



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASTOLOGÍA**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS
HALÓFILOS DE LAS SALINERAS DE MARAS, CUSCO. JUNIO –
DICIEMBRE 2015”**

TESIS

Para optar por el título profesional de:

**LICENCIADA EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA.**

Presentado por:

**BR. MACO GAMONAL GIULLIANA STEPHANY
BR. RIVERA JULCA GORETY DEL PILAR**

LAMBAYEQUE - PERÚ

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS

“Aislamiento y caracterización de bacterias y hongos halófilos de las Salineras de Maras, Cusco. Junio – Diciembre 2015”

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS PARA OPTAR
POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADA EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA.**

PRESENTADO POR:

BR. Maco Gamonal Giulliana Stephany

BR. Rivera Julca Gorety del Pilar

APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO:

Dra. Gianina Llontop Barandiarán

Presidente

Dra. Elsa Violeta Angulo de Alba

Secretaria

Lic. Julio César Silva Estela

Vocal

Dra. Olga Francia Arana

Patrocinadora

DEDICATORIA

A Dios por estar a mi lado siempre, guiando mis pasos y ayudándome a seguir en el camino.

A mis tíos por sus consejos y por ser un ejemplo para mí. A mis primos y sobrinos por su gran afecto y las tantas alegrías que me regalan a diario. A mis hermanos Luis, Marlon y Erika por su cariño, respeto y confianza. A mi padre, Tito, por sus buenas enseñanzas y su gran optimismo que me inspira a seguir día a día para alcanzar mis metas. A mi madre, Ilda, por estar siempre a mi lado apoyándome sin condiciones, por creer en mí y ser ese impulso que me motiva a seguir adelante a pesar de las adversidades. A una persona muy especial que, aunque ya no esté más conmigo siempre llevo en mi corazón, mi mamá Juana, quien significó muchísimo en mi vida, quien estuvo siempre allí, para darme nada más que amor.

A todos ellos, a cada uno de mis familiares que, de alguna u otra forma contribuyeron a la culminación de mi carrera profesional y por enseñarme el verdadero significado de una familia, por estar siempre conmigo en todo momento de mi vida.

Giulliana Stephany Maco Gamonal

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen María por guiar cada uno de mis pasos durante toda mi vida, porque todo lo que soy y he logrado hasta ahora, ha sido gracias a su bendición.

A mis padres por su esfuerzo y sacrificio para que yo pudiera ver logradas mis metas, por sus constantes consejos para superarme, por el apoyo incondicional, ejemplo, dedicación y entrega que han tenido conmigo, por enseñarme el valor de la educación y el esfuerzo.

Gorety del Pilar Rivera Julca

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a Dios en primer lugar, porque sin Él, este trabajo nunca hubiese sido posible.

A la Dra. Olga Francia Arana, por su asesoría, tiempo, dedicación, apoyo incondicional y por las sugerencias y correcciones a lo largo de la realización de la presente tesis, ya que hizo posible la culminación de la misma.

A la Comunidad de Maras, por brindarnos la facilidad de obtener las muestras para la realización de la presente tesis.

A los Sres miembros del jurado: Dra. Gianina Llontop, Dra. Elsa Angulo y Lic. Julio Silva, por la dedicación e interés mostrado en nuestra investigación.

A nuestros familiares y amigos que han contribuido para hacer posible la realización de esta tesis.

Giulliana Stephany Maco Gamonal y Gorety del Pilar Rivera Julca.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	01
INDICE DE FIGURAS	02
RESUMEN	03
ABSTRACT	04
I. INTRODUCCIÓN.....	05
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	08
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. MATERIAL.....	11
3.1.1. Material biológico.....	11
3.1.2. Población y muestra.....	11
3.1.3. Medios de cultivo.....	11
A. Bacterias halófilas.....	11
B. Hongos halófilos.....	11
3.2. METODOLOGÍA.....	12
3.2.1. Lugar de muestreo.....	12
3.2.2. Toma de muestra.....	13
3.2.3. Enriquecimiento de bacterias halófilas.....	14
3.2.4. Aislamiento de bacterias halófilas.....	15
3.2.5. Identificación de bacterias halófilas.....	15
3.2.6. Aislamiento de hongos halófilos.....	15
3.2.7. Identificación de hongos halófilos.....	16
3.2.8. Análisis estadístico de los datos.....	16
IV. RESULTADOS.....	17
4.1. Descripción de las pozas de las Salineras de Maras-Cusco.....	17
4.2. Caracterización del crecimiento de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.....	19
4.3. Características microscópicas de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.....	21

4.4. Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.....	22
4.5. Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.....	23
4.6. Identificación de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco...	25
4.7. Caracterización de hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.....	28
4.8. Características microscópicas de los hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.....	29
4.9. Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl de los hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.....	30
4.10. Identificación de los hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.....	31
V. DISCUSIÓN.....	33
VI. CONCLUSIONES.....	36
VII. RECOMENDACIONES.....	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
IX. ANEXOS.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°

1.	Características físico – químicas de las pozas de cristalización de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.....	18
2.	Características morfológicas de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.....	19
3.	Características microscópicas de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.....	22
4.	Crecimiento de 24 cepas de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco a diferentes concentraciones de NaCl.....	23
5.	Caracterización bioquímica de las cepas aisladas de las Salinera de Maras. Setiembre 2015.....	24
6.	Identificación de las cepas MR15, MR16, MR19 y MR23 aisladas de las Salinera de Maras comparadas con la especie <i>Bacillus subtilis</i>	25
7.	Identificación de las cepas MR2, MR6, MR11, MR12, MR14 y MR20 aisladas de las Salinera de Maras comparadas con la especie <i>Micrococcus luteus</i>	26
8.	Identificación de las cepas MR5, MR7, MR13, MR17, MR18 y MR22 aisladas de las Salinera de Maras comparadas con la especie <i>Micrococcus roseus</i>	26
9.	Identificación de las cepas MR1, MR3, MR4, MR8, MR9, MR10, MR21 y MR24 aisladas de las Salinera de Maras comparadas con la especie <i>Micrococcus varians</i>	27
10.	Crecimiento de 12 cepas de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco a diferentes concentraciones de NaCl.....	31
11.	Identificación de las cepas de hongos aislados de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°

1.	Ubicación de Maras-Cusco.....	12
2.	Ubicación del manantial que abastece y da origen a las Salineras de Maras.....	13
3.	Toma de muestra de la poza de cristalización de Maras-Cusco (A y B).....	14
4.	Enriquecimiento de bacterias halófilas de las muestras de agua de las pozas de cristalización de Maras (A y B).....	14
5.	Pozas de cristalización de las Salineras de Maras-Cusco (A y B).....	17
6.	Colonias de tres cepas de bacterias aisladas de las Salineras de Maras (A, B y C) observadas al estereoscopio.....	20
7.	Porcentajes de cepas bacterianas agrupadas según sus características morfológicas: color (A), consistencia (B) y elevación (C).....	20
8.	Morfología de tres cepas de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco observadas a 100X (A, B y C).....	21
9.	Colonias de cuatro cepas de hongos (A, B, C y D) aislados de las Salineras de Maras-Cusco. Setiembre 2015.....	28
10.	Porcentaje de hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco agrupados según sus características morfológicas.....	29
11.	Observaciones microscópicas de cuatro cepas de hongos (A, B, C y D) aislados de las Salineras de Maras-Cusco. Setiembre 2015.....	30

RESUMEN

Existen bacterias y hongos denominados halófilos, capaces de crecer en ambientes hipersalinos. Con el objetivo de aislar y caracterizar bacterias y hongos halófilos con perspectivas biotecnológicas, se estudiaron muestras de agua y sedimento de las Salineras de Maras, para lo cual se tomaron las muestras de 30 pozas, cada una fue sometida a enriquecimiento en caldo SW₅ y SW₁₀, suplementado con extracto de levadura al 0.3%, luego de 48 horas de incubación, se procedió a sembrar en agar SW₅ y SW₁₀. Para todos los microorganismos se determinaron: características morfológicas, fisiológicas y capacidad hidrolítica a diversos sustratos.

Para los hongos, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos, el sedimento obtenido se sembró en placas con Agar Sabouraud dextrosa con sales al 5% y con la adición de ácido tartárico al 5% para inhibición de bacterias, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días en aerobiosis. Se evaluó el crecimiento de las colonias características y se seleccionaron de acuerdo a su forma, tamaño, color y consistencia.

Las bacterias identificadas fueron: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*, y *Micrococcus varians* y los hongos se identificaron como de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

ABSTRACT

There are bacteria and fungi called halophiles, capable of growing in hypersaline environments. In order to isolate and characterize halophilic bacteria and fungi with biotechnological perspectives, samples of water and sediment from the Salineras de Maras were studied, for which samples were taken from 30 wells, each one was subjected to enrichment in SW₅ and SW₁₀ broth, supplemented with 0.3% yeast extract, after 48 hours of incubation, we proceeded to sow on SW₅ and SW₁₀ agar. For all microorganisms were determined: morphological, physiological and hydrolytic capacity to various substrates.

For the fungi, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes, the sediment obtained was seeded on plates with Sabouraud dextrose agar with 5% salts and with the addition of 5% tartaric acid for bacteria inhibition, the plates were incubated at room temperature for 15 days in aerobiosis. The growth of the characteristic colonies was evaluated and they were selected according to their shape, size, color and consistency.

The bacteria identified were: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus*, and *Micrococcus varians* and the fungi were identified as of the genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*.

I. INTRODUCCIÓN

En el planeta tierra existe gran diversidad de ambientes salinos, los cuales varían respecto al grado de salinidad y composición iónica. Estos ambientes pueden ser terrestres o acuáticos, dentro de los cuales se encuentran los denominados ambientes hipersalinos cuya concentración de sales es elevada. Este tipo de ambiente, impide la supervivencia de la mayoría de microorganismos, no obstante, existen algunas excepciones como es el caso de los denominados microorganismos halófilos que, de acuerdo a las concentraciones de sal que toleran se clasifican en halotolerantes, halófilos débiles, halófilos moderados y halófilos extremos (Ramírez *et al.*, 2006).

Los microorganismos halófilos han desarrollado un mecanismo en el cual acumulan en el citoplasma una sustancia para regular la turgencia interna sin que se produzca inhibición del metabolismo celular, esta sustancia se le conoce como soluto compatible que puede ser sintetizada por el microorganismo o estar presente en el medio y ser acumulada en el interior por mecanismos de transporte de membrana (Meseguer, 2004).

En el Perú se encuentran las Salineras de Maras, un ambiente hipersalino, situado a 3.380 metros sobre el nivel del mar, con coordenadas 13° 18' 10" S; 72° 09' 21" O, en el poblado de Maras, ubicado a 48 Km al noroeste de la ciudad de Cusco en la provincia de Urubamba, constituyendo las minas de sal más importantes de la región. Estas salineras que están dispuestas en forma de terrazas, atravesadas por un riachuelo subterráneo que las nutre de agua salada, son aproximadamente más de tres mil, de 5 m² de área cada una.

En los últimos años los ambientes salinos han cobrado mayor importancia en el campo de la investigación científica, debido al uso biotecnológico de los microorganismos que habitan en ellos, siendo empleados en beneficio de las diferentes industrias (Castillo y Barragán., 2011).

Este trabajo se realizó con la finalidad de poder aislar y caracterizar microorganismos halófilos de las Salineras de Maras y así contribuir a investigaciones futuras como la determinación del potencial biotecnológico de los microorganismos aislados.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los ambientes hipersalinos son aquellos hábitats que poseen una concentración elevada de sales mayor a la del agua de mar, esta característica limita la microbiota existente en estos ambientes viéndose influenciados también por factores como temperatura, pH u oxígeno disuelto; a los microorganismos que habitan en este tipo de ambientes se les considera extremófilos que además de tolerar las condiciones adversas están adaptados a ellas. Dentro de los ambientes hipersalinos más estudiados se hallan las salinas solares de estanque múltiple ya que son de gran importancia en estudios de biodiversidad y ecología (**Ventosa, 2010**).

Así mismo los investigadores **Canales *et al.*, (2011)** mediante un estudio que realizaron en las Salinas de San Blas en el departamento de Junín (Perú) determinaron que estos ambientes hipersalinos fueron hábitats extremos que variaban respecto a su salinidad, composición iónica, pH y nutrientes los cuales estaban influenciados por el clima, la zona geográfica y la altitud en que se encontraban, sin embargo, fueron ecosistemas que presentaron una gran diversidad de microorganismos con un gran potencial biotecnológico.

Estos ambientes pueden ser de origen natural como el Gran Lago Salado (Estados Unidos) o de origen artificial como lo son las salinas construidas por el hombre para la obtención de sal. Generalmente las salinas están ubicadas en la Costa como por ejemplo las Salinas de Bras del Port en Santa Pola (España), pero también existen salinas terrestres en las cuales las aguas proceden de fuentes, ríos o lagos como las Salinas de Maras en Cusco (Perú); estas salinas son denominadas de estanque múltiple, debido a que el agua está distribuida en distintos compartimientos, lo cual resulta útil para realizar estudios sobre los diversos microorganismos existentes en ellas (**Meseguer, 2004**).

Los microorganismos halófilos son aquellos que se encuentran en los ambientes hipersalinos y a diferencia de los halotolerantes son capaces de realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales que en

ausencia de ellas. Dentro de los microorganismos halófilos hay una gran variedad de heterótrofos adaptados para resistir altas concentraciones de NaCl mediante mecanismos moleculares como enzimas que mantienen su actividad a concentraciones elevadas de sal (**González et al., 2002**).

Los microorganismos halófilos poseen una gran diversidad gracias a que desarrollan un mecanismo en respuesta al estrés osmótico el cual consiste en la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular en el citoplasma lo que hace que se mantenga un equilibrio osmótico sin obstaculizar el metabolismo celular, a estos compuestos orgánicos se les denomina solutos compatibles que pueden ser sintetizados por el microorganismo o ser acumulados en el interior por mecanismos de transporte de membrana (**Ramírez et al., 2006**).

Fernández et al., (2003), investigaron las Minas Salinas de Atacocha en Ayacucho (Perú) con la finalidad de aislar bacterias halófilas moderadas a partir de los suelos salinos y obtuvieron un número de 10 cepas aisladas con características morfológicas y culturales diferentes tales como: tolerancia a la Sal en concentraciones de 0.1 a 4.0 M de NaCl siendo su óptimo entre 1.5 y 2.0 M, rango de temperatura entre 4 y 37 °C y pH entre 5 y 9 las cuales permitieron identificar los géneros bacterianos como *Halomonas* y *Chromohalobacter*.

Maturrano (2004), desarrolló una investigación en las salinas de Maras en Cusco (Perú) en la que describió los ambientes hipersalinos, microorganismos halófilos y la ecología microbiana de estos ambientes; también determinó que según la composición iónica estas salinas son ambientes hipersalinos talasohalinos (aquellos que derivan de la evaporación del agua de mar, presentan un pH neutro o ligeramente alcalino) de los cuales logró aislar y caracterizar mediante técnicas moleculares y de cultivo microorganismos relacionados con los géneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halorubrum* y *Halogeometricum*.

Un estudio realizado en el año 2004, abarcó una extensa revisión sobre las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas, los cuales están basados en aspectos relacionados con su ecología en los ambientes hipersalinos, así como sus características y las diversas aplicaciones en la industria y en la biotecnología dada su alta estabilidad en condiciones extremas. Así mismo se demostró su utilidad en la producción de enzimas,

polímeros, solutos compatibles y en la biodegradación de residuos, así como en la producción de alimentos fermentados (**Ramírez et al., 2004**).

Sánchez & Arguello, en el año 2006, realizaron un estudio a partir de suelos salinos en Colombia, con el objetivo de aislar y evaluar la capacidad de bacterias halófilas para capturar iones sodio in vitro y diseñar una propuesta para su posible aplicación en biorremediación de suelos sódicos y salinos, logrando aislar bacterias pertenecientes a las especies de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio metschnikovii*, *Flavimonas oryzihabitans* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Se han realizado estudios en suelos salinos de donde se aislaron bacterias halófilas cuyo rango de salinidad tolerable fue de 0,9 – 20 % de sales totales y se identificaron los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudomonas* y en menor proporción *Nesterenkonia* y *Agrobacterium* (**Sánchez et al., 2003**). Así mismo, **Flores et al., (2010)**, analizaron los suelos de las Salinas de Pilluana en San Martín y sometieron las muestras a pruebas de tolerancia a la sal, rango de pH y temperatura óptima de crecimiento que permitieron la selección de 14 bacterias de las cuales, seis fueron bacilos Gram (+) pertenecientes al género *Bacillus* y ocho bacilos Gram (-) pertenecientes a los géneros *Halomonas* y *Salinivibrio*.

Por otro lado, **Castro et al., (2011)** investigaron suelos salinos de Cuatro Ciénegas Coahuila (México) de las cuales tomaron ocho muestras que fueron analizadas en su contenido de sodio, humedad y materia orgánica, a partir de estas muestras de suelo se aislaron bacterias halófilas utilizando medios de cultivo con concentraciones altas de sales, además se determinaron las características bioquímicas, morfológicas y el potencial biotecnológico de las cepas aisladas, las mismas que fueron identificadas como del género *Halomonas*.

En los últimos años, se han descrito las diversas aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos entre los que destaca el género *Halomonas* (**Castillo y Barragán., 2011**). Dentro de las aplicaciones, resaltan en la industria alimentaria para preservación y conservación de las características sensoriales de los alimentos, en la industria de plástico para la generación de nuevas tecnologías que no perjudiquen al ambiente, en la industria farmacéutica para la generación de nuevos productos, además, se

ha demostrado que los microorganismos halófilos poseen una gran capacidad de biorremediación, especialmente en la biocatalización en ambientes contaminados.

Se estudiaron muestras de agua y suelo salino provenientes de las playas de los distritos de San José y Santa Rosa en Lambayeque, con el objetivo de determinar el rendimiento y productividad de exopolisacáridos emulgentes por bacterias halófilas y se obtuvieron 138 aislados de bacterias halófilas (**Fuentes *et al.*; 2013**).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por las bacterias y hongos halófilos aislados de las Salineras de Maras, Cusco.

3.1.2. Población y muestra

La población estuvo constituida por bacterias y hongos halófilos de las pozas de las Salineras de Maras-Cusco y, la muestra por las bacterias y hongos de 30 pozas seleccionadas aleatoriamente.

3.1.3. Medios de cultivo (Anexo 1)

A. Bacterias halófilas

- Caldo de enriquecimiento SW₅ y SW₁₀ (Rodríguez y Valera, 1981).
- Agar SW₅ y SW₁₀ para el aislamiento de bacterias halófilas.
- Medios de cultivo salino con diferentes sustratos para la identificación de bacterias halófilas según las pruebas establecidas en el Manual Determinativo de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

B. Hongos halófilos

- Agar Sabouraud dextrosa con sales al 5% y con la adición de ácido tartárico al 5% para el aislamiento de hongos halófilos.

- Colorante azul de algodón para la identificación microscópica de hongos halófilos.

3.2. Metodología

3.2.1. Lugar de muestreo

El muestreo se realizó en las pozas de las Salineras de Maras, ubicadas en la provincia de Urubamba, a 3.380 metros sobre el nivel del mar, con coordenadas $13^{\circ} 18' 10''$ S; $72^{\circ} 09' 21''$ O. Tienen su origen en un manantial principal proveniente de la montaña Qaqawiñay, del cual brota el agua salada que es conducida por un sistema de finos canales hacia todas las pozas, donde después de un determinado tiempo el sol se encarga de evaporarla, quedando de ese modo, la sal natural (Fig. 1 y 2).

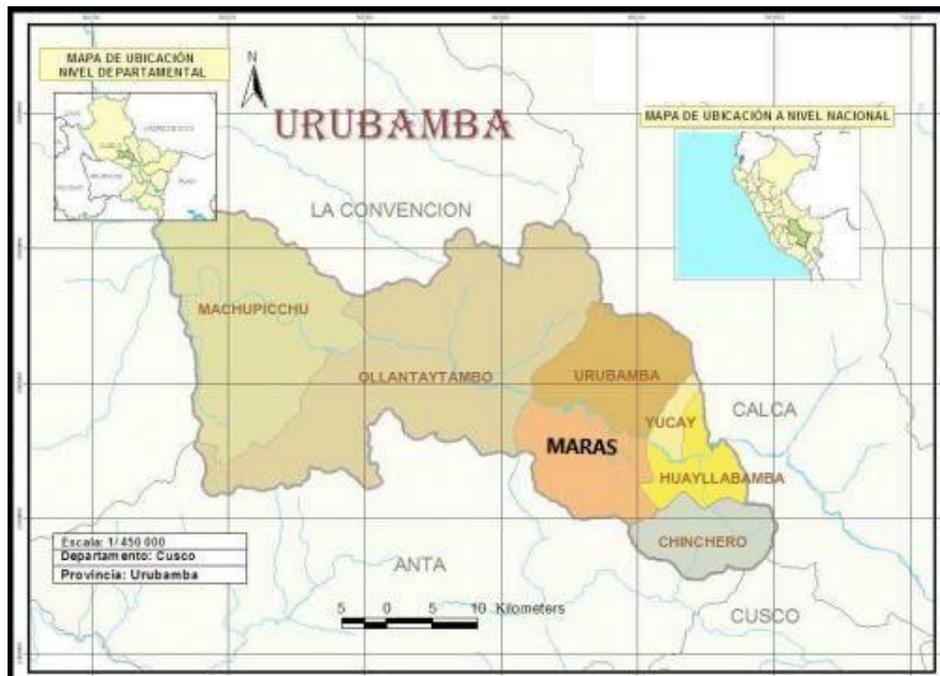


Fig.1.Ubicación de Maras-Cusco.



Fig. 2. Ubicación del manantial que abastece y da origen a las Salineras de Maras.

3.2.2. Toma de muestra

Para la realización del presente trabajo se tomaron muestras de agua de 30 pozas de las Salineras de Maras seleccionadas de manera aleatoria teniendo en cuenta su ubicación en la ladera de la base de la montaña Qaqawiñay, parte alta, media y baja, distribuyendo las 30 pozas proporcionalmente. El muestreo se realizó en el mes de Setiembre del 2015, cuando las pozas tenían 15 días de iniciado el proceso de obtención de la sal (Fig. 3 y Anexo 3).

Las muestras de agua fueron recolectadas en frascos estériles con tapa rosca de 250 mL de capacidad, debidamente identificados, los cuales fueron transportados al laboratorio de Bacteriología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Lambayeque) donde fueron conservados en refrigeración para su posterior análisis.

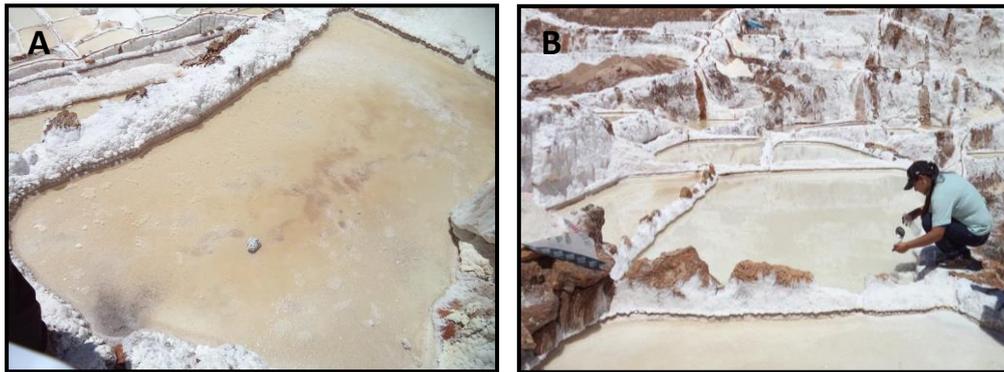


Fig. 3. Toma de muestra de la poza de cristalización de Maras-Cusco (A y B).

3.2.3. Enriquecimiento de bacterias halófilas

Para el enriquecimiento de bacterias halófilas se inocularon 10 mL de muestra salina en frascos con 10 mL de medio líquido SW₅ y SW₁₀, suplementados con extracto de levadura al 0,3%. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 35°C en ambiente aeróbico durante 48 horas, evaluando su crecimiento diariamente el mismo que confirmado con la tinción de Gram. Posteriormente se procedió al aislamiento de las bacterias halófilas (Fig. 4).

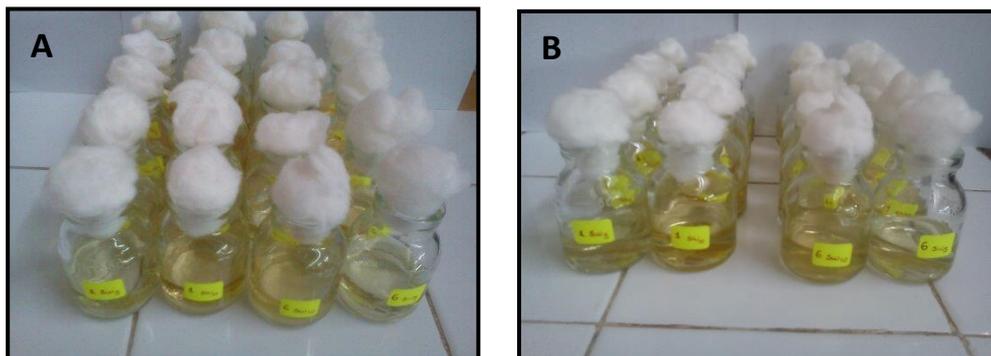


Fig. 4. Enriquecimiento de bacterias halófilas de las muestras de agua de las pozas de cristalización de Maras (A y B).

3.2.4. Aislamiento de bacterias halófilas

Para el aislamiento de bacterias halófilas, se utilizó placas con Agar SW₅ y SW₁₀. La siembra se realizó por el método de estría en superficie y las placas se incubaron a 35°C en ambiente aeróbico durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se evaluó el crecimiento bacteriano haciendo una selección de las colonias diferentes en base a sus características morfológicas (forma, tamaño, elevación, consistencia y pigmento). Las colonias seleccionadas fueron separadas en cultivos puros con agar SW₅ manteniéndolas en refrigeración para su posterior identificación.

3.2.5. Identificación de bacterias halófilas

Las bacterias halófilas fueron identificadas utilizando las pruebas bioquímicas y de crecimiento señaladas en el Manual Determinativo de Bergey (Holt et al., 1994), así mismo se identificaron las cepas por sus actividades frente a diferentes sustratos señaladas en las tablas de identificación descritas por Ventosa et al., (1998), Arahal et al., (2002).

3.2.6. Aislamiento de hongos halófilos

Para el aislamiento de hongos halófilos se procedió a centrifugar 10 mL de cada muestra salina a 3000 rpm por 15 minutos hasta obtener el sedimento, el cual fue utilizado para sembrar en placas con Agar Sabouraud dextrosa con sales al 5% y con la adición de ácido tartárico al 5% para inhibición de bacterias. La siembra se realizó utilizando el método de estriado y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días en aerobiosis. Transcurrido este tiempo se evaluó el crecimiento de las colonias características y se seleccionaron de acuerdo a su forma, tamaño, color y consistencia, las mismas que fueron conservadas en refrigeración hasta su posterior identificación.

3.2.7. Identificación de hongos halófilos

Los hongos halófilos fueron identificados teniendo en cuenta las características macroscópicas de las colonias: tamaño, forma, color, aspecto y las características microscópicas como micelio, hifas, conidias, esporas, entre otras. señaladas en las claves de Barnett y Hunter (1972).

3.2.8. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los datos se empleó la estadística descriptiva, los cuales fueron ordenados en sus respectivas tablas y gráficos. Para el ordenamiento de los datos se utilizó el programa Microsoft Office Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1. Descripción de las pozas de las Salineras de Maras-Cusco

Las pozas de cristalización están ubicadas en la base de la montaña Qaqawiñay a 3.380 msnm, son más de 3000 y tienen forma rectangular con excepción de algunas que son irregulares, están dispuestas a manera de terrazas, poseen un área aproximada de 5m² cada una con una profundidad entre 10 a 15cm. Las pozas se llenan con el agua salada de la montaña a través de un sistema de canales de entrada y salida manteniendo un rango de salinidad entre 20 y 25% (Fig. 5).

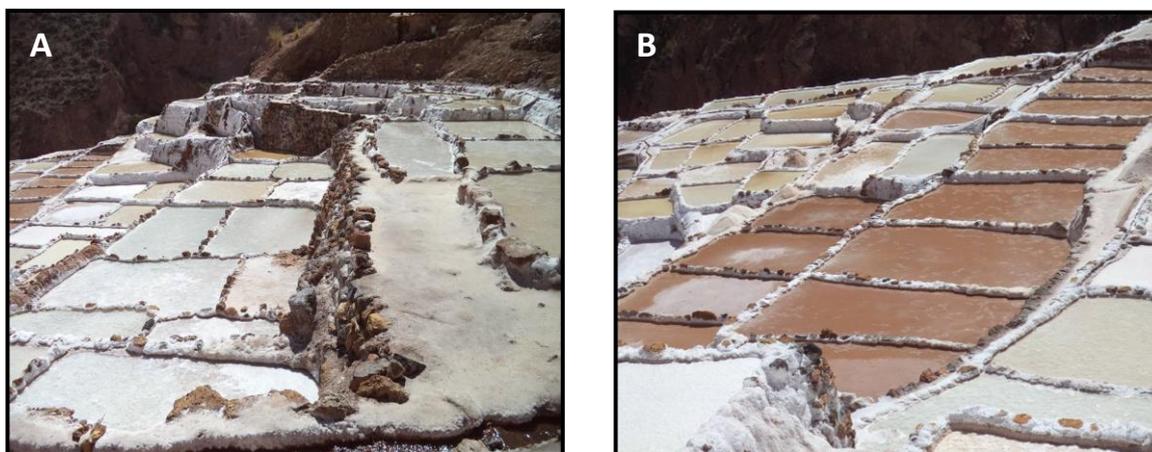


Fig. 5. Pozas de cristalización de las Salineras de Maras–Cusco (A y B).

La Tabla 1 muestra las características físico-químicas de 30 pozas de cristalización como variaciones de color entre blanco, crema y rojizo; el grado de cristalización del agua cuyas mediciones variaron según la poza desde 4cm a 9cm de una profundidad de 15cm, así como los valores de pH que estuvieron en el rango de 6 a 8.

Tabla 1. Características físico – químicas de las pozas de cristalización de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.

Poza	pH	Color	Cristalización
P1	7.0	Blanca	5 cm
P2	7.0	Blanca	5 cm
P3	6.0	Blanca	8 cm
P4	7.0	Rojiza	5 cm
P5	7.0	Crema	5 cm
P6	8.0	Blanca	4 cm
P7	7.0	Crema	5 cm
P8	7.0	Rojiza	9 cm
P9	7.0	Blanca	5 cm
P10	6.0	Rojiza	4 cm
P11	7.0	Blanca	8 cm
P12	7.0	Blanca	9 cm
P13	8.0	Blanca	8 cm
P14	7.0	Blanca	4 cm
P15	8.0	Crema	8 cm
P16	7.0	Blanca	9 cm
P17	6.0	Blanca	5 cm
P18	7.0	Blanca	8 cm
P19	6.0	Blanca	4 cm
P20	7.0	Blanca	8 cm
P21	6.0	Blanca	5 cm
P22	7.0	Blanca	9 cm
P23	7.0	Crema	5 cm
P24	6.0	Blanca	9 cm
P25	7.0	Blanca	4 cm
P26	8.0	Blanca	8 cm
P27	7.0	Crema	9 cm
P28	7.0	Blanca	8 cm
P29	6.0	Rojiza	4 cm
P30	7.0	Blanca	5 cm

P1...P30 - Pozas de cristalización

4.2. Caracterización del crecimiento de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.

Se seleccionaron 24 colonias de bacterias de las cuales el 75% fueron halotolerantes y el 25% halófilas; el 83.3% fueron circulares, de borde entero, superficie lisa, y el 16.7% fueron irregulares, y de superficie rugosa. Respecto al color el 58.3% fueron amarillas, el 25% anaranjadas, y el 16.7% cremas. La consistencia de las colonias fue cremosa el 83.3%, pastosas el 16.7%; convexas el 83.3% y las restantes 16.7% semielevadas como se observan en la Tabla 2, Fig. 6 (A, B y C) y Fig. 7 (A, B y C)

Tabla 2. Características morfológicas de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.

Cepa	Forma	Borde	Color	Elevación	Superficie	Consistencia
MR 1	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 2	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 3	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 4	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 5	Circular	Entero	Anaranjada	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 6	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 7	Circular	Entero	Anaranjada	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 8	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 9	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 10	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 11	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 12	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 13	Circular	Entero	Anaranjada	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 14	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 15	Irregular	Irregular	Crema	Semielevada	Rugosa	Seca
MR 16	Irregular	Irregular	Crema	Semielevada	Rugosa	Seca
MR 17	Circular	Entero	Anaranjada	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 18	Circular	Entero	Anaranjada	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 19	Irregular	Irregular	Crema	Semielevada	Rugosa	Seca
MR 20	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 21	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 22	Circular	Entero	Anaranjada	Convexa	Lisa	Cremosa
MR 23	Irregular	Irregular	Crema	Semielevada	Rugosa	Seca
MR 24	Circular	Entero	Amarilla	Convexa	Lisa	Cremosa

MR1... MR24- Cepas

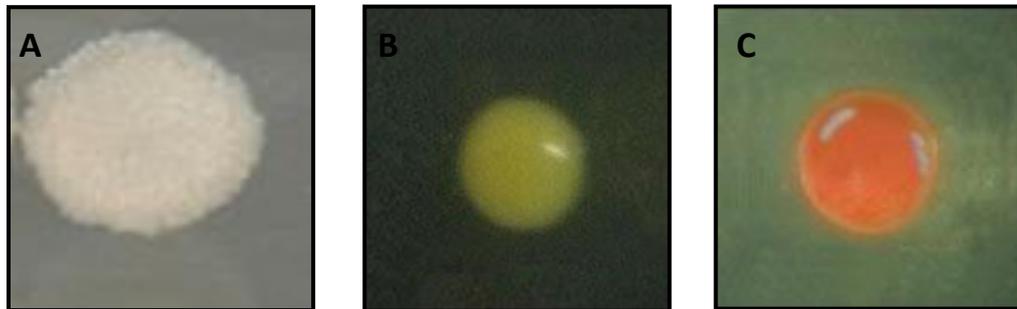


Fig. 6. Colonias de tres cepas de bacterias aisladas de las Salineras de Maras (A, B, y C) observadas al estereoscopio.

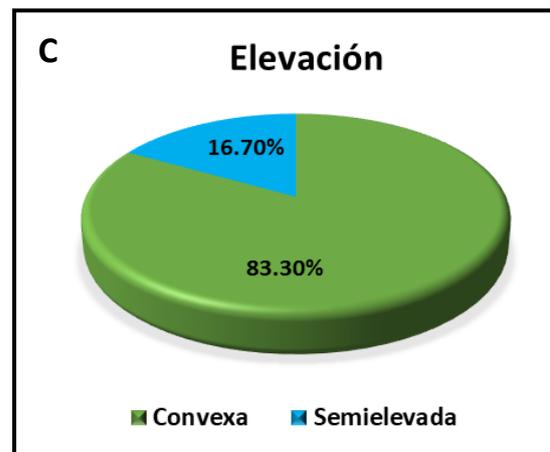
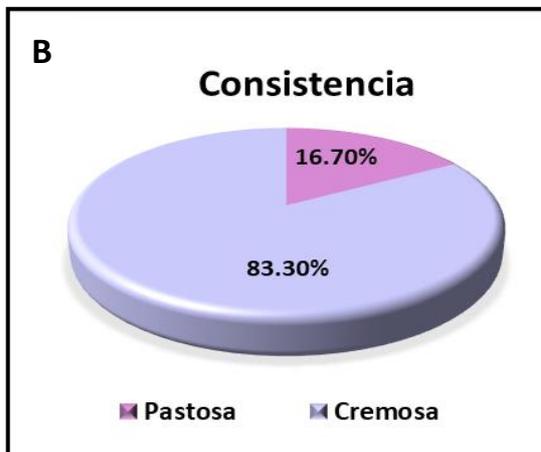
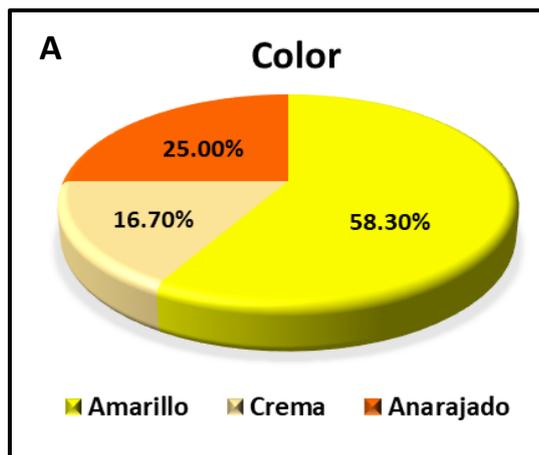


Fig. 7. Porcentajes de cepas bacterianas agrupadas según sus características morfológicas: color (A), consistencia (B) y elevación (C).

4.3. Características microscópicas de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.

De 24 cepas aisladas el 100% fueron bacterias Gram positivas de las cuales, las cepas MR1, MR2, MR3, MR4, MR6, MR7, MR8, MR9, MR10, MR11, MR12, MR13, MR14, MR17, MR18, MR20, MR21, MR22 y MR24 fueron cocos dispuestos en tetradas y racimos; las cepas MR15, MR16, MR19 y MR23 fueron bacilos dispuestos en pares, cadenas y aislados. (Fig. 8)

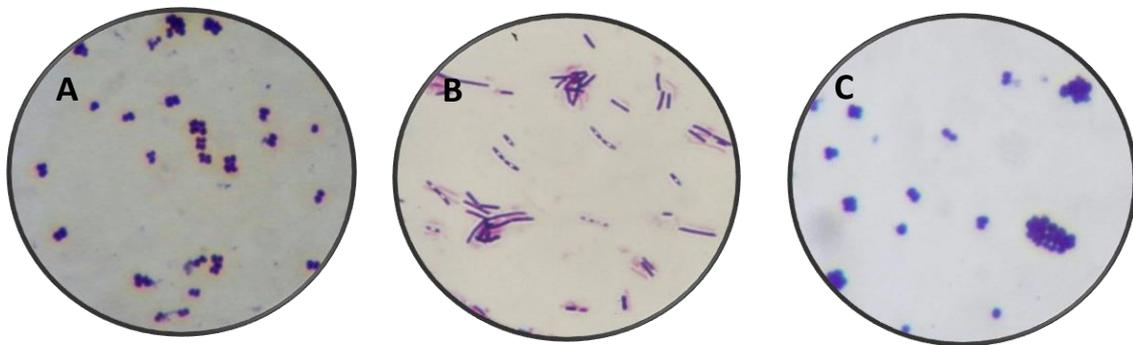


Fig. 8. Morfología de tres cepas de bacterias halófilas aisladas de las Salineras de Maras-Cusco observadas a 100X (A, B y C).

Con respecto a la movilidad se observó que el 16.7% (MR15, MR16, MR19 y MR21) de los aislados bacterianos fueron móviles, con movimiento lento que demostró la presencia de flagelos peritricos como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Características microscópicas de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.

Cepa	Tinción Gram			Gota pendiente	
	Reacción tintorial	Forma	Disposición	Motilidad	Flagelo
MR 1	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 2	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 3	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 4	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 5	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 6	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 7	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 8	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 9	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 10	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 11	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 12	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 13	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 14	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 15	Gram positivo	Bacilo	Aislados	Positiva	Peritrico
MR 16	Gram positivo	Bacilo	Aislados	Positiva	Peritrico
MR 17	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 18	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 19	Gram positivo	Bacilo	Aislados	Negativa	Peritrico
MR 20	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 21	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 22	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-
MR 23	Gram positivo	Bacilo	Aislados	Positiva	Peritrico
MR 24	Gram positivo	Coco	Tetradas	Negativa	-

4.4. Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.

Del total de las 24 cepas aisladas, el 58.3% crecieron entre los rangos de 0% a 8% de NaCl, el 25% lo hicieron entre los rangos de 2% a 20% de NaCl y el 16.7% crecieron entre los rangos de 0% a 10% de NaCl (Tabla 4 y Anexo 2). Estos resultados demuestran que las cepas MR1, MR2, MR3, MR4, MR6, MR8, MR9, MR10, MR11, MR12, MR14, MR15, MR16, MR19, MR20, MR21, MR23 y MR24 son microorganismos halotolerantes llevados probablemente por medios externos, mientras que las cepas

MR5, MR7, MR13, MR17, MR18 y MR22 son halófilos, microorganismos que poseen los denominados solutos compatibles, sobreviven a este tipo de ambientes.

Tabla 4. Crecimiento de 24 cepas de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco a diferentes concentraciones de NaCl.

N° de Cepas	% de Cepas	Concentración de NaCl (%)									
		0	2	4	6	8	10	15	20	25	30
4*	16.7										
14**	58.3										
6***	25										

* MR15, MR16, MR19, MR23

** MR1, MR2, MR3, MR4, MR6, MR8, MR9, MR10, MR11, MR12, MR14, MR20, MR21, MR24

*** MR5, MR7, MR13, MR17, MR18, MR22

4.5. Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.

De 24 cepas aisladas el 100% resultaron negativas para las pruebas de Indol, Rojo de Metilo y fermentación de la lactosa, el 16.7% fue positivo para la prueba de Voges Proskauer. El 100% fueron positivas para la producción de ácido a partir de la Sacarosa, y el 75% de las cepas (MR1, MR3, MR4, MR5, MR7, MR8, MR9, MR10, MR13, MR15, MR16, MR17, MR18, MR19, MR21, MR22, MR23 y MR24) fueron positivas a la fermentación de la glucosa. En la prueba de hidrólisis el 75% (MR1, MR2, MR3, MR4, MR6, MR8, MR9, MR10, MR11, MR12, MR14, MR15, MR16, MR19, MR20, MR21, MR23 y MR24) hidrolizaron la gelatina; el 16.7% (MR15, MR16, MR19 y MR23) el almidón; el 16.7% (MR15, MR16, MR19 y MR23) la caseína y el 33.3% (MR1, MR3, MR3, MR4, MR8, MR9, MR10, MR21 y MR24) la úrea. En la prueba de reducción de nitratos el 75% (MR1, MR3, MR4, MR5, MR7, MR8, MR9, MR10, MR13, MR15, MR16, MR17, MR18, MR19, MR21, MR22, MR23 y MR24) resultó positivo. Con el 100% se detectó la enzima catalasa y el 25% (MR2, MR6, MR11, MR12, MR14 y MR20) dio la prueba de Oxidasa positiva. (Tabla 5)

Tabla 5. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.

Cepa	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Gelatina	Almidón	Caseína	Catalasa	Oxidasa	Indol	RM	VP	Úrea	NO ₃
MR 1	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 2	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MR 3	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 4	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MR 6	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MR 7	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MR 8	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 9	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 10	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 11	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MR 12	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MR 13	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MR 14	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MR 15	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
MR 16	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
MR 17	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MR 18	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MR 19	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
MR 20	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MR 21	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
MR 22	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MR 23	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
MR 24	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+

4.6. Identificación de bacterias aisladas de las Salineras de Maras-Cusco.

Después de haber seleccionado y caracterizado a las cepas bacterianas aisladas de las Salineras de Maras, se identificó el género *Bacillus subtilis* y 3 especies diferentes de cocos: *Micrococcus luteus*, *Micrococcus roseus* y *Micrococcus varians* (Tabla 6, 7, 8 y 9).

Tabla 6. Identificación de las cepas MR15, MR16, MR19 y MR23 aisladas de las Salineras de Maras comparadas con la especie *Bacillus subtilis*.

Características	MR 15	MR 16	MR 19	MR 23	<i>Bacillus subtilis</i> *
Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Movilidad	+	+	+	+	+
Forma espora	O	O	O	O	O ^a
Posición espora	C	C	C	C	C ^b
NaCl crecimiento					
0%-7%	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+
15%	-	-	-	-	-
pH óptimo	7	7	7	7	7
Glucosa: ácido	+	+	+	+	+
Lactosa: ácido	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+

E^a Oval

C^b central

* Ivanova et al; (1999)

Tabla 7. Identificación de las cepas MR2, MR6, MR11, MR12, MR14 y MR20 aisladas de las Salineras de Maras comparadas con la especie *Micrococcus luteus*.

Características	MR 2	MR 6	MR 11	MR 12	MR 14	MR 20	<i>Micrococcus luteus</i> *
Morfología	Cocos						
Pigmentación	Amarillo						
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-
O-F Glucosa	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa: ácido	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Gelatina	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de Almidón	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
Agar Nutritivo 7.5 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+

* Holt *et al.* (1994), Liu *et al.* (2000), Wieser *et al.* (2002)

Tabla 8. Identificación de las cepas MR5, MR7, MR13, MR17, MR18 y MR22 aisladas de las Salineras de Maras comparadas con la especie *Micrococcus roseus*.

Características	MR 5	MR 7	MR 13	MR 17	MR 18	MR 22	<i>Micrococcus roseus</i> *
Morfología	Cocos						
Pigmentación	Naranja rojizo						
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-
O-F Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa: ácido	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Gelatina	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
Agar Nutritivo 7.5 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+

* Holt *et al.* (1994), Liu *et al.* (2000), Wieser *et al.* (2002)

Tabla 9. Identificación de las cepas MR1, MR3, MR4, MR8, MR9, MR10, MR21 y MR24 aisladas de las Salineras de Maras comparadas con la especie *Miicrococcus varans*.

Características	MR 1	MR 3	MR 4	MR 8	MR 9	MR 10	MR 21	MR 24	<i>Micrococcus varians</i> *
Morfología	Cocos								
Pigmentación	Amarillo								
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-F Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa: ácido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Agar Nutritivo 7.5 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Holt *et al.* (1994), Liu *et al.* (2000), Wieser *et al.* (2002)

4.7. Caracterización de hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.

De las Salineras de Maras se aislaron 12 cepas de hongos de los cuales el 16.7% (MR27 y MR29) fueron halotolerantes y el 83.3% (MR23, MR24, MR25, MR26, MR28, MR30, MR31, MR32, MR33 y MR34) fueron halófilos (Anexo 3). Todos los hongos desarrollaron colonias circulares, el 58.3% (MR24, MR25, MR28, MR30, MR32, MR33 y MR34) presentaron anverso color verde amarillento con borde claro y el reverso verde petróleo, el 16.7% (MR27 y MR29) presentaron el anverso blanco con centro verde y reverso blanco, en el 16.7% (MR26 y MR31) se observaron el anverso verde petróleo con borde blanco y reverso verde oscuro y el 8.3% (MR23) presentaron anverso blanco y reverso crema. Con relación al aspecto de las colonias, el 58.3% (MR24, MR25, MR28, MR30, MR32, MR33 y MR34) fueron pulverulentas, el 33.4% (MR26, MR27, MR29 y MR31) aterciopeladas y 8.3% (MR23) algodonosas como se observa en la Fig. 9 (A, B, C y D) y se representa porcentualmente en la Fig. 10.



Fig. 9. Colonias de cuatro cepas de hongos (A, B, C y D) aislados de las Salineras de Maras-Cusco. Setiembre 2015.

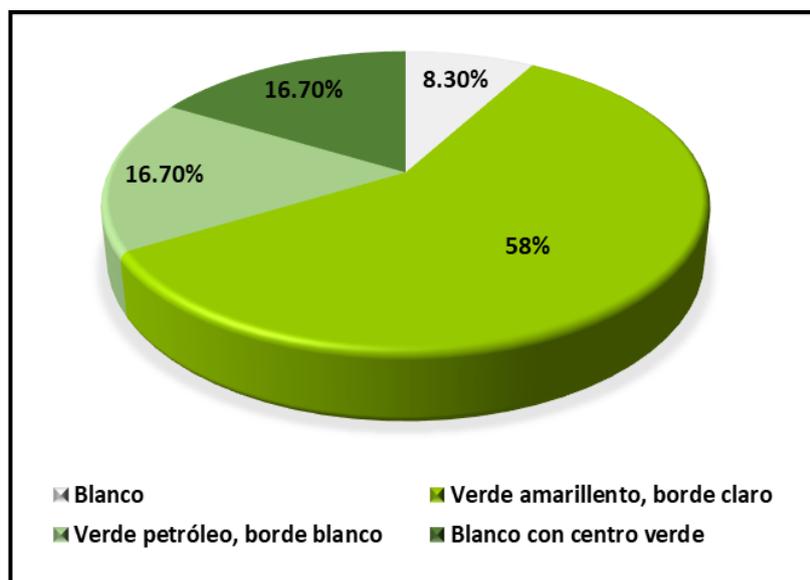


Fig. 10. Porcentaje de hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco agrupados según sus características morfológicas.

4.8. Características microscópicas de los hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.

Microscópicamente, se observaron filamentos aéreos en las 12 cepas aisladas, de las cuales las cepas MR24, MR25, MR28, MR30, MR32, MR33 y MR34 (58.3%) presentaron cabeza conidial uniseriada, conidióforo hialino y liso, vesícula piriforme con fiálides sobre 2/3 de la vesícula y conidias esféricas, las cepas MR27 y MR29 (16.7%) presentaron cabeza conidial biseriada, conidióforo hialino, vesícula esférica con métulas y fiálides sobre toda la vesícula y conidias esféricas, las cepas MR26 y MR31 (16.7%) hifas septadas hialinas, conidióforo simple, métulas y fiálides organizadas típicamente (pincel) en la punta del conidióforo, conidias esféricas y, la cepa MR23 (8.3%) macroconidias típicas de bordes curvados (media luna) con ápices obtusos o agudos, aislados tal como se observa en la Fig. 11 (A, B, C y D).

	<p>Cabeza conidial uniseriada Conidióforo hialino y liso Vesícula piriforme Fiálides sobre 2/3 de la vesícula Conidias esféricas</p>
	<p>Cabeza conidial biseriada Conidióforo hialino Vesícula esférica Métulas y fiálides sobre toda la vesícula. Conidias esféricas</p>
	<p>Hifas septadas hialinas Conidióforo simple Métulas y fiálides organizadas típicamente (pincel) en la punta del conidióforo Conidias esféricas</p>
	<p>Macroconidias típicas de bordes curvados (media luna) con ápices obtusos o agudos, aislados.</p>

Fig. 11. Observaciones microscópicas de cuatro cepas de hongos (A, B, C y D) aislados de las Salineras de Maras-Cusco. Setiembre 2015.

4.9. Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl de los hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.

De los 12 hongos aislados, el 25.0% crecieron en el rango salino de 0% a 6% de NaCl; el 58.3% en el rango de 2% a 8% de NaCl y el 16.7% en el rango de 2% a 10% de NaCl, demostrándose así la presencia de hongos halotolerantes (MR23, MR27 y

MR29), presuntos contaminantes que se adaptaron a las condiciones existentes en las Salineras, mientras que los hongos halófilos (MR24, MR25, MR26, MR28, MR30, MR31, MR32, MR33 y MR34) representan la microbiota propia de las Salineras (Tabla 10).

Tabla 10. Crecimiento de 12 cepas de hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco a diferentes concentraciones de NaCl.

N° de Cepas	% de Cepas	Concentración de NaCl (%)									
		0	2	4	6	8	10	15	20	25	
3*	25.0										
7**	58.3										
2***	16.7										

* MR23, MR27, MR29

** MR24, MR25, MR28, MR30, MR32, MR33, MR34

*** MR26, MR31

4.10. Identificación de hongos aislados de las Salineras de Maras-Cusco.

Por las características macroscópicas y microscópicas descritas en las claves de Barnett y Hunter (1972). Se identificaron 4 especies diferentes de hongos: *Fusarium sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium crysogenum* en doce cepas aisladas como se registra en la Tabla 11.

Tabla 11. Identificación de las cepas de hongos aislados de las Salineras de Maras. Setiembre 2015.

Cepa	Hongo
MR 23	<i>Fusarium sp.</i>
MR 24	<i>Aspergillus flavus</i>
MR 25	<i>Aspergillus flavus</i>
MR 26	<i>Penicillium crysogenum</i>
MR 27	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MR 28	<i>Aspergillus flavus</i>
MR 29	<i>Aspergillus fumigatus</i>
MR 30	<i>Aspergillus flavus</i>
MR 31	<i>Penicillium crysogenum</i>
MR 32	<i>Aspergillus flavus</i>
MR 33	<i>Aspergillus flavus</i>
MR 34	<i>Aspergillus flavus</i>

V. DISCUSIÓN

Las salineras de Maras están formadas por un conjunto de pozas salinas ubicadas en la ladera de montaña Qaqawiñay en donde la sal se forma por evaporación del agua salada que tiene su origen en un manantial. La sal que se forma, está químicamente constituida por NaCl, y diversos minerales en mayor cantidad que la sal marina, además de elementos como como magnesio, hierro, zinc y cobre.

Los resultados obtenidos en la presente investigación respecto a la salinidad de las pozas de cristalización de las Salineras de Maras variaron entre 20 y 25 %, siendo estas características similares a las Salinas de Huacho (Perú), descritas por **Esquerre *et al.*; (2003)** en las Salinas de Huacho (Perú), y Maturrano (**2004**). Estas características demuestran que las Salineras de Maras son ambientes hipersalinos, término utilizado por **Antón** en el año **2011**, quien describen a los ambientes hipersalinos acuáticos como aquellos que poseen una concentración de sal mayor a la del agua de mar (3.5 % de sales totales), por lo cual son considerados ambientes extremos. Mientras que **Cadena (2015)** define a los ambientes hipersalinos como aquellos lugares con concentraciones de sales elevadas superiores al 10%.

Ventosa (2006), indica que los ambientes hipersalinos suelen encontrarse en lagunas costeras donde la inclinación de la costa no es muy pronunciada y el agua queda estancada cuando sube la marea, se produce la evaporación y, los cristales de sal se depositan y concentran sobre la arena, explicación que no coincide con la formación de las Salineras de Maras, que tienen su origen en un manantial que las abastece de agua salada mediante un sistema de canales.

Durante el muestreo realizado en el mes de setiembre del 2015 se seleccionaron 30 pozas, las cuales presentaron forma rectangular en su mayoría, variando su color entre blanco, crema y rojizo, con un área aproximada de 5m², una profundidad de 10 a 15cm y

su pH estuvo en el rango de 6 a 8; características que fueron reportadas por **Maturrano** en el año **2004**, luego de un estudio realizado en las mismas Salineras de Maras (Perú).

Por las características anteriormente descritas, las Salineras de Maras constituyen un hábitat adecuado para microorganismos halófilos y halotolerantes, en su mayoría cocos Gram positivos y colonias con pigmentación variada, características que difieren de las reportadas por **Flores et al.**, en el año **2010**, que encontraron bacilos halófilos Gramnegativos; sin embargo, fueron similares a los resultados reportados por **Castro et al.**, (**2011**), que investigaron la región Cuatro Ciénagas, Coahuila en México, y **Canales et al.**, (**2014**), en las Salinas de San Blas en Junín (Perú), que encontraron cocos y bacilos halófilos Gram positivos, los cuales desarrollaron en su mayoría colonias pigmentadas que variaron entre crema, amarillo y anaranjado.

Las bacterias aisladas de las Salineras de Maras crecieron en diferentes rangos de salinidad, el 25 % de las cepas crecieron en el rango de 2 % a 20 %, siendo halófilas moderadas, el 16.7 % de las cepas crecieron entre 0 % a 6 %, y el 58.3 % de las cepas crecieron entre 0 % a 8 % de NaCl, resultando ser halotolerantes, comportamiento que difiere de lo reportado por **Flores et al.**, (**2010**), quienes demostraron en su investigación que todos los microorganismos en estudio fueron capaces de crecer en un rango de salinidad de 5 % a 25 % infiriendo que todos los aislados son halófilos moderados; mientras que **Canales et al.**, (**2014**) obtuvieron resultados similares a la presente investigación, reportando el 43 % de las bacterias como halófilas moderadas y el 57 % como halotolerantes.

En base a las características morfológicas y bioquímicas realizadas, los aislados de las Salineras de Maras fueron identificadas y ubicadas dentro de los géneros bacterianos *Bacillus* y *Micrococcus*. Estos resultados difieren con lo señalado por **Meseguer (2004)** quien reportó géneros como *Halomonas* y *Halobacillus*, y por **Maturrano (2006)** quien aisló bacterias del género *Pseudomonas* en las mismas salineras de Maras (Perú); mientras que, en el año **2007**, **Fernández et al.**; reportaron además de *Halomonas*, a *Chromohalobacter* como género aislado en las Salinas de Atacocha (Perú). Sin embargo, los resultados concuerdan con los reportados de **Huan Liu et al.**, (**2009**), quienes aislaron de un lago salado en China, bacterias halotolerantes del género *Bacillus*,

y **Canales et al., (2014)**, en un estudio realizado en las Salinas de San Blas (Junín), aislaron en su mayoría bacterias pertenecientes al género *Bacillus*.

Las bacterias aisladas de las Salineras de Maras, fueron identificadas por sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como de los géneros *Bacillus* y *Micrococcus*; otros investigadores como **Sánchez-Porro et al., (2005)** aislaron e identificaron *Halomonas* y *Halobacillus* en las Salinas de Cabo Rojo (Puerto Rico), y **Luque et al., (2010)** en Rambla Salada (Murcia) aislaron e identificaron también bacterias halófilas moderadas del género *Halomonas*.

Las bacterias del género *Micrococcus* identificadas en la presente investigación, también fue reportada por **Khire, M.** en el año **1994** que aisló de agua salada en la India, bacterias moderadamente halófilas pertenecientes al género *Micrococcus* y **Agu et al., (2017)** que aislaron en Anambra (Nigeria) tres microorganismos halotolerantes de los cuales uno de ellos resultó ser la especie *Micrococcus luteus*.

En las Salineras de Maras también se aislaron hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*; resultados que concuerdan con las investigaciones realizadas por **Leal et al., (2015)** en la Mina de Sal de Nemocón (Colombia), quienes reportaron al género *Penicillium*, destacando la especie *Penicillium chrysogenum*, que desarrolló hasta con 30 % de salinidad; además estos investigadores reportaron una levadura del género *Saccharomyces*.

Son escasos los estudios en aguas salinas, en los que se indique el desarrollo del género *Fusarium*, probablemente porque este hongo es propio del suelo, como lo confirman los investigadores **Backhouse et al.;** en el año **2001**, explicando que son microorganismos saprofitos oportunistas.

Sin embargo, resultados similares a la presente investigación, fueron reportados por **Castillo-Machalskis et al., (2006)** quienes estudiaron hongos de la laguna marina de Tacarigua (Venezuela) identificando los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, capaces de biosintetizar metabolitos; del mismo modo **Acosta et al.; (2011)** en su investigación sobre hongos en aguas hipersalinas, aislaron e identificaron los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

VI. CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye lo siguiente:

1. En las pozas de cristalización de las Salineras de Maras se aislaron e identificaron 24 cepas bacterianas, pertenecientes a los géneros: *Bacillus* y *Micrococcus*; y las especies identificadas corresponden a *Bacillus subtilis* (16.7%), *Micrococcus luteus* (25%), *Micrococcus roseus* (25%) y *Micrococcus varians* (33.3%).
2. Se aislaron 12 cepas de hongos, de los cuales el 16.7% fueron halotolerantes y el 87.3% halófilos, que se identificaron como de los géneros *Fusarium* (8.3%), *Aspergillus* (75%) y *Penicillium* (16.6%).

VII. RECOMENDACIONES

1. Investigar los microorganismos halófilos de las Salineras de Maras en otras épocas del año, con la finalidad de comprobar si las condiciones ambientales influyen en el desarrollo de los mismos microorganismos reportados en la presente investigación.
2. Investigar si los microorganismos que habitan las Salineras de Maras, tienen utilidad industrial para la producción de metabolitos.
3. Investigar si se pueden utilizar microorganismos halófilos con potencial biotecnológico para mejorar la calidad de la sal.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M.; Guevara, M.; Crescente, O. (2011). Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium camptoceras wollenw* y *reiking* y *Aspergillus flocculosus frisvad* y *sansom*, aislados de ambientes marinos. Santa Marta, Colombia.
- Agu, K.; Nmecha, C.; Nwaiwu, M.; et al. (2017). Isolation and Characterization of Halotolerant Bacteria from Ezzu River Amansea, Awka, Anambra State. *Bioengineering and Bioscience*; 5(4), pp. 86-90.
- Arahal, D.; Dewhirst, F.; Paster, B., et al. (1997). Phylogenetic análisis of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequence. *Appl Environ Microbiol*, 62, pp. 3779-3786.
- Barnett, H.; Hunter, B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4ta ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess publishing company.
- Cadena, S. (2014). *Ciencia y Mar*. 20 (52), pp. 49-55.
- Canales, P.; Chávez, E.; Guerra, G., et al. (2011). Bacterias productoras de β -galactosidasa aisladas de ambientes hipersalinos peruanos. *Revista Científica*, 3 (8), pp. 171-176.
- Castillo, L.; Barragán, B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de Diferentes microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2 (4), pp. 45-54.
- Castro, L.; Flores, A.; Rodríguez, A.; Aguilar, M., et al. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénagas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5 (3), pp. 33-43.
- Cardenas, C. (2011). Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de Manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyaca. Tesis Doctoral, Pontificia Universidad Javeriana.

- Esquerre, C.; Maturrano, L.; Zavaleta, A. (2003). Arqueas halófilas productoras de betacaroteno aisladas de las salinas de Huacho-Lima. *Ciencia e Investigación*, 6(2), pp. 9-14.
- Fernández, Y.; Zavaleta, A.; Arahall, D. (2003). Bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha- Ayacucho. *Revista Ciencia e Investigación*, 2 (10), pp. 59-63.
- Flores, M.; Zavaleta, A.; Chávez, E. (2010). Bacterias Halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana San Martín. *Revista Ciencia e Investigación*, 2 (13), pp. 87-91.
- Francia O, Alvitres V. (2011). Efecto de la salinidad en la capacidad amilolítica de dos cepas halófilas moderadas SR-35 y SR-55 aisladas de los estanques salinos de la caleta Santa Rosa – Lambayeque. *Ciencia, Tecnología y humanidades, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo*. 2(2), pp. 11-20.
- González, J.; Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii*. *Revista Latinoamericana Microbiología*, 3 (44), pp. 137-156.
- Holt, J., Krieg, N., Snetl, P. & Stanley, J. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA: Baltimore. Williams & Wilkins.
- Ivanova E., Vysotskii M., Svetashev V., et al. (1999). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Internatl Microbiol*, 2(1), pp. 267-271.
- Liu, H., Zhou Y., Liu R., et al. (2009). *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (1) 59, pp. 1460–1464.
- Maturrano, A. (2004). Caracterización de la microbiota de las salinas de Maras, un ambiente hipersalino de los andes del Perú. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Alicante, España.
- Meseguer, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en la biotecnología. *Revista Ciencia e Investigación*, 2 (7), pp. 13-17.
- Ochoa, J.L.; Vázquez Juárez, R. (2004). Las levaduras marinas como herramientas científica y biotecnológica. *Universidad y Ciencia*, 1 (1), pp. 39-50.
- Ramírez, N.; Sandoval, M.; Arahall, D.; Ramírez, H. (2004). Isolation and characterization of halophile actinomycetes from Mexico. International Symposium on Microbial Ecology, ISME-10. Cancun, México.

- Ramírez, N.; Sandoval, H.; Serrano, J. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 3 (37), pp. 56-71.
- Rodríguez-Valera F. (1988). Characteristic and microbial ecology of hypersaline environments, 1, pp. 3-30.
- Sánchez C.; & Arguello H. (2006). Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in Vitro y su posible aplicación en biorremediación en suelos salinos sódicos. *NOVA Publicación Científica*, 4(6), pp. 1-114.
- Sánchez, C.; Mellado, E.; Ventosa, A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 1 (94), pp. 295-300.
- Ventosa, A. (2010). Microbiología de los ambientes acuáticos hipersalinos. *Revista Actualidad*, 50, pp. 24-26.
- Ventosa A, Quesada E, Rodriguez F, Ruiz F. y Ramos A. (1982). Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Journal of General Microbiology*, 128, pp. 1959-1968.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Medios de cultivo para el aislamiento de bacterias y hongos halófilos

Tabla N° 1. Caldo de enriquecimiento SW*

Compuesto	5%	10%
NaBr	0.13	0.26
HNaCO ₃	0.033	0.067
KCl	1.0	2.0
CaCl ₂	0.145	0.289
MgSO ₄ .7H ₂ O	9.89	19.79
MgCl ₂ .6H ₂ O	6.913	13.82
NaCl	39	78
pH	7.0	7.0

*(Rodriguez-Valera, 1985) (g/L)

Para la preparación de medio sólido, se agregó agar al 2%

Tabla N° 2. Agar Sabouraud Dextrosa Modificado (100 mL)

Compuesto	Cantidad
Agua de Sales SW	100 mL
Agar Sabouraud Dextrosa	6.5 g
Agar - agar	1.5 g
pH	5.6 ± 2

Tabla N° 3. Solución de ácido tartárico al 5%

Compuesto	Cantidad
Ácido tartárico	5 g
Agua destilada	100 mL

Medios de cultivo para caracterización bioquímica de bacterias halófilas

Tabla N° 4. Agar Caseína

Compuesto	Cantidad
Agua de Sales SW	100 mL
Caseína	2 g
Agar - agar	1.5 g
pH	7.0

Tabla N° 5. Agar Almidón

Compuesto	Cantidad
Agua de Sales SW	100 mL
Almidón	2 g
Agar - agar	1.5 g
pH	7.0

ANEXO 2

Crecimiento en ausencia de NaCl y a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30%) de bacterias halófilas.

CEPA	0%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	15%	20%	25%	30%
MR 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MR 6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MR 8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR 14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MR 16	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MR 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR 19	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MR 20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 21	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MR 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR 23	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MR 24	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

ANEXO 3

Pozas de cristalización de las Salineras de Maras donde se realizó la toma de muestra.

