



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Caracterización molecular de arqueas halófilas
productoras de carotenoides aisladas de ambientes
hipersalinos peruanos**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Cynthia Giovanna ESQUERRE HUALLPA

ASESOR

Amparo Iris ZVALETA PESANES

Lima, Perú

2013

RESUMEN

Las haloarqueas son microorganismos extremadamente halófilos pertenecientes a la familia *Halobacteriaceae* del dominio *Archaea*. Se han descrito 33 géneros diferentes cuyos miembros son halófilos especializados teniendo toda su maquinaria celular adaptada a salinidades elevadas y con diferentes capacidades metabólicas, siendo productores de carotenoides, biopolímeros, enzimas y bacteriorodopsina. Con el objetivo de aislar y caracterizar haloarqueas productoras de carotenoides de ambientes salinos peruanos, se tomaron muestras de agua y sales de salineras localizadas en Huacho, Lima y Maras, Cusco. Además, se recogieron muestras de los Pantanos de Villa, Lima. Primero, se enriquecieron las muestras con el caldo de cultivo SW al 20 % de NaCl adicionado de extracto de levadura 0,2 % y se incubaron a 37 °C por 5 días. Luego, 50 uL de cada enriquecimiento fueron sembrados por separado en placas con el medio SW con la misma composición del caldo de enriquecimiento pero con agar 2 % e incubados a 37°C por 7 días. Cuarenta y dos aislados purificados fueron distribuidos en 8 grupos (I al VIII) en base a los patrones de restricción obtenidos por la digestión doble de sus genes ribosómicos 16S con las enzimas *Rsa I* y *Hinf I*. El análisis de las secuencias parciales de los genes ribosómicos 16S usando cebadores específicos para el dominio *Archaea* mostraron que las 8 cepas estaban asociadas filogenéticamente con géneros de la familia *Halobacteriaceae*; *Haloferax* (grupo I, 99% de similitud), *Haloarcula* (grupos II al V, 91 a 97 % de similitud), *Halogeometricum* (grupos V y VI, 90 a 93 % de similitud) y *Halorubrum* (grupo VIII, 99 % de similitud). Además, permitió identificar categóricamente a 6 cepas (99 % de similitud); 03 como *Haloarcula* (M01S4A, M02S4A y HE02), la cepa M02S9A como *Haloferax* y HE03 como *Halorubrum*. Por otro lado, las pruebas fenotípicas realizadas revelaron que las 8 cepas presentaban rasgos característicos de las haloarqueas como el elevado requerimiento salino para el crecimiento (NaCl 5 – 15 %) y la susceptibilidad a la novobiocina y a la bacitracina. Además, las cepas de *Haloarcula* fueron capaces de hidrolizar almidón o gelatina; mientras que las cepas de *Haloferax* y *Halorubrum* hidrolizaron almidón. Estas actividades hidrolíticas fueron realizadas en altas concentraciones salinas (NaCl 10-20%); por lo tanto, las haloarqueas nativas caracterizadas o sus enzimas podrían ser usadas en procesos industriales realizados bajo tales condiciones extremas.

Palabras clave: haloarqueas, ambiente salino, carotenoides, genes 16S ribosómicos.

SUMMARY

The haloarchaeas are extremely halophiles microorganisms belonging to the *Halobacteriaceae* family from Archaea dominium. Their members are classified into 33 different genera and they are specialized halophiles having their cellular machineries adapted to high salt concentration with different metabolic capabilities, producing carotenoids, exopolysaccharides, enzymes and bacteriorhodopsine. In order to isolate and characterize carotenoid producer haloarchaeas from Peruvian saline environments using a poliphasic approach, it was taken both water and salts samples from salterns located in Huacho, Lima and Maras, Cusco. Also, the Swamps of Villa, Lima were under study. First, enrichments from salt samples were prepared using SW culture broth with 0,2 % yeast extract for 5 days. Then, 50 ul of each enriched culture were spread into petri plates containing SW medium added with 0,2 % yeast extract and 2 % agar; and incubated at 37 °C during 7 days. Forty two purified strains were chosen and clustered into eight groups (I to VIII) based on the restriction pattern obtained by double digestion of their 16S rRNA genes with *Rsa I* and *Hinf I*. One member of each group was selected to its complete evaluation. The analysis of amplified 16 S rRNA genes partial sequences using *Archaea* dominium specific primers showed that 8 strains were phylogenetically asociated with genera of *Halobacteriaceae* family; *Haloferax* (I group, 99% similarity), *Haloarcula* (II to V groups, 91 – 98 % similarity), *Halogeometricum* (groups V and VI, 90 to 93 % similarity) and *Halorubrum* (group VIII, 99 % similarity). Besides, 6 strains would be categorically identified (99 % similarity); strains M01S4A, M02S4A and HE02 as *Haloarcula*, strain M09S4A as *Haloferax* and strain HE03 as *Halorubrum*. Phenotypic tests revealed that all evaluated strains presented characteristics common with haloarchaeas such as high salt minimum requirement to grow (5 - 15 % NaCl) and susceptibility to novobiocin and bacitracin. Also, all haloarchaea related to *Haloarcula* were able to hydrolyze starch or gelatin; whereas, the ones afiliated to *Haloferax* and *Halorubrum* hydrolyzed starch. All hydrolytic activities were conducted at high salt concentrations (10 – 20 % NaCl); thus, these Peruvian carotenoid producer haloarcaeas or their enzymes could be used in some industrial processes carrying on in such extremely environment.

Keywords: haloarchaeas, saline environment, carotenoids, 16S rRNA genes.