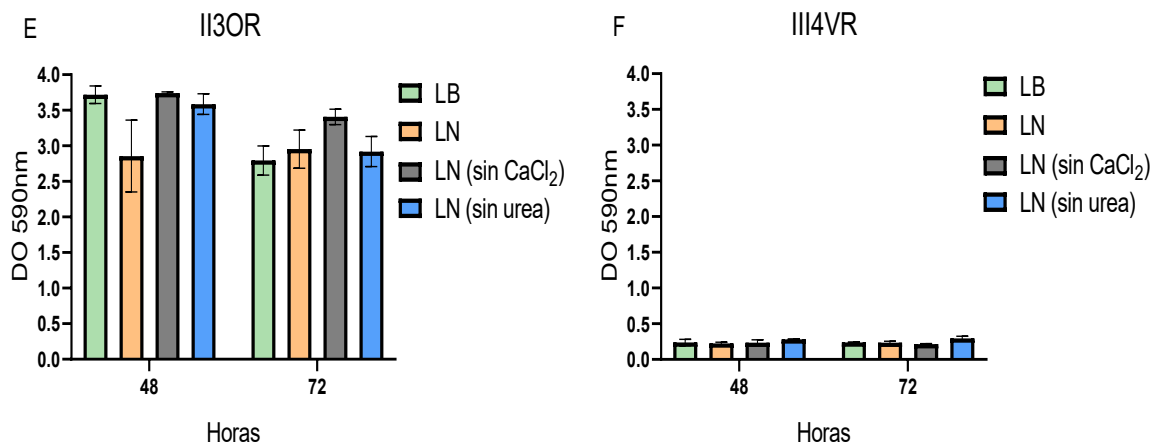


Figura 27. Formación de biopelícula para las cepas (A)1QL, (B)5EL, (C)II3BR, (D)II3KR, (E)II3OR y (F) III4VR a las 48 y 72 horas de incubación.

VI. DISCUSIÓN

Con el objetivo de abordar la problemática de la remoción de calcio en aguas de alta dureza, esta investigación se enfocó en caracterizar, seleccionar y evaluar cepas bacterianas halotolerantes del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa (RVSPV) con el potencial de mitigar la concentración de Ca^{2+} . Este es el primer estudio realizado en Perú sobre la remoción biológica del Ca^{2+} presente en el agua, por biomineralización, mediante el uso de bacterias halotolerantes heterótrofas provenientes de muestras de aguas superficiales de las lagunas del RVSPV. Hay trabajos, realizados en el Perú, que mencionan también la relación entre la biomineralización bacteriana y la precipitación de calcio mediante el uso de consorcios bacterianos, aislados de suelos arcillosos para la fabricación de piezas de concreto no estructurado, mejorando sus propiedades mecánicas de resistencia a la compresión (García Avelino, 2021). En ese estudio se evaluó la actividad ureolítica de todas sus cepas para seleccionar a las que precipitaban carbonato de calcio, siendo el 25% (n=6) de las cepas ureasa positivas, resultado semejante al porcentaje obtenido en este trabajo

(23%); siendo de sus cepas, 8 bacilos y 1 coco Gram positivos, diferente a lo encontrado en esta investigación donde todas las cepas son cocos Gram positivos, todas las cepas seleccionadas hidrolizaban la urea en menos de 24 horas. Las cepas fueron aisladas de cuerpos de agua, las cuales, como se demostró en otras investigaciones (Bayoumi *et al.*, 2007), son las que tienen mejor potencial de desalinización debido a que están mejor adaptadas al entorno acuoso.

6.1. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS

En relación a la tolerancia a diversas concentraciones de NaCl, la mayoría de las cepas de estudio (n=53) crecieron en el rango de 0-10% de esta sal, coincidiendo con lo obtenido por Paredes Contreras (2022). En cambio, menos cepas de estudio crecieron hasta el 20% de NaCl y en los rangos inferiores de salinidad. Según Kushner (1978, 1985) las cepas halotolerantes que crecen a una salinidad superior al 15% de NaCl son considerados halotolerantes extremos; por lo tanto, si crecen en un rango de 0-10% de NaCl estos son considerados halotolerantes moderados, por lo que se puede decir que en las muestras de agua provenientes del RVSPV predominan bacterias halotolerantes moderadas. Todas las cepas ureasa positivas (n= 6) crecían a un rango de salinidad del 0-20% por lo que son consideradas halotolerantes extremas, respecto a sus características culturales, el 50% de estas cepas mostraron coloración cultural desde los 4 días de incubación en medio SG y en medio LB, probablemente debido a la formación de pigmentos carotenoides (amarillos, rojos, y anaranjados). Esta característica, según Müller & Köcher (2011), postula que la síntesis de pigmentos son un mecanismo de adaptación contra el estrés en ambientes salinos. Según Armstrong (1997) y Mohana *et al.* (2013) los pigmentos carotenoides brindan protección al daño foto-oxidativo. Es importante señalar, que el registro de la coloración de las colonias se realizó bajo las mismas condiciones de crecimiento en medio LB (0.5% NaCl), pero cuando se sembró la misma cepa en medio SG bajo diferentes concentraciones

de NaCl, se observó una clara variación en el color, ya que las colonias perdían su pigmentación naranja conforme crecían en medio de cultivo con concentración de NaCl entre el 10-20%. Esto es debido al estrés al que las cepas eran sometidas conforme aumentaba la concentración de NaCl, resultados similares fueron encontrados por otros autores para la producción de pigmentos por cepas halotolerantes, viéndose que estas perdían su capacidad de formar pigmentos carotenoides cuando la concentración de sal excedía el 15% de NaCl, caso contrario a lo que pasa con una cepa halófila estricta donde su mayor producción de pigmentos ocurre cuando la concentración de NaCl es mayor (Khanafari *et al.*, 2010), pero también se vio que la actividad eliminadora de radicales es mayor en los pigmentos producidos por las bacterias halotolerantes (Subramanian y Gurunathan, 2020).

Las cepas ureasa positivas seleccionadas para la prueba de remoción de Ca^{2+} son cocos Gram positivos de crecimiento en racimo, catalasa positivas, con alto rango de halotolerancia al NaCl (20%), no productoras de gas en el metabolismo de los azúcares como se puede observar en el medio TSI. Estos resultados indican que las cepas pueden pertenecer al género *Staphylococcus* o *Micrococcus* según lo mencionado por Cervantes García *et al.* (2014), los cuales son géneros ampliamente conocidos por su halotolerancia, microscópicamente son muy similares pero filogenéticamente no están relacionadas entre sí (McSweeney y McNamara, 2022). Si nos basamos en la descripción general de ambos géneros, la reacción oxidasa c negativa y fermentación del manitol hacen suponer que podrían no ser *Micrococcus* spp. debido a que es considerado manitol negativo y oxidasa c positivo; sin embargo, hay excepciones (Batt, Tortorello, 2014; Hayaloglu, 2016), existen cepas del género *Micrococcus* que son oxidasa c negativas y manitol positivas (Mohana *et al.*, 2013; Munawar *et al.*, 2021). El metabolismo aerobio estricto, debido a la falta de crecimiento en el fondo del tubo del medio TSI, LIA y MIO apuntan a que probablemente

pertenezcan al género *Micrococcus*, el cual actualmente contiene 17 especies (Batt y Tortorello, 2014; Public Health England (PHE), 2019). En este género, se encuentran especies que pueden ser débilmente positivas a la prueba de la citocromo c oxidasa o negativa a esta (Boswell *et al.*, 1972); inmóviles o raramente móviles, gelatinasa positiva o negativa, y tienen un metabolismo respiratorio con poca o nula producción de ácidos a partir de los carbohidratos (Mohana *et al.*, 2013; Public Health England (PHE), 2019), lo cual coincide con lo descrito para las cepas de estudio, las cuales son citocromo c oxidasa negativas, inmóviles, gelatinasa negativas (excepto para la cepa III4VR) y de metabolismo aerobio sin producción de gas. Este género es raramente vinculado a enfermedades clínicas (Schlegel y Zaborosch, 1993; Public Health England (PHE), 2019) siendo solo 2 especies vinculadas a infecciones oportunistas en el ser humano; por lo cual, su utilización en la desalinización de aguas duras tiene bajas posibilidades de representar un peligro para la salud pública (Smith *et al.*, 1999; Miltiadous y Elisaf, 2011). Un análisis molecular despejaría dudas al respecto.

6.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CALCIO

Con relación a las cepas ureasa negativas, algunas de estas han podido remover gran porcentaje de calcio soluble en medio LB suplementado con 140 ppm de Ca^{2+} , aunque demoraron más tiempo en conseguirlo en comparación a las cepas ureasa positivas. Las cepas I2QR, II2SR, III2LR y III3FFR, no poseían actividad ureasa; sin embargo, han podido remover el calcio soluble del medio llegando a tener una tasa de remoción promedio del 12.5% de Ca^{2+} a los 7 días de tratamiento, aunque por debajo del valor promedio obtenido por Bayoumi *et al.* (2007) para sus 3 cepas (BEW 45, BAS 47 y BAW 48) en un medio sin presencia de urea en el mismo tiempo (25%). A los 21 días, la tasa de remoción promedio en las cepas de estudio subió entre el 46.43% y 78.57% (56.25% en promedio), valores que estuvieron por debajo del obtenido en el mismo tiempo por el consorcio formado por las 3

cepas de Bayoumi, el cual fue del 88% (Bayoumi *et al.*, 2007). Sin embargo, comparando los resultados obtenidos por la cepa de estudio II2SR, con mayor tasa de remoción de Ca^{2+} , con las cepas BEW 45, BAS 47 y BAW 48, a los 7 días, la tasa de remoción promedio obtenida por la cepa II2SR y las otras tres cepas fueron cercanos, siendo del 21.43% y 25%, respectivamente. A los 21 días de tratamiento, la tasa de remoción obtenida por la cepa de estudio (II2SR) y las cepas BEW 45, BAS 47 y BAW 48 en consorcio fueron de 78.57% y 88%, respectivamente. Por lo tanto, una combinación de las cepas estudiadas en esta investigación podría dar una tasa de remoción de Ca^{2+} mayor que la realizada por las cepas en separado. Es posible que esta disminución del calcio soluble en agua se deba a la actividad de alguna enzima relacionada a la biomineralización, como la AC, que cataliza la conversión reversible del CO_2 a bicarbonato, lo cual eleva el pH del medio de cultivo (Agudelo R. *et al.*, 2010; Achal y Pan, 2011). Las cepas 5EL y II3KR poseen actividad ureasa, pero incluso en un medio sin urea pueden remover cierta cantidad del calcio soluble, teniendo una tasa de remoción del 23.21 y 30.36% en 21 días de tratamiento; esto probablemente debido a la producción de la enzima AC, ya que en consorcio con la enzima ureasa están relacionadas entre sí y tienen en conjunto un papel importante en la biomineralización (Achal *et al.*, 2009a; Achal *et al.*, 2009b; Achal y Pan, 2011; Cohen-Cyberknoh *et al.*, 2022).

La evaluación de la capacidad de las cepas ureasa positivas para remover iones de calcio en aguas de alta dureza se realizó en el medio LN, compuesto por el medio LB disuelto en agua destilada y suplementado con CaCl_2 y urea (20g/L), el cual también fue utilizado en otras investigaciones (Arias, 2017; Arias *et al.*, 2019). Sin embargo, se podría utilizar aguas residuales (Hammes *et al.*, 2003) o agua de mar (Arias, 2017) suplementado con urea para simular mejor las condiciones de campo y evaluar mejor su efectividad en la desalinización de aguas duras de diversa composición. El extracto de levadura del medio LB es una buena

fuerza de nitrógeno para la desalinización (Bayoumi *et al.*, 2007) por lo que en futuras investigaciones se puede utilizar el medio LB disuelto en agua de mar y suplementado con urea en una concentración mínima óptima a la utilizada (20 g/L). También, para una mayor eficiencia en la remoción de Ca^{2+} , se puede utilizar perlas de alginato o algún otro agente protector que pueda aumentar la viabilidad de las células con respecto a los cambios mecánicos de su entorno (Bachmeier *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2019). La agitación o aireación continua es también otro parámetro a tener en cuenta, ya que se ha observado que influye positivamente en el proceso de desalinización (Arias *et al.*, 2020).

En el contexto de las pruebas de remoción de calcio en presencia de urea en el medio LN, se observó que la eficiencia alcanzó el 100% en un plazo de 7 días de tratamiento cuando se trabajó con una concentración de Ca^{2+} inicial de 140 ppm. Esta eficacia notable podría explicarse en parte debido al volumen relativamente pequeño del medio de cultivo (25 mL) y a la menor concentración de Ca^{2+} inicial a remover (140 ppm). En estas condiciones, las cepas bacterianas pudieron captar oxígeno de manera más eficiente para llevar a cabo la biomineralización del calcio soluble y promover la precipitación de este. En pruebas posteriores, al aumentar la concentración de Ca^{2+} del medio LN a 400 ppm, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en la tasa de remoción de calcio entre las 6 cepas estudiadas y el control negativo (*E. coli* ATCC 25922). Este resultado indica que las cepas seleccionadas demostraron una capacidad notable para remover iones de calcio en condiciones de alta concentración, lo que es particularmente relevante en el contexto de aguas de alta dureza como las encontradas en el agua de mar (Hammes *et al.*, 2003; Arias, 2017; Arias *et al.*, 2019). En el sexto día de tratamiento, se llevó a cabo un análisis estadístico para evaluar las diferencias en la remoción de calcio entre las cepas. Los resultados revelaron una diferencia significativa ($p < 0.05$).

La tasa de remoción promedio observada en las seis cepas, ureasa positivas seleccionadas en este estudio, fue del 92%, con la cepa II3BR destacando con una tasa de remoción del 93.1% a los 14 días de prueba. Es fundamental destacar que, según las directrices de calidad del agua, la concentración de Ca^{2+} entre 25 y 48 ppm se considera agua moderadamente dura (World Health Organization, 2004), y el límite de dureza en el agua potable se sitúa en 64 ppm de Ca^{2+} (Carlos Hernán y Rocio del Pilar, 2007). Por lo tanto, el agua tratada mediante las cepas ureasa positivas, con una concentración de Ca^{2+} final entre 31 y 42 ppm (37 ppm en promedio), cumple con los estándares aceptables para el riego de plantas. Estos resultados son consistentes con la hipótesis sostenida y respaldan la eficacia de estas cepas en la remoción de calcio en aguas de alta dureza. Sin embargo, es importante destacar que, en estudios previos realizados por Arias *et al.* (2019), las cepas *B. subtilis* LN8B y *Halomonas* sp. LM12ABN lograron remover iones de calcio en un rango similar (96-97%) durante 5 días de prueba y al inmovilizar las células de *B. subtilis* LN8B en perlas de alginato, obtuvieron una tasa de remoción del 100% a los 8 días, similar a la tasa encontrada en las células libres. Estos resultados superiores podrían deberse a la agitación continua del medio de cultivo y la optimización de algunos parámetros. En un estudio subsiguiente también realizado por Arias *et al.* (2020), la utilización de un biorreactor de lecho fluido relleno de células inmovilizadas de la cepa *B. subtilis* LN8B, en perlas de alginato, lograron una tasa de remoción del 100% en solo 4 días, esto puede sugerir que la interacción entre los iones y la superficie de las bacterias puede no ser esencial para la precipitación del calcio, bajo la forma de calcita, una observación que también se respalda en esta investigación y en otros trabajos (Kim *et al.*, 2018).

Uno de los efectos notables observados durante el tratamiento con las cepas ureasa positivas en el presente estudio fue el aumento del pH del medio de cultivo, que alcanzó un valor promedio de 9.33. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por

Hammes *et al.* (2003) y Arias *et al.* (2019), donde se explicó que el pH no sube a más de 9.3 debido al efecto amortiguador amoníaco/amonio producido por la actividad de la ureasa. Este hallazgo respalda que el amoníaco generado por la hidrólisis de la urea puede actuar como regulador de pH, en un rango razonable para un efluente, como menciona Hammes *et al.* (2003). Estos resultados refuerzan la viabilidad de la aplicación de estas cepas en procesos para el tratamiento de agua. Si comparamos estos resultados con los obtenidos por Achal *et al.*, (2009a, 2009b) realizado con la cepa halotolerante *Sporosarcina pasteurii*, donde el pH máximo alcanzado fue de 11 a las 30 horas de tratamiento, podemos concluir que el pH óptimo obtenido en este estudio (alrededor de 9.33) es adecuado para procesos de tratamiento de aguas residuales o agua de mar, lo que sugiere que estas cepas podrían ser una alternativa efectiva en dichos tratamientos.

6.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

La cinética de crecimiento de las seis cepas ureasa positivas se evaluó hasta las 48 horas de incubación, y los resultados indicaron que todas ellas demostraron un crecimiento robusto en menos de 24 horas. Sin embargo, cabe resaltar que las cepas III4VR, II3BR y 5EL, exhibieron mayor velocidad de crecimiento y por tanto mayor densidad celular en comparación a las demás. Este resultado fue mayor a los obtenidos por Arias (2017), aunque el medio utilizado por esta autora difiere al utilizado en esta investigación debido a que utilizó agua de mar como diluyente del medio LB. Observación que es de gran utilidad en el contexto de esta investigación, ya que una mayor velocidad de crecimiento, que permite mayor densidad celular, permite la producción de una mayor cantidad de biomasa en un período de tiempo más corto y por tanto mayor producción de ureasa. Achal *et al.* (2009b) mencionan que la síntesis de ureasa y el aumento de pH son necesarios para llevar a cabo la biomineralización del medio en un tiempo más reducido. Es notable que estas cepas, cuya velocidad de crecimiento es casi constante incluso en concentraciones de

hasta 10% de NaCl, demuestran una excelente halotolerancia, lo que sugiere que podrían ser fácilmente utilizadas para el tratamiento de aguas de alta salinidad, como el agua de mar.

Un aspecto interesante de las observaciones realizadas es cómo las cepas muestran diferencias en su preferencia por las condiciones del medio de cultivo. En este sentido, las cepas 5EL, I13BR y I114VR, que muestran un mejor crecimiento en concentraciones más bajas de calcio (140 ppm), también crecen mejor en el medio LB. Por otro lado, las cepas 1QL, I13KR y I13OR, que prosperan a concentraciones más altas de calcio (400 ppm), muestran un crecimiento más rápido en el medio LN. Este hallazgo sugiere que la velocidad de crecimiento de estas cepas parece depender de su preferencia por la urea (como fuente de nitrógeno) o el CaCl_2 , o incluso ninguna de las dos. Para ilustrar esto, las cepas 1QL, I13BR y I13KR parecen beneficiarse de la presencia de urea en el medio, mientras que la cepa I13OR crece mejor en presencia de CaCl_2 en lugar de urea. En contraste, las cepas 5EL y I114VR crecen igual de bien sin importar la presencia o ausencia de CaCl_2 y urea. Estos resultados demuestran que cada tipo de cepa tiene un comportamiento único en respuesta a los parámetros estudiados. Este conocimiento es fundamental para comprender sus condiciones óptimas de crecimiento y podría ser esencial en la selección y aplicación futura de estas cepas.

La capacidad de formar biopelículas es un aspecto relevante en la biomineralización mediada por bacterias, ya que los exopolisacáridos de los cuales están principalmente compuestos las biopelículas actúan como sitios de nucleación para la precipitación de minerales (Senobar Tahaei *et al.*, 2021; Donadu *et al.*, 2022). Observamos que la formación de biopelículas exhibió un comportamiento cíclico de formación y desprendimiento de esta a lo largo de un período de incubación (Kaplan, 2010), ya que la mayoría de las cepas formaron biopelículas más densas a las 48 horas en comparación con las 72 horas. Cuatro

de las seis cepas (1QL, 5EL, II3KR, II3OR) mostraron una diferencia significativa en comparación con el control negativo (*S. aureus* ATCC 12600) para la formación de biopelículas ($p < 0.0001$), lo que las clasifica como fuertemente formadoras de biopelículas. Sin embargo, es importante destacar que los exopolisacáridos encontrados en la biopelícula no parecen estar directamente relacionados con la tasa de remoción de calcio, como se demostró en esta investigación y al contrario de lo que postula Decho (2000) y Cohen-Cyberknoh *et al.* (2022), estos últimos encontraron que la producción de carbonato de calcio, por la ureasa y AC, promueve la formación de biopelículas en *Mycobacterium abscessus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Incluso hubo cepas que no producían biopelículas en las 72 horas de cultivo, como II3BR y III4VR, pero que pudieron remover exitosamente el Ca^{2+} del medio en porcentajes similares o incluso superiores (como la cepa II3BR) en comparación a las cepas fuertemente formadoras de biopelículas. Es relevante mencionar que no se descartó que estas cepas hayan formado biopelículas después de las 72 horas de incubación, ya que no se realizó una tinción de biopelículas en un período más largo, como 14 días. Estos resultados indican que, aunque la capacidad de formar biopelículas pueda ser un aspecto relevante en la biomineralización, la relación puede ser compleja y no necesariamente directa; además, no es el único factor que influye en la eficiencia de la remoción de calcio. Otros mecanismos o factores pueden estar presentes, y se requiere investigaciones adicionales para comprender completamente las interacciones involucradas en este proceso.

VII. CONCLUSIONES

- Las cepas bacterianas halotolerantes y ureolíticas procedentes del Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa tienen la capacidad de remover Ca^{2+} en los medios líquidos usados y pueden ser utilizados en el tratamiento de aguas de alta dureza.
- Las cepas con actividad de remoción de calcio están relacionadas a cocos Gram positivos.
- La capacidad de remoción de calcio no necesariamente está relacionada con la formación de biopelículas.
- La cepa II3BR presenta mayor capacidad de remover calcio en aguas de alta dureza.

VIII. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar investigaciones orientadas a la búsqueda de nuevas especies nativas, de otras regiones, con halotolerancia y halofilia para mejorar la selección.
- ✓ Es posible que existan otros mecanismos bioquímicos, además de la hidrólisis de la urea, por los cuales las cepas halotolerantes pueden remover iones de calcio del medio acuoso, como la actividad de la enzima Anhidrasa Carbónica, por lo que se necesita mayor investigación en el papel que desempeñan.
- ✓ Investigar parámetros de escalamiento a nivel planta prototipo con las mejores cepas analizadas para demostrar su factibilidad y potencial uso en la desalinización parcial del agua.
- ✓ Estudiar a más profundidad sobre los parámetros fisicoquímicos para optimizar la remoción de Ca^{2+} por las cepas en estudio.
- ✓ Es esencial encontrar una combinación de la concentración de urea más eficiente y la más baja posible para la remoción de calcio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFI, Seham *et al.*, 2022. The Association between icaA and icaB Genes, Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococci spp. *Antibiotics*. Vol. 11, número 3, p. 389. DOI 10.3390/antibiotics11030389.

ACHAL, V., MUKHERJEE, A., BASU, P. C. y REDDY, M. Sudhakara, 2009a. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol. 36, número 7, pp. 981-988. DOI 10.1007/s10295-009-0578-z.

ACHAL, V., MUKHERJEE, A., BASU, P. C. y REDDY, M. S., 2009b. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Vol. 36, número 3, pp. 433-438. DOI 10.1007/s10295-008-0514-7.

ACHAL, Varenyam *et al.*, 2015. Biomineralization for sustainable construction – A review of processes and applications. *Earth-Science Reviews*. Vol. 148, pp. 1-17. DOI 10.1016/j.earscirev.2015.05.008.

ACHAL, Varenyam y PAN, Xiangliang, 2011. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*. Vol. 62, número 3, pp. 894-902. DOI 10.1007/s00284-010-9801-4.

AGUDELO R., Carlos D., CORENA-MCLEOD, María y ROBLEDO R., Sara M., 2010. Anhidrasa carbónica de *Plasmodium falciparum*: Un blanco útil para el diseño de medicamentos antimaláricos y compuestos bloqueadores de la transmisión de malaria. *Vitae*. Vol. 17, número 1, pp. 91-100. DOI 10.17533/udea.vitae.4981.

ALAEI SHAHMIRZADI, Mohammad Amin *et al.*, 2018. Significance, evolution and recent advances in adsorption technology, materials and processes for desalination, water softening and salt removal. *Journal of Environmental Management*. Vol. 215, pp. 324-344. DOI 10.1016/j.jenvman.2018.03.040.

ALAN J. WEIN, 2008. *Urología de Campbell-Walsh*. 9na edición. Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-8266-4.

ALCARRAZ CURI, Mario y VÁSQUEZ D., George, 2014. Aislamiento de microorganismos halófilos con potencial biotecnológico y análisis de parámetros fisicoquímicos en suelos costeros. *APORTE SANTIAGUINO*. Vol. 7, p. 09. DOI 10.32911/as.2014.v7.n2.469.

ALHUAY TORRES, David Ignacio, 2011. *Biomineralización: inspiración de la química sintética* [en línea]. Universidad Nacional de Ingeniería. Recuperado a partir de : <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/6045>

AL-THAWADI, Salwa, 2011. Ureolytic Bacteria and Calcium Carbonate Formation as a Mechanism of Strength Enhancement of Sand. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*. Vol. 1, pp. 98-114.

ÁLVAREZ, Manuel Olías, GARCÍA, J. y FERNÁNDEZ, I., 2004. Sobre la utilización de la clasificación de las aguas de riego del U.S. Laboratory Salinity (USLS). En : [en línea]. 2004.

Recuperado a partir de : <https://www.semanticscholar.org/paper/Sobre-la-utilizaci%C3%B3n-de-la-clasificaci%C3%B3n-de-las-de-%C3%81lvarez-Garc%C3%ADa/a3acea47451cc408fb690ad653ed93c603918c76> [accedido 14 septiembre 2023].

ANGUSTIAS RIVADENEYRA, Maria *et al.*, 2006. Carbonate and Phosphate Precipitation by *Chromohalobacter marismortui*. *Geomicrobiology Journal* [en línea]. Vol. 23, número 2. Recuperado a partir de : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490450500533882> [accedido 15 diciembre 2022].

ARIAS, Dayana, 2017. Biomineralization of calcium and magnesium crystals from seawater by halotolerant bacteria isolated from Atacama Salar (Chile). p. 9.

ARIAS, Dayana *et al.*, 2019. Bioprospecting of Ureolytic Bacteria From Laguna Salada for Biomineralization Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 6. DOI 10.3389/fbioe.2018.00209.

ARIAS, Dayana *et al.*, 2020. Partial desalination of seawater for mining processes through a fluidized bed bioreactor filled with immobilized cells of *Bacillus subtilis* LN8B. *Desalination*. Vol. 482, p. 114388. DOI 10.1016/j.desal.2020.114388.

ARIAS, Dayana, CISTERNAS, Luis A. y RIVAS, Mariella, 2017. Biomineralization Mediated by Ureolytic Bacteria Applied to Water Treatment: A Review. *Crystals*. Vol. 7, número 11, p. 345. DOI 10.3390/cryst7110345.

ARISTIZABAL, Mónica Alejandra Rodríguez, MORA, Nubia Carolina Higuera y CORREDOR, Danny Wilson Sanjuanelo, 2019. Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacá, Colombia. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 67, p. 12.

ARMSTRONG, Gregory A., 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A Colorful Tale. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 51, número 1, pp. 629-659. DOI 10.1146/annurev.micro.51.1.629.

BACHMEIER, Keri L *et al.*, 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*. Vol. 93, número 2, pp. 171-181. DOI 10.1016/S0168-1656(01)00393-5.

BATT, Carl A. y TORTORELLO, Mary Lou, 2014. *Encyclopedia of Food Microbiology* [en línea]. Second edition. Elsevier Ltd. ISBN 978-0-12-384733-1. Recuperado a partir de : <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780123847331/encyclopedia-of-food-microbiology> [accedido 21 septiembre 2023]. ISBN: 9780123847331

BAYOUMI, R. *et al.*, 2007. Bacteriological systems as a new approach for desalination of salty water. *Al-Azhar Bulletin of Science*. Vol. 18, número Issue 2-C, pp. 37-58. DOI 10.21608/absb.2007.11633.

BIRBIR, Meral *et al.*, 2004. Enzyme Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 20, número 6, pp. 613-621. DOI 10.1023/B:WIBI.0000043185.06176.b8.

- BORJA, Jackelyn E., ZAVALETA, Amparo I. y IZAGUIRRE, Víctor, 2012. Bacterias halotolerantes productoras de hidrolasas aisladas de aguas termales de Tarapoto. *Ciencia e Investigación*. Vol. 15, número 2, pp. 66-70. DOI 10.15381/ci.v15i2.2659.
- BOSWELL, P. A., BATSTONE, G. F. y MITCHELL, R. G., 1972. The Oxidase Reaction In The Classification Of The Micrococcaceae. *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 5, número 2, pp. 267-269. DOI 10.1099/00222615-5-2-267.
- BURNE, R. A. y CHEN, Y. Y., 2000. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*. Vol. 2, número 5, pp. 533-542. DOI 10.1016/s1286-4579(00)00312-9.
- CARDINALI-REZENDE, Juliana *et al.*, 2016. Draft Genome Sequence of Halomonas sp. HG01, a Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Strain Isolated from Peru. *Genome Announcements*. Vol. 4, número 1, pp. e01598-15. DOI 10.1128/genomeA.01598-15.
- CARLOS HERNÁN, Rodríguez M. y ROCIO DEL PILAR, Bojaca B., 2007. *Dureza Total en Agua con EDTA por Volumetría*. . IDEAM.
- CARTER, Eric L. *et al.*, 2009. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*. Vol. 1, número 3, p. 207. DOI 10.1039/b903311d.
- CASTRO, S., LOPEZ-VALDIVIESO, A. y LASKOWSKI, J. S., 2016. Review of the flotation of molybdenite. Part I: Surface properties and floatability. *International Journal of Mineral Processing*. Vol. 148, pp. 48-58. DOI 10.1016/j.minpro.2016.01.003.
- CDC - UNALM, 1996. *Propuesta para la designación de cuatro nuevos Sitios Ramsar*. .
- CERVANTES GARCÍA, Estrella, GARCÍA GONZÁLEZ, Rafael y SALAZAR SCHETTINO, Paz María, 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. Vol. 61, número 1, pp. 28-40.
- COFFEY, Barbara M. y ANDERSON, Gregory G., 2014. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. En : FILLOUX, Alain y RAMOS, Juan-Luis (eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols*, pp. 631-641. New York, NY : Springer New York. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-0472-3. DOI 10.1007/978-1-4939-0473-0_48.
- COHEN-CYMBERKNOH, Malena *et al.*, 2022. Calcium carbonate mineralization is essential for biofilm formation and lung colonization. *iScience*. Vol. 25, número 5, p. 104234. DOI 10.1016/j.isci.2022.104234.
- DAOUD, Lobna y BEN ALI, Mamdouh, 2020. Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. En : *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, pp. 51-64. Elsevier. ISBN 978-0-12-818322-9. DOI 10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8.
- DECHO, Alan W, 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*. Vol. 20, número 10, pp. 1257-1273. DOI 10.1016/S0278-4343(00)00022-4.
- DEJONG, Jason T. *et al.*, 2010. Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*. Vol. 36, número 2, pp. 197-210. DOI 10.1016/j.ecoleng.2008.12.029.

DÍAZ SOLANO, Braulio Napoleón, 2012. *Estudio de las Mixobacterias en suelos de Lima*. Lima-Perú : Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

DICKERSON, Richard E., 1992. *Principios de química*. 3ra edición. España : Reverte. ISBN 978-84-291-7175-4. Google-Books-ID: vVt6frGy9mgC

DONADU, Matthew Gavino *et al.*, 2022. No Correlation between Biofilm-Forming Capacity and Antibiotic Resistance in Environmental *Staphylococcus* spp.: In Vitro Results. *Pathogens*. Vol. 11, número 4, p. 471. DOI 10.3390/pathogens11040471.

DUSSAULT, H. P., 1955. An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*. Vol. 70, número 4, pp. 484-485.

EHRlich, Henry L., 1996. How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*. Vol. 132, número 1, pp. 5-9. DOI 10.1016/S0009-2541(96)00035-6.

EL COMERCIO, 2022. Pantanos de Villa: Sernanp comenzó trabajos de instalación de cerco perimétrico para conservar humedal. *El Comercio* [en línea]. Lima, 10 febrero 2022. Recuperado a partir de : <https://elcomercio.pe/lima/sucesos/pantanos-de-villa-sernanp-comenzo-trabajos-de-instalacion-de-cerco-perimetrico-para-conservar-humedal-video-chorrillos-rmmn-noticia/> [accedido 31 julio 2023].

EYEWITNESS, D. K., 2023. *DK Eyewitness Peru*. Penguin. ISBN 978-0-7440-8315-6.

FLORES, Mónica L. *et al.*, 2010. Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*. Vol. 13, número 1, pp. 42-46. DOI 10.15381/ci.v13i1.3224.

FLORES VÁSQUEZ, Anasilvia-Del-Pilar, IDROGO, Enrique-III y CARREÑO FARFÁN, Carmen Rosa, 2018. Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA) en microorganismos halófilos aislados de salinas. *Revista Peruana de Biología*. Vol. 25, número 2, pp. 153-160. DOI 10.15381/rpb.v25i2.14249.

FLORES-FERNÁNDEZ, Mónica L., ZAVALETA, Amparo I. y CHÁVEZ-HIDALGO, Elizabeth L., 2010. Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana - San Martín. *Ciencia e Investigación*. Vol. 13, número 2, pp. 88-92. DOI 10.15381/ci.v13i2.3232.

FRÍAS-ORDOÑEZ, Juan y REGINO, William, 2017. Practical issues in diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection: a narrative review. *Revista de gastroenterología del Perú: organo oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú*. Vol. 37, pp. 246-53.

GALVÍN, Rafael Marín, 2012. *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos: Tratamiento y control de calidad de aguas*. 2da edición. España : Diaz de Santos.

GAN, Xinyu *et al.*, 2016. Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. *Desalination*. Vol. 400, pp. 1-6. DOI 10.1016/j.desal.2016.09.012.

GARCÍA AVELINO, Pilar Amalia, 2021. *Evaluación de la capacidad de biomineralización de un consorcio bacteriano aislado de suelos arcillosos* [en línea]. Maestría . Perú : Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado a partir de :

https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/16781/Garc%C3%ADa_a_p.pdf?sequence=2&isAllowed=y

GIBBONS, N.E., 1969. Chapter VIII Isolation, Growth and Requirements of Halophilic Bacteria. En : *Methods in Microbiology*, pp. 169-183. Elsevier. ISBN 978-0-12-521543-5. DOI 10.1016/S0580-9517(08)70507-5.

GILCHRIST, L. *et al.*, 2005. *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada* [en línea]. México. Recuperado a partir de : <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/1272> [accedido 15 agosto 2023].

GONZÁLEZ, Margarita Amado *et al.*, 2015. Censo de ETAPS españolas: análisis de problemáticas, líneas de tratamiento y costes de explotación. En : *XXXIII Jornadas Técnicas de AEAS, 2015*, p. 3 [en línea]. Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento. 2015. Recuperado a partir de : <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7177831> [accedido 20 marzo 2022].

GREGERSEN, T., 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. Vol. 5, número 2, pp. 123-127. DOI 10.1007/BF00498806.

GUDE, Veera Ganeswar, 2016. Desalination and sustainability – An appraisal and current perspective. *Water Research*. Vol. 89, pp. 87-106. DOI 10.1016/j.watres.2015.11.012.

GUZMÁN, César *et al.*, 2017. Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*. Vol. 8, número 2, pp. 109-118. DOI 10.17268/sci.agropecu.2017.02.03.

HABETS, Leo H. A. y KNELISSEN, Heins J., 1997. In line biological water regeneration in a zero discharge recycle paper mill. *Water Science and Technology*. Vol. 35, número 2, pp. 41-48. DOI 10.1016/S0273-1223(96)00913-4.

HAMMES, Frederik *et al.*, 2003. A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater. *Water Research*. Vol. 37, número 3, pp. 699-704. DOI 10.1016/S0043-1354(02)00308-1.

HAMMES, Frederik y VERSTRAETE, Willy, 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Vol. 1, número 1, pp. 3-7. DOI 10.1023/A:1015135629155.

HAYALOGLU, A. A., 2016. Cheese: Microbiology of Cheese. En : *Reference Module in Food Science*. Elsevier. ISBN 978-0-08-100596-5. DOI 10.1016/B978-0-08-100596-5.00675-2.

HIMEDIA, 2019. *Luria Bertani Broth, Miller (Miller Luria Bertani Broth)* [en línea]. Recuperado a partir de : <https://www.himedialabs.com/media/TD/M1245.pdf>

HORSTMANN, Angel García, 2021. Estudio de microorganismos halófilos moderados productores de exopolisacáridos pertenecientes a salinas de interior en Castilla-La Mancha. *Universidad Autónoma de Madrid*. Recuperado a partir de : http://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/699720/garcia_horstmann_angel.pdf?sequence=1

IDEAS, 2005. *Una mirada andina de Lima*. 1. Zeigar. ISBN 978-9972-2727-0-7. Google-Books-ID: G9p9AAAAMAAJ

KAPLAN, J.B., 2010. Biofilm Dispersal. *Journal of Dental Research*. Vol. 89, número 3, pp. 205-218. DOI 10.1177/0022034509359403.

KHANAFARI, A, KHAVARINEJAD, D y MASHINCHIAN, A, 2010. Solar salt lake as natural environmental source for extraction halophilic pigments. *Iranian Journal of Microbiology*. Vol. 2, número 2, pp. 103-109.

KIM, Gunjo, KIM, Janghwan y YOUN, Heejung, 2018. Effect of Temperature, pH, and Reaction Duration on Microbially Induced Calcite Precipitation. *Applied Sciences*. Vol. 8, número 8, p. 1277. DOI 10.3390/app8081277.

KUSHNER, D. J., 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. *Microbial life in extreme environments*. pp. 317-368.

KUSHNER, D. J., 1985. The Halobacteriaceae. *The :bacteria: a treatise on structure and function*. Vol. VIII, número 171-214.

LARSEN, H., 1962. Halophilism. *The Bacteria*. Vol. IV, pp. 297-342.

LEÓN, Blanca, ECHEVERRÍA, Asunción y YOUNG, Kenneth, 1995. La Flora Vasculare de los Pantanos de Villa, Lima, Perú: Adiciones y guía para las especies comunes. *Publicaciones del Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Vol. 38, pp. 1-39.

LEYTON, Arely *et al.*, 2015. Actividad inhibitoria del sobrenadante de la bacteria Antártica *Pseudomonas* sp. M19B en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* 19749. *Revista de biología marina y oceanografía*. Vol. 50, número 2, pp. 375-381. DOI 10.4067/S0718-19572015000300016.

LITZ, Chris y TAYLOR, Richard, 2000. *Wastewater Technology Fact Sheet Chemical Precipitation*. Environmental Protection Agency (EPA). Recuperado a partir de : <http://nepis.epa.gov>

LIZAMA, C. *et al.*, 2001. Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the «Salar de Atacama», Chile. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 24, número 3, pp. 464-474. DOI 10.1078/0723-2020-00053.

LLOYD, A. B. y SHEAFFE, M. Jeane, 1973. Urease activity in soils. *Springer*. Vol. 39, número 1, pp. 71-80.

LÓPEZ PÉREZ, Sofia, ZEA, Sven y GÓMEZ, Javier, 2019. Evaluación in vitro de la formación de biopelículas de bacterias marinas del Caribe colombiano. *Bulletin of Marine and Coastal Research*. Vol. 48, número 2. DOI 10.25268/bimc.invemar.2019.48.2.767.

MACFADDIN, Jean F., 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ra edición. Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-1572-3. Google-Books-ID: FYWSzy7EjR0C

MAIER, Raina M. et al., 2000. *Environmental Microbiology*. Gulf Professional Publishing. ISBN 978-0-12-497570-5. Google-Books-ID: WmwOXG3ejlYC

MCGEE, David et al., 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* Genes That Modulate Urease Activity. *Journal of bacteriology*. Vol. 181, pp. 2477-84. DOI 10.1128/JB.181.8.2477-2484.1999.

MCLEAN, Robert J. C. et al., 1988. The Ecology and Pathogenicity of Urease-Producing Bacteria in the Urinary Tract. *CRC Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 16, número 1, pp. 37-79. DOI 10.3109/10408418809104467.

MCSWEENEY, Paul L.H. y MCNAMARA, John P., 2022. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [en línea]. 3ra edición. Elsevier. ISBN 978-0-12-818767-8. Recuperado a partir de : <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780128187678/encyclopedia-of-dairy-sciences> [accedido 3 septiembre 2023]. ISBN: 9780128187678

MERZ-PREISS, Martina y RIDING, Robert, 1999. Cyanobacterial tufa calcification in two freshwater streams: ambient environment, chemical thresholds and biological processes. *Sedimentary Geology*. Vol. 126, número 1, pp. 103-124. DOI 10.1016/S0037-0738(99)00035-4.

MILLIPORE, 2018. *44940 Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)* [en línea]. Recuperado a partir de : www.sigmaaldrich.com

MILTIADOUS, George y ELISAF, Moses, 2011. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*. Vol. 5, p. 251. DOI 10.1186/1752-1947-5-251.

MOBLEY, H. L. y HAUSINGER, R. P., 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*. Vol. 53, número 1, pp. 85-108. DOI 10.1128/mr.53.1.85-108.1989.

MOBLEY, Harry L. T., 2001. Urease. En : MOBLEY, Harry LT, MENDZ, George L. y HAZELL, Stuart L. (eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics* [en línea]. Washington (DC) : ASM Press. ISBN 978-1-55581-213-3. Recuperado a partir de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2417/> [accedido 21 octubre 2022].

MOHANA, DevihalliChikkaiah, THIPPESWAMY, Sreerangegowda y ABHISHEK, RayasandraUmesh, 2013. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment*. Vol. 36, número 4, p. 168. DOI 10.4103/0972-0464.142394.

MORA-ALVARADO, Darner A. et al., 2015. Diferencias de dureza del agua y las tasas de longevidad en la península de nicoya y los otros distritos de Guanacaste. *Revista Tecnología en Marcha*. Vol. 28, número 3, p. 3. DOI 10.18845/tm.v28i3.2407.

MORMONTOY, Pamela Elizabeth Canales, HIDALGO, Elizabeth Liz Chávez y PESANTES, Amparo Iris Zavaleta, 2014. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 16, número 2, pp. 150-157. DOI 10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.43763.

MÜLLER, Volker y KÖCHER, Saskia, 2011. Adapting to Changing Salinities: Biochemistry, Genetics, and Regulation in the Moderately Halophilic Bacterium *Halobacillus halophilus*. En : HORIKOSHI, Koki (ed.), *Extremophiles Handbook*, pp. 383-400. Tokyo : Springer Japan. ISBN 978-4-431-53898-1. DOI 10.1007/978-4-431-53898-1_18.

MUNAWAR, Masroor et al., 2021. Antibiotic Susceptibility Profile of Staphylococcus Aureus and Micrococcus Luteus Isolated from Tap Water of Hayatabad Medical Complex and Cantonment General Hospital Peshawar. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. Vol. 25, pp. 1724-1732.

NIKOLENKO, Mykola V. et al., 2020. Synthesis of Calcium Orthophosphates by Chemical Precipitation in Aqueous Solutions: The Effect of the Acidity, Ca/P Molar Ratio, and Temperature on the Phase Composition and Solubility of Precipitates. *Processes*. Vol. 8, número 9, p. 1009. DOI 10.3390/pr8091009.

OMS, 2017. *Guidelines for drinking-water quality: Incorporating the first addendum* [en línea]. 4th edition. ISBN 978-92-4-154995-0. Recuperado a partir de : <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241549950> [accedido 1 marzo 2023].

OREN, Aharon, 2006. Life at High Salt Concentrations. En : DWORKIN, Martin *et al.* (eds.), *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*, pp. 263-282. New York, NY : Springer. ISBN 978-0-387-30742-8. DOI 10.1007/0-387-30742-7_9.

PAREDES CONTRERAS, Beatriz Vivian, 2022. *Influencia de los parámetros ambientales en la comunidad microbiana halofílica presente en el Refugio de Vida Silvestre Los Pantanos de Villa, Perú* [en línea]. Perú : Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado a partir de : <https://hdl.handle.net/20.500.12672/18094>

PÉREZ DAVÓ, Azahara, 2014. *Microorganismos halófilos en ambientes salinos de Andalucía: estudio taxonómico numérico y molecular* [en línea]. <http://purl.org/dc/dcmitype/Text> . Granada-España : Universidad de Granada. Recuperado a partir de : <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=58394> [accedido 22 octubre 2022].

PHILIPS, Jo et al., 2017. Biofilm Formation by Clostridium Ijungdahlii Is Induced by Sodium Chloride Stress: Experimental Evaluation and Transcriptome Analysis. YANG, Shihui (ed.), *PLOS ONE*. Vol. 12, número 1, p. e0170406. DOI 10.1371/journal.pone.0170406.

PUBLIC HEALTH ENGLAND (PHE), 2019. *UK Standards for Microbiology Investigations: Identification of Staphylococcus species, Micrococcus species and Rothia species*. .

PULIDO, Víctor, 2018. Ciento quince años de registros de aves en Pantanos de Villa. *Revista Peruana de Biología*. Vol. 25, número 3, pp. 291-306. DOI 10.15381/rpb.v25i3.15212.

RAMIREZ ORTIZ, Indrid Nathalie, 2019. *Aislamiento y caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de Bacillus thuringiensis aisladas de ecoregiones de la costa del Perú con actividad larvicida para Aedes (Stegomyia) aegypti (L)* [en línea]. Tesis de Licenciatura . Perú : Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado a partir de : <https://hdl.handle.net/20.500.12672/10378>

REDDY, M. Sudhakara, 2013. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology* [en línea]. Vol. 4. Recuperado a partir de : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00314> [accedido 20 noviembre 2022].

RIDING, Robert E. y AWRAMIK, Stanley M., 2013. *Microbial Sediments*. Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-662-04036-2. Google-Books-ID: ddd9BwAAQBAJ

RIGALLI, Alfredo y LUPO, Maela, 2021. *Fundamentos Teorico-Practicos para auxiliares de laboratorio* [en línea]. 3ra edición. Argentina : Universidad Nacional de Rosario. ISBN 978-987-868-796-4. Recuperado a partir de : <https://rephip.unr.edu.ar/bitstream/handle/2133/19939/libro3erEdicion.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

RIVADENEYRA, M. A et al., 1998. Biomineralization of carbonates by *Halomonas eurihalina* in solid and liquid media with different salinities: crystal formation sequence. *Research in Microbiology*. Vol. 149, número 4, pp. 277-287. DOI 10.1016/S0923-2508(98)80303-3.

RIVADENEYRA, María Angustias et al., 2004. Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS microbiology ecology*. Vol. 48, número 1, pp. 39-46. DOI 10.1016/j.femsec.2003.12.008.

RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, Teresita De Jesús et al., 2016. Ureasa y níquel en la fisiología de las plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol. XXII, número 2, pp. 69-81. DOI 10.5154/r.rchsh.2014.11.051.

S. CHAN, Lawrence y Y. SHI, Vivian, 2023. *Dermatitis Atópica*. 1ra edición. Italia : Elsevier Health Sciences. ISBN 978-84-13-82538-0. Google-Books-ID: j4u4EAAAQBAJ

SALCEDO, Florencia, 2017. *Formación de biopelícula por Azospirillum brasilense: regulación por óxido nítrico y auxinas, e interacción con Pseudomonas protegens.* . . Argentina : Universidad Nacional de Mar del Plata.

SÁNCHEZ-ROMÁN, Mónica et al., 2007. Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. *FEMS microbiology ecology*. Vol. 61, número 2, pp. 273-284. DOI 10.1111/j.1574-6941.2007.00336.x.

SCHLEGEL, Hans G. y ZABOROSCH, C., 1993. *General Microbiology*. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-43980-0. Google-Books-ID: DrHQtlbiunkC

SCHNEEGURT, Mark, 2012. Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. En : *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*, pp. 35-58. ISBN 978-94-007-5538-3. DOI 10.1007/978-94-007-5539-0_2. journalAbbreviation: Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms

SENOBAR TAHA EI, Seyyed Askhan et al., 2021. Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in Staphylococcus aureus Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature. *Infection and Drug Resistance*. Vol. 14, pp. 1155-1168. DOI 10.2147/IDR.S303992.

SERNANP, 2006. *Resolución Presidencial N°169-2006-SERNANP.* .

SILVA GARCÍA, Carmen y GARCIA BERMEJO, José, 2004. *Manual Del Técnico Superior de Laboratorio de Analisis Clinicos. Modulo I.e-book*. MAD-Eduforma. ISBN 978-84-665-1374-6. Google-Books-ID: iPU_hoxN144C

SILVA-CASTRO, Gloria Andrea et al., 2013. Carbonate Precipitation of Bacterial Strains Isolated from Sediments and Seawater: Formation Mechanisms. *Geomicrobiology Journal*. Vol. 30, número 9, pp. 840-850. DOI 10.1080/01490451.2013.777492.

SMITH, K.J. et al., 1999. Micrococcus folliculitis in HIV-1 disease. *British Journal of Dermatology*. Vol. 141, número 3, pp. 558-561. DOI 10.1046/j.1365-2133.1999.03060.x.

SOFFIANTINI, Vic, 2013. *A Laboratory Pocket Manual*. Lulu.com. ISBN 978-1-291-42283-2. Google-Books-ID: MAPxBQAAQBAJ

STABNIKOV, Viktor et al., 2013. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 29, número 8, pp. 1453-1460. DOI 10.1007/s11274-013-1309-1.

STANIER, Roger Y., 2005. *Microbiología*. Reverte. ISBN 978-84-291-1868-1.

STOCKS-FISCHER, Shannon, GALINAT, Johnna K. y BANG, Sookie S., 1999. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 31, número 11, pp. 1563-1571. DOI 10.1016/S0038-0717(99)00082-6.

SUBRAMANIAN, Prathiba y GURUNATHAN, Jayaraman, 2020. Differential Production of Pigments by Halophilic Bacteria Under the Effect of Salt and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 190, número 2, pp. 391-409. DOI 10.1007/s12010-019-03107-w.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R. y CASE, Christine L., 2007. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-0740-7. Google-Books-ID: Nxb3iETuwpIC

TSUNEDA, Satoshi et al., 2003. Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 29, número 2, pp. 181-188. DOI 10.1016/S0927-7765(02)00188-1.

VAN LANGERAK, E. P. A., HAMELERS, H. V. M. y LETTINGA, G., 1997. Influent calcium removal by crystallization reusing anaerobic effluent alkalinity. *Water Science and Technology*. Vol. 36, número 6, pp. 341-348. DOI 10.1016/S0273-1223(97)00541-6.

VAN VLIET, Arnoud H. M. et al., 2001. Nickel-Responsive Induction of Urease Expression in *Helicobacter pylori* Is Mediated at the Transcriptional Level. MOORE, R. N. (ed.), *Infection and Immunity*. Vol. 69, número 8, pp. 4891-4897. DOI 10.1128/IAI.69.8.4891-4897.2001.

VANEGAS, Johanna, Santamaría, GONZÁLEZ, Natalia, Comba y MANCILLA, Ximena Carolina, Pérez, 2014. *Manual de Microbiología General: Principios Básicos de Laboratorio*. Editorial Tadeo Lozano. ISBN 978-958-725-153-1. Google-Books-ID: H_dNEAAAQBAJ

VARGAS ROJAS, Ronald et al., 2018. *Handbook for saline soil management*. ISBN 978-92-5-130141-8.

VOGEL, Arthur Israel, JEFFERY, G. H. y VOGEL, 1989. *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 5th ed. Harlow, Essex, England : New York : Longman Scientific & Technical ; Wiley. ISBN 978-0-470-21517-3.

VREELAND, R. H. y MARTIN, E. L., 1980. Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 26, número 7, pp. 746-752. DOI 10.1139/m80-130.

WHIFFIN, Victoria S., VAN PAASSEN, Leon A. y HARKES, Marien P., 2007. Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique. *Geomicrobiology Journal*. Vol. 24, número 5, pp. 417-423. DOI 10.1080/01490450701436505.

WITTHOLZ, Michelle K. et al., 2008. Estimating the cost of desalination plants using a cost database. *Desalination*. Vol. 229, número 1, pp. 10-20. DOI 10.1016/j.desal.2007.07.023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (ed.), 2004. *Guidelines for drinking-water quality*. 3rd ed. Geneva : World Health Organization. ISBN 978-92-4-154638-6.

ZAMORA, Johel Rodríguez, 2009. Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto, (ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre del 2008. . Vol. 9, número 12.

ZHAO, Yanyang et al., 2019. Bio-Precipitation of Calcium and Magnesium Ions through Extracellular and Intracellular Process Induced by *Bacillus Licheniformis* SRB2. *Minerals*. Vol. 9, número 9, p. 526. DOI 10.3390/min9090526.

X. ANEXO

Anexo 1. Composición del medio Sehgal and Gibbons (SG) (Sehgal and Gibbons, 1960).	
Componente	Concentración (g/L)
NaCl	40.0
KCl	2.0
MgSO ₄ × 7H ₂ O	20.0
Extracto de levadura	10.0
Triptona	5.0
Trisodio citrato di hidrato	3.0
Caseína hidrolizada	5.0
El pH fue ajustado a 7.0	

Anexo 2. Composición del medio LB (HIMEDIA 2019).	
Componente	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	5.0
pH de 7.5 ± 0.2	

Anexo 3. Crecimiento de las 26 cepas seleccionadas a diferentes rangos de salinidad.

N°	Cepa	Rango de salinidad (% NaCl)					Halotolerancia
		0-4%	0-6%	0-8%	0-10%	0-20%	
1	1ER	-	-	-	Sí	-	Moderada
2	1QL	-	-	-	-	Sí	Extrema
3	1TL	Sí	-	-	-	-	Ligera
4	5EL	-	-	-	-	Sí	Extrema
5	7JL	-	-	-	Sí	-	Moderada
6	I2QR	-	-	-	Sí	-	Moderada
7	II1ER	-	-	Sí	-	-	Moderada
8	II2SR	-	-	Sí	-	-	Moderada
9	II3AAR	-	Sí	-	-	-	Moderada
10	II3BR	-	-	-	-	Sí	Extrema
11	II3KR	-	-	-	-	Sí	Extrema
12	II3OOR	-	-	Sí	-	-	Moderada
13	II3OR	-	-	-	-	Sí	Extrema
14	II6ER	-	-	-	Sí	-	Moderada
15	III2LR	-	-	-	Sí	-	Moderada
16	III3FFR	-	-	-	Sí	-	Moderada
17	III4DDDR	-	-	-	Sí	-	Moderada
18	III4RRR	-	-	-	-	Sí	Extrema
19	III4VR	-	-	-	-	Sí	Extrema
20	III5BBR	-	Sí	-	-	-	Moderada
21	III5WWR	-	-	-	Sí	-	Moderada
22	III6JR	-	-	Sí	-	-	Moderada
23	III7UUR	-	-	-	Sí	-	Moderada
24	IV2YR	-	-	-	-	Sí	Extrema
25	IV4JR	-	-	-	-	Sí	Extrema
26	IV6TR	-	-	-	Sí	-	Moderada
Número total		1	2	4	10	9	
Porcentaje (%)		3,85	7,69	15,38	38,46	34,62	

Anexo 4. Características culturales en medio TSA a las 24 horas de incubación.

Características	1QL	5EL	II3BR	II3KR	II3OR	III4VR
Origen de la cepa	Laguna mayor centro	Laguna Genesis	Laguna sur	Laguna sur	Laguna sur	Laguna refugio
Tiempo de crecimiento	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
Tamaño	1.0 mm	2 mm	1.0 mm	1.0 mm	1.0 mm	3 mm
Color	Crema	blanco cremoso	blanco cremoso	blanco cremoso	blanco cremoso	blanco cremoso
Superficie	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	rugosa
Forma	circular	circular	circular	circular	circular	irregular
Borde	entero	entero	entero	entero	entero	aserrado
Elevación	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa
Luz transmitida	semitraslúcida	semitraslúcida	semitraslúcida	semitraslúcida	semitraslúcida	opaca
Luz reflejada	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante	brillante
Forma microscópica	coco	coco	coco	coco	coco	coco
Motilidad	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
KOH (3%)	-	-	-	-	-	-
Tolerancia al NaCl (%) en SG	0-20	0-20	0-20	0-20	0-20	0-20
	+ Positivo - Negativo					

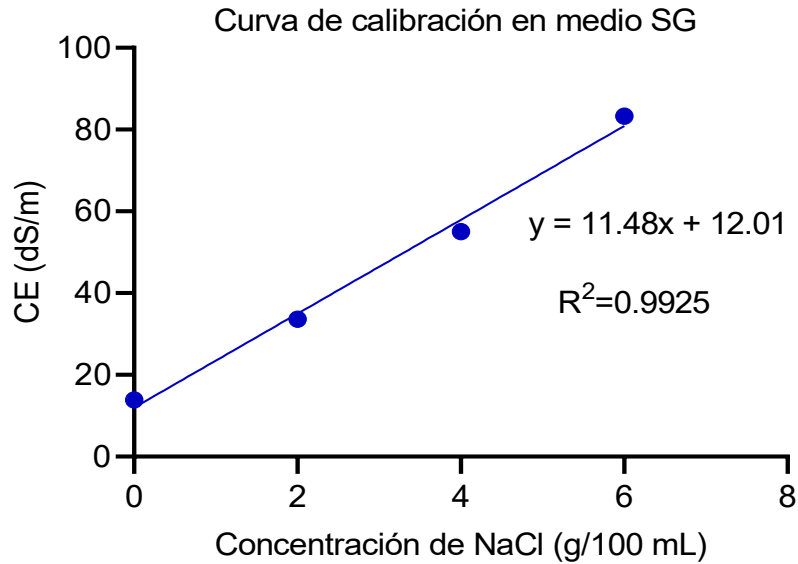
Anexo 5. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las 6 cepas bacterianas ureasa positiva.

Prueba bioquímica	Cepas de estudio					
	1QL	5EL	II3BR	II3KR	II3OR	III4VR
Motilidad	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-	-	-
MIO	K/NC	K/NC	K/NC	K/NC	K/NC	K/NC
Fermentación del Manitol	+	+	+	+	+	+
LIA	A/NC	A/NC	A/NC	A/NC	A/NC	A/NC
Producción de SH ₂	-	-	-	-	-	-
Citrato permeasa	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	-	-	-	-	-	+ (48 h)
Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en TSI (48 horas)	*A/NC Gas -	*A/NC Gas -	*A/NC Gas -	*A/NC Gas -	*A/NC Gas -	*A/NC Gas -
Nitrato reductasa	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis del Tween 80	-	-	-	-	-	-

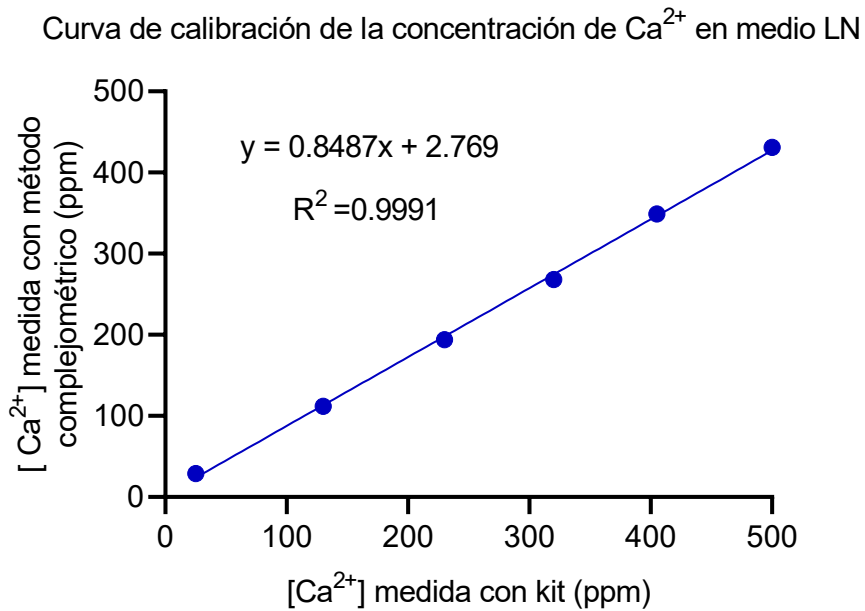
*En medio TSI superficie A (acidez) y fondo NC (no crecimiento), utiliza los azúcares, pero no crece en el ambiente anaerobio.

Anexo 6. Constante específica de crecimiento de las cepas ureasa positivas en medio LB y LN.

Cepa	Constante específica de crecimiento o μ (h ⁻¹)	
	Medio LB	Medio LN
1QL	0.062	0.159
5EL	0.622	0.458
II3BR	1.149	0.773
II3KR	0.272	0.334
II3OR	0.149	0.190
III4VR	2.087	1.249



Anexo 7. Curva de calibración del medio SG a diversas concentraciones de NaCl. La CE tiene una relación directamente proporcional (lineal) con la concentración de NaCl. Los puntos representan el promedio de los triplicados.



Anexo 8. Curva de calibración para la medición de calcio utilizando el método complejométrico, utilizando como referencia un kit comercial.

Agencia de financiamiento

UNMSM; VRIP. Esta investigación fue financiada por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – RR N° 01686-R-20 con código de proyecto B20100851.