



***ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE DE SUELOS EN DOS ZONAS  
DE LA ANTÁRTIDA***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTÁ D.C**

**2018-II**



**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE DE SUELOS EN DOS ZONAS  
DE LA ANTÁRTIDA**

**CLAUDIA LORENA CASTILLO USMA  
ANDREA CAROLINA GUZMÁN FLOREZ**

**MARTHA LUCIA POSADA BUITRAGO, PH.D.**

**Asesora**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTÁ D.C**

**2018-II**

***“En tiempos de cambio, quienes estén abiertos al aprendizaje se adueñan del futuro, mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe.” (Eric Hoffer)***

## **DEDICATORIA**

En la vida encontramos muchos retos, este es uno más que logró superar, debo agradecer infinitamente a Dios por guiarme siempre por el mejor camino, a mis padres por estar siempre para mi y no soltar mi mano, a mi hermano por ser mi compañía, ellos, que soportaron mis lágrimas y me apoyaron cuando decaí, gracias por ser parte de mi vida y mis procesos.

***Claudia Lorena Castillo Usma***

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y brindarme salud para lograr mis objetivos, dedico este trabajo de grado a mi madre Ruth Florez, a mi padre Oswaldo Guzman Yepez y a mi hermano Oswaldo Guzman Florez, por ser los principales autores de mi formación personal y profesional, por su apoyo, cariño y dedicación. A Camilo López, por ser mi fortaleza, en todo momento y brindarme su amor incondicional, sin ustedes no hubiera sido posible cumplir este sueño.

***Andrea Carolina Guzman Florez***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por protegernos durante todo nuestro camino y darnos fuerzas para superar todos los obstáculos y dificultades, culminando exitosamente esta etapa de nuestras vidas.

Al docente Edison Tello, por permitirnos trabajar con las muestras en convenio con la Universidad de la Sabana.

A nuestras familias por ser el pilar base para nuestra formación académica profesional, sin ellos hoy no sería posible la elaboración de este trabajo de grado.

Nuestros más sinceros agradecimientos a nuestra asesora Martha Lucia Posada Buitrago, por habernos confiado este proyecto, por su paciencia y su valiosa dirección desde el inicio hasta la finalización del mismo, su experiencia y motivación han sido fundamentales para lograr nuestros objetivos.

A la profesora ligia Consuelo Sánchez, por su apoyo, cariño y sabiduría, sin ella no sería posible terminar esta etapa.

A la universidad Colegio mayor de Cundinamarca por ser nuestro segundo hogar, y a su laboratorio central por acogernos en sus instalaciones, mil gracias por su apoyo constante, por abrirnos las puertas para formarnos profesionalmente y poder obtener el título en Bacteriología y laboratorio clínico.

***Claudia Lorena Castillo Usma***

***Andrea Carolina Guzman Florez***

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pg</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b>	<b>23</b>
2.1. Antártida	23
2.1.2. Tratado Antártico	26
2.1.3 Suelo antártico	27
2.2 Isla Decepción	29
2.3 Isla Livingston	30
2.4. Microorganismos extremófilos	31
2.5. Clasificación de los microorganismos según la temperatura	32
2.5.1 Microorganismos psicrófilos	32
2.5.2 Microorganismos termófilos	34
2.5.3 Hongos psicrófilos	35
2.6. Identificación molecular de microorganismos mediante amplificación y secuenciación.	36
2.6.1. Extracción de ADN.	36
2.6.2 Amplificación de ADN mediante PCR	36
2.6.3 Pasos para realizar Amplificación de ADN mediante PCR	37
2.6.4. Secuenciación de productos de amplificación	38
2.6.4.1 Secuenciación mediante el método Sanger.	38
<b>3. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>39</b>
3.1 Universo, población, muestra	39
3.2 Hipótesis, Variables, indicadores	39
3.3 Técnicas y procedimientos	40
3.3.1 Tratamiento de la muestra	41
Fase 1. Muestreo	41
Fase 2. Aislamiento microbiológico en caldos	43
Fase 3. Estudio macroscópico y microscópico	46
Fase 4. Aislamiento en Medios de cultivo	47
Fase 5. Identificación BBL CRYSTAL	47
Fase 5.1 Alistamiento de las muestras para biología molecular	47
Fase 6. Biología molecular	48

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>50</b>
4.1 Crecimiento de las muestras provenientes de la isla livingston y Decepción en medio de cultivo líquido.	50
4.2 Obtención de cepas puras provenientes de las islas Livingston y Decepción de la Antártida.	53
4.3 Microorganismos identificados con BBL Crystal	57
4.3 Electroforesis de productos de PCR de la región 16S rRNA a partir del ADN extraído de cepas aisladas de muestras provenientes de las Islas Livingston y Decepción en la Antártida. Los productos de PCR presentan el tamaño esperado, 1500pb-1800pb.	58
4.4 Resultado de la secuenciación de los productos de amplificación de PCR .	59
4.3 Crecimiento en medios de cultivo (aislamiento fúngico).	62
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>85</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pg
<b>Figura 1.</b> Continente antártico y sus límites	23
<b>Figura 2.</b> Paisaje Antártico plantas y animales	24
<b>Figura 3.</b> Microorganismos en suelo antártico	25
<b>Figura 4.</b> Reclamación territorial	26
<b>Figura 5.</b> Suelo árido de McMurdo Dry Valley	28
<b>Figura 6.</b> Ubicación geográfica isla Decepción	29
<b>Figura 7.</b> Ubicación geográfica isla livingston	30
<b>Figura 8.</b> Relación entre tasa y temperatura de crecimiento microbiano	33
<b>Figura 9.</b> Pasos para extracción de ADN	36
<b>Figura 10.</b> Pasos para la realización de una PCR.	37
<b>Figura 11.</b> Técnica de secuenciación mediante el método de Sanger	38
<b>Figura 12.</b> Procedimiento general de muestras provenientes de la isla Livingston y decepción de la Antártida	40
<b>Figura 13.</b> Ubicación geográfica del muestreo realizado en la isla Livingston.	41
<b>Figura 14.</b> Ubicación geográfica del muestreo realizado en la isla Decepción.	42
<b>Figura 15.</b> Muestra de sedimento previa al procesamiento.	42
<b>Figura 16.</b> Procedimiento para siembra de las muestras en medios de cultivo líquido Isla Decepción	43
<b>Figura 17.</b> Procedimiento para siembra de las muestras en medios de cultivo líquido Isla Livingston	44
<b>Figura 18.</b> Aislamiento microbiológico en caldos (tubos falcon y eppendorf)	45
<b>Figura 19.</b> Medios de cultivo sólidos para el aislamiento de muestras	47
<b>Figura 20.</b> Visualización del crecimiento en medios de cultivo líquidos a las tres semanas de incubación (criterio turbidez)	50
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de microorganismos bacterianos recuperados de muestras de las islas Livingston y Decepción en medios líquidos	51
<b>Figura 22.</b> Comparación de crecimiento bacteriano según medios de cultivos líquidos, Isla Livingston	51
<b>Figura 23.</b> Comparación de crecimiento bacteriano según medios de cultivo Isla Decepción	52
<b>Figura 24.</b> Imágenes de láminas de gram de cepas puras aisladas de muestras de sedimentos provenientes de la Isla Livingston	53
<b>Figura 25.</b> Imágenes láminas de gram de cepas puras aisladas de muestras de sedimentos provenientes de la isla Decepción	54
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de crecimiento de cepas bacterianas puras, obtenidas de la muestra proveniente de la Isla Decepción en la Antártida según temperatura	55
<b>Figura 27.</b> Porcentaje de crecimiento de cepas bacterianas puras, obtenidas de la muestra proveniente de la Isla Livingston, según temperatura	55
<b>Figura 28.</b> Clasificación de bacterias provenientes de la Isla Livingston según coloración de Gram	56

<b>Figura 29.</b> Clasificación de bacterias provenientes de la muestra de la isla Decepción según coloración de Gram	57
<b>Figura 30.</b> Corrida de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, de ADN genómico extraído mediante el Kit WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION, a partir de cepas bacterianas provenientes de muestras de suelos de las islas Livingston y Decepción	58
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de crecimientos de microorganismos bacterianos Vs fúngicos de muestras provenientes de la Islas Livingston	62
<b>Figura 32.</b> Características Microscópicas y Macroscópicas del microorganismo fúngico aislado ( <i>Penicillium</i> sp)	63

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pg
<b>Tabla 1.</b> Cálculos para Master Mix para realizar PCR	48
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de PCR para la amplificación de la región 16S	49
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de identificación de sistema BBL Crystal	57
<b>Tabla 4.</b> Recopilación de resultados finales	59



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

***ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE DE SUELOS  
EN DOS ZONAS DE LA ANTÁRTIDA***

**RESUMEN**

La Antártida, continente blanco del hemisferio Austral, cuenta con 14 millones de km<sup>2</sup>, es la reserva de agua dulce más abundante del mundo y punto de equilibrio de los ecosistemas, presenta factores climáticos extremos para la vida lo que lo convierte en un campo abierto para la investigación científica.

En este continente, los suelos poseen gran diversidad bacteriana, con escasa identificación; Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo principal estudiar la diversidad de microorganismos cultivables provenientes de suelos de la isla Livingston y Decepción en la Antártida. La identificación de los organismos procariotas se logró mediante microbiología tradicional y secuenciación del producto de amplificación por PCR de la región 16S del rRNA.

Se aislaron 20 microorganismos bacterianos provenientes de estas Islas, de los cuales se identificaron tres géneros Bacterianos por microbiología convencional: *Salmonella* sp., *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp. y *Acinetobacter* sp. y un microorganismo de origen fúngico perteneciente al género *Penicillium* sp.

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Chromas (2.6.5) y comparadas con el GenBank a través del algoritmo BLASTn. Se identificaron 17 microorganismos del total de aislados, pertenecientes a 11 géneros bacterianos distribuidos en las dos islas; 8 géneros correspondientes a la Isla Decepción: *Staphylococcus*, *Oceanisphaera*, *Paeniglutamicibacter*, *Microbacterium*, *Sporosarcina* y 6 géneros a la isla Livingston: *Burkholderia*, *Bacillus*, y *Acinetobacter*, de los géneros identificados tres coincidieron para ambas islas *Brevundimonas*, *Arthrobacter* y *Pseudomonas*.

La excepcional plasticidad genómica de estos microorganismos, proporciona a la comunidad científica el potencial para futuros estudios relacionados con bioprospección.

**Palabras claves:** Antártida, suelo, isla Livingston, isla Deception, cultivo microbiológico, microorganismos bacterianos, microorganismo fúngico, secuenciación de productos de PCR.

**Estudiantes** Claudia Lorena Castillo Usma

Andrea Carolina Guzmán Florez

**Docente** Martha Lucia Posada Buitrago

**Fecha** 2018 – II

**Institución** UCMC



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

***ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE DE SUELOS EN DOS  
ZONAS DE LA ANTÁRTIDA***

**ABSTRACT**

Antarctica, white continent of the southern hemisphere, has 14 million km<sup>2</sup>, is the reserve of fresh water, most abundant, world and equilibrium point of ecosystems, has extreme climatic factors for life which makes it an open field for Scientific research.

In this continent, the soils have great bacterial diversity, with little identification; With regard to the diversity of microorganisms from the island of Livingston and Deception in Antarctica. The identification of prokaryotic organisms is carried out by means of traditional microbiology and sequencing of the PCR amplification product of the 16S rRNA region.

We isolated 20 bacterial microorganisms from these islands, of which four Bacterial genera were identified by conventional microbiology: Salmonella sp., Burkholderia sp., Bacillus sp. and Acinetobacter sp. And a microorganism of fungal origin belonging to the genus Penicillium sp.

The sequences were edited with the Chromas program (2.6.5) and compared with the GenBank through the BLASTn algorithm. Seventeen microorganisms were identified from the total of the isolates, belonging to 11 bacterial genera distributed in the two islands; 8 genera corresponding to Deception Island: Staphylococcus, Oceanisphaera, Paeniglutamicibacter, Microbacterium, Sporosarcina and 6 genera to Livingston Island: Burkholderia, Bacillus, and Acinetobacter, and the genera of it coincide.

The exceptional genomic plasticity of these microorganisms, the results of scientific research and the potential for future studies related to bioprospecting.

**Keywords:** Antarctica, soil, Livingston Island, Deception Island, microbiological culture, bacterial microorganisms, fungal microorganism, sequencing of PCR products.

## INTRODUCCIÓN

A medida que se exploran los entornos extremos, la riqueza de las comunidades microbianas es cada vez más evidente, la Antártida es tal vez el mejor referente, ya que aparte de ser un continente remoto e inhóspito, presenta el clima más frío y seco que se conoce actualmente en el planeta Tierra, además de tener una baja disponibilidad de agua, ciclos frecuentes de congelación-descongelación y alta incidencia de radiación UV, siendo estos factores limitantes para la vida. <sup>6</sup>

El suelo es la parte superior de la corteza de la tierra. Para el caso del continente antártico, donde se encuentran los suelos más fríos, secos y salinos del planeta, actualmente se reconocen dos tipos de suelo, crisoles y litosoles suelos poco desarrollados con un perfil A/C. Los suelos antárticos están compuestos por materia mineral, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos y la cantidad de ellos varía según su localidad, por lo general la materia orgánica y mineral forman una porción inanimada que es relativamente fija del continente, sin embargo, la proporción de agua y aire varía y con ella también la tasa de crecimiento de los microorganismos <sup>7</sup>.

Son precisamente las condiciones extremas de los suelos antárticos, las que abren una gran oportunidad para realizar investigaciones científicas importantes en el campo de la microbiología, las cuales centran su atención en la identificación de microorganismos, con el fin de obtener bioproductos para su aplicación en una amplia gama de procesos de bioprospección. Por ello en el presente trabajo se estudió la diversidad de microorganismos cultivables provenientes de suelos de la isla Livingston y Decepción en la Antártida. La identificación de los organismos procariontes se logró mediante microbiología tradicional y secuenciación del producto de amplificación por PCR de la región 16S del rRNA.

Se aislaron 20 microorganismos bacterianos provenientes de estas Islas, dentro de los cuales se destaca el crecimiento de organismos poli-extremófilos y de



organismos fúngicos; las técnicas utilizadas fueron óptimas para la obtención de los resultados, también cabe resaltar el desarrollo de tres géneros presentes en ambas islas evidenciando su distribución en el continente. Con los resultados de esta investigación se tiene una base sólida para futuros estudios de bioprospección.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la diversidad de microorganismos cultivables proveniente de suelos de las islas Livingston y Decepción en la Antártida.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Recuperar microorganismos por medio de técnicas microbiológicas de dos muestras de suelos provenientes de las islas Livingston y Decepción en la Antártida.
- Identificar los organismos aislados por medio de la secuenciación parcial del gen 16S rRNA.
- Comparar la diversidad microbiana presente en las muestras de los suelos provenientes de las islas Livingston y Decepción.

## 1. ANTECEDENTES

En el año 2006, Aislabie et al., realizaron un aislamiento microbiológico implementando medio de cultivo R2A de muestras de suelo en la Antártida, recolectadas de cuatro lugares diferentes de la isla Victoria Land, en Marble Point (77°25' S 163°41' E), Bull Pass (77°31' S 161°52' E), Mt Fleming (77°33' S 160°17' E) y, cerca al lago Vanda (77°31' S 161°40' E), para la identificación de los aislados se realizó una extracción de ADN bacteriano y una amplificación por PCR del gen 16S rRNA arrojando como resultado el predominio de géneros *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Arthrobacter* y *Cyanobacteria* <sup>11</sup>.

Zhou et al., en 2013, demostraron la existencia de comunidades bacterianas presentes en los sedimentos costeros del continente Antártico, Para llegar a esta conclusión, se recolectaron ocho muestras de sedimentos costeros de la isla del Rey Jorge y la Bahía Maxwell; la recolección se hizo utilizando un muestreador de agarre de sedimentos, se sembraron sobre placas de cribado, con un medio compuesto de extracto de levadura, caseína de gelatina, agar en polvo y agua de mar artificial (pH 8,0). Las placas se incubaron a 15°C, logrando cultivar tan sólo tres géneros bacterianos *Bacillus*, *Flavobacterium* o *Lacinutrix*, la identificación se complementó utilizando la región 16S del rRNA, los genes fueron amplificados por PCR con los cebadores 27F y 1492R, en total, se identificaron 23 géneros de *Bacteroidetes*, de los cuales cinco cepas eran desconocidas, y pertenecían a los filos Firmicutes, Bacteroidetes, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* <sup>12</sup>.

En este mismo año, Navas J. realizó un trabajo de investigación con suelos y arena de la Antártida de las Islas Greenwich y Dee, se aislaron 89 hongos en total, en medios PDA y MALTA, sometidos a dos temperaturas de incubación 4°C y 26°C obteniendo de esta forma 51 hongos aislados de suelo de la

Antártida y nueve de arena. En cuanto a temperatura se refiere, se aislaron 54 hongos a 26°C, mientras que 35 se aislaron a 4°C. Con el fin de comparar crecimiento y viabilidad, se llegó a la conclusión que la mayoría de hongos aislados pertenecen al grupo de psicrófilos y psicrótrofos con más del 74%. De los 35 hongos aislados a 4°C, 22 fueron ubicados como psicrótrofos, 10 como psicrófilos y apenas 3 fueron mesófilos <sup>13</sup>

Tomova et al, en el año 2014, aislaron 24 cepas bacterianas de muestras procedentes de suelo ornitogénico de la isla Galíndez y de sedimento de la isla Deception, recolectadas durante las expediciones de investigación Antártica 2008 y 2010. Para la identificación microbiológica se implementó caldo R2A y caldo nutritivo para obtener colonias puras; posteriormente, también se realizó secuenciación de alto rendimiento (ADNr 16S). Los resultados revelaron la afiliación de los microorganismos aislados a *Gammaproteobacteria* (54.2%), *Betaproteobacteria* (8.3%), *Firmicutes* (20.8%) y *Actinobacteria* (16.7%). adicionalmente la mayoría de los aislamientos (92%) son psicrotolerantes, y 75% son halotolerantes <sup>14</sup>

González A., en el 2014, examinó 44 cepas provenientes de muestras de suelo de la isla Rey Jorge en la Antártida, entre hongos y levaduras, de las cuales identificó siete correspondientes a hongos filamentosos. Para su recuperación inicial, utilizó los medios R2A, PDA Y DRBA, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente; posteriormente realizó una extracción de ADN con el método de fenol cloroformo y llevó a cabo una PCR utilizando la región ITS1-5.8S-ITS2 rADN. Los resultados mostraron un 55% correspondiente al género *Penicillium*, un 22,2% al género *Aspergillus*, y un 11,1% para cada uno de los géneros *Geomyces* y *Trichoderma* <sup>15</sup>

Kim et al, en el año 2015, investigaron la microbiota bacteriana alrededor de la bahía *Terra Nova* de Victoria Land mediante el método de pirosecuenciación, donde recuperaron 55.999 secuencias de alta calidad de 42 muestras de suelo, seis filos bacterianos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*,

*Cyanobacteria* y *Bacteroidetes*. El mayor nivel de diversidad bacteriana se observó cerca de la estación de Jang Bogo (índice de Shannon = 5,47), mientras que el más bajo se encontró en una ladera orientada al sur (índice de Shannon = 3,25) <sup>16</sup>.

En el mismo año, Javani *et al*, identificaron cuatro bacterias antárticas psicrófilas *Psychrobacter sp.*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas veronii* y *Yersinia kristensenii*, obtenidas de aguas fusionadas y congeladas de la isla Rey Jorge en la Antártida. Para su aislamiento, se utilizaron medios nutritivos convencionales, extracto de carne modificado con bacto-peptona y NaCl y se incubaron a 4°C, hasta que los cultivos lograron la fase estacionaria. Posteriormente, las bacterias fueron identificadas mediante secuenciación del gen 16S ADN y fueron comparadas con la base de datos de nucleótidos del GenBank mediante el algoritmo BLAST <sup>17</sup>.

Para el año 2017, See-Too *et al*, identificaron una nueva cepa del género *Pseudomonas* mediante el análisis de tres muestras de suelo en dos islas del continente Antártico, *Lagoon* y *Anchorage*. Inicialmente se utilizaron técnicas microbiológicas para el enriquecimiento con C6-HSL sintético como única fuente de carbono. A la semana de incubación, se obtuvieron tres cepas, codificadas como L10.10T, A4R1.5 y A4R1.12, se sometieron a un estudio taxonómico polifásico, y se clasificaron en el género *Pseudomonas* dentro de la clase *Gammaproteobacteria* de acuerdo con 16S rRNA. Los datos genómicos, filogenéticos, quimiotaxonómicos y fenotípicos obtenidos mostraron presencia una nueva especie cuyo nombre es *Pseudomonas versuta* sp. nov <sup>18</sup>.

En el 2018, Gomes *et al*, identificaron y caracterizaron la diversidad y distribución de hongos presentes en cinco muestras de suelo superficial, en las islas Robert, Nelson, Rey Jorge y Penguin en el archipiélago de las Shetland del Sur. Las muestras presentaban profundidades que iban de cero a diez centímetros; se realizó un aislamiento primario sembrando en el medio YM, posteriormente los hongos aislados se identificaron por biología molecular con

los cebadores universales ITS1 e ITS4, obteniendo de esta forma *Saccharomyces cerevisiae* en el suelo obtenido de la isla Nelson y *Pseudogymnoascus destructans* y nuevas especies de *Pseudogymnoascus* en todos los sitios de muestreo, con éstos, determinaron sus capacidades para producir compuestos bioactivos contra enfermedades tropicales desatendidas. Cabe resaltar, que los aislamientos de *P. destructans* mostraron actividades tripanocidas, lo que indica que pueden ser una fuente prometedora de compuestos bioactivos para la quimioterapia contra las enfermedades tropicales desatendidas como Leishmaniosis y Chagas <sup>19</sup>

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1. Antártida

La Antártida, cuyo nombre significa "opuesto al Ártico", es el continente más ventoso y frío del mundo, registra las temperaturas más bajas, fue el último en ser descubierto y es el cuarto continente más grande del planeta tierra, limita con los océanos Atlántico, Índico y Pacífico y el océano Glacial Antártico <sup>20</sup>.

Se encuentra ubicado al sur del paralelo 60°S y tiene un área de 14 millones de Km<sup>2</sup> en verano, y alcanza hasta 30 millones de km<sup>2</sup> en invierno; se encuentra circunscrito por el Círculo Polar Antártico, en el paralelo 66°33' de latitud Sur, y el 98% de su superficie está cubierta permanentemente de hielo y representa la mayor reserva de agua dulce del planeta, solo el 2% de su área no cuenta con la presencia de hielo, porcentaje que se encuentra distribuido únicamente en las costas del continente <sup>21</sup>.



**Figura 1.** Continente antártico y sus límites, Tomada de Expedición 2009 - Ecuador a la Antártida, 4.897msnm Vinson Massif (21)

La Antártida es objeto de investigación porque presenta condiciones hostiles para la vida, la temperatura media se sitúa alrededor de los  $-17^{\circ}\text{C}$ , y actualmente cuenta con la temperatura mundial más baja registrada  $-89^{\circ}\text{C}$ , en la base rusa Vostok el día 24 de agosto de 1960. El continente presenta la altitud media más alta con una altitud de 2.600 m.s.n.m. y cabe mencionar que cuenta con una mínima exposición a los rayos de luz solar debido a la oblicuidad de los rayos solares por la escasa altura que alcanza el sol sobre la línea del horizonte <sup>22</sup>.

Son pocas las especies pertenecientes al reino animal y vegetal que logran adaptarse a este medio: focas, pingüinos, ballenas azules, calamares y medusas gigantes hacen parte de los animales que habitan en este lugar; por otra parte, las especies vegetales incluyen alrededor de 30 musgos; los líquenes constituyen otra parte importante de la microflora con más de 150 especies descritas, y algas multicolores adornan el paisaje de las costas de este continente <sup>23</sup>.

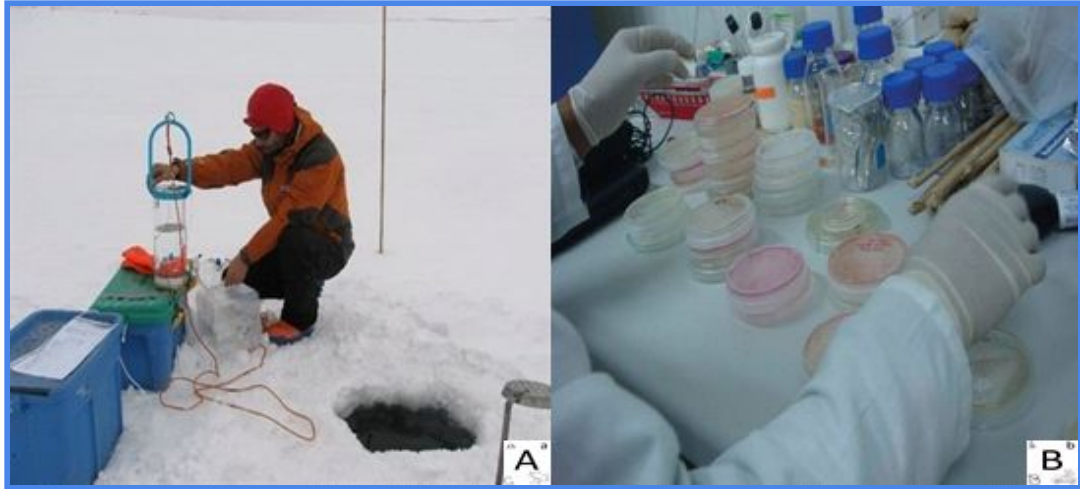


**Figura 2.** Paisaje Antártico plantas y animales. a Vegetación, 2.b pingüinos Antártida, tomada de “Biodiversidad en la Antártica” Universidad de Magallanes (Burgos C, 2016) (23)

Los microorganismos también hacen parte de la Antártida y están constantemente sometidos a ambientes extremos, los cuales generan niveles elevados de estrés, factores como la alta salinidad, la escasa disposición de nutrientes, la disminución del pH y las bajas temperaturas, son varios de los criterios a tener en cuenta al momento de realizar la recuperación de



microorganismos, dado que estas condiciones juegan un papel fundamental en la evolución de estas comunidades <sup>24</sup>.



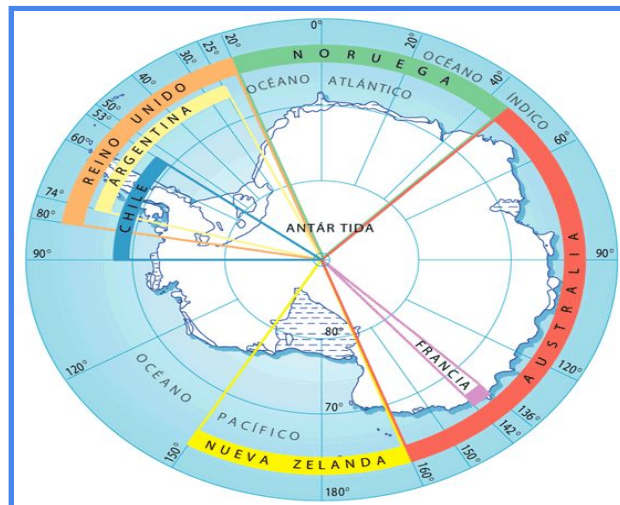
**Figura 3.** Microorganismos en suelo antártico 3a. Método de recolección de muestras tomado de Revista Europa press “Dispersión colonización microorganismos Antártida” (2018), 3b material para el aislamiento. (24)

Sin duda la Antártida es un lugar de especial interés científico, político y militar, de posibilidades inexploradas para distintas ciencias. Gracias al Tratado Antártico firmado el 1 de diciembre de 1959 por 12 naciones en Washington <sup>25</sup> que entró en vigencia el 23 de junio de 1961, para proteger el continente de cualquier actividad militar, nuclear o la eliminación de desechos radiactivos, y se declaró este territorio exclusivamente dedicado a fines pacíficos; Colombia hace parte de este tratado internacional desde 1989 <sup>26,27</sup>.

### 2.1.2. Tratado Antártico

Entre 1939 y 1945, durante la Segunda Guerra Mundial, la actividad militar se intensificó en el continente Antártico, el Tratado Antártico se firmó en Washington el primero de diciembre de 1959, pero entró en vigor el 23 de junio de 1961. Se considera el primer tratado de control de armas en la Guerra Fría, su objeto es la prohibición de toda clase de medidas de carácter militar en ese territorio, contempla la imposibilidad de establecer bases, ensayos y almacenamiento de armas y desechos radioactivos, al mismo tiempo prohíbe la explotación comercial de recursos, como son el petróleo y otros minerales <sup>28</sup>

Establece el principio de libertad de la investigación; Colombia mediante la Ley 67 de 1988 se une a dicho tratado en 1989, haciendo parte consultiva del Sistema del Tratado Antártico (STA), y adquiriendo el derecho a decidir en los aspectos que afectan al continente <sup>29</sup>



**Figura 4.** Reclamación territorial, Antártida (29)

### 2.1.3 Suelo antártico

Los suelos antárticos se encuentran entre los más antiguos, fríos y secos del planeta, por lo que la formación de estos es extremadamente lenta, y está influenciada principalmente por el clima gélido del continente y la falta de humedad en el mismo, por lo anterior se debe esperar aproximadamente un milenio para que se forme 1 cm de suelo <sup>30</sup>.

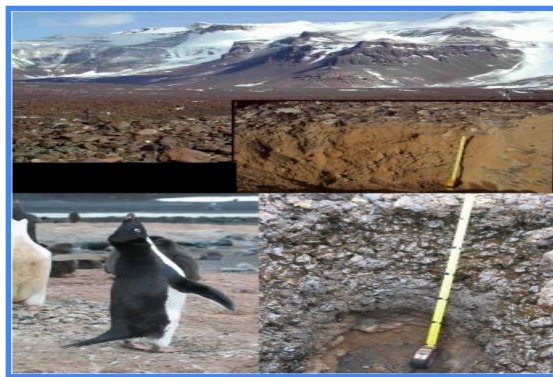
La primera muestra de "tierra" aparentemente sin vida, fue recolectada por Shackleton en su viaje de 1907-1909, pero fue solo hasta finales del siglo XX cuando científicos acordaron que se trataba verdaderamente de suelo. En 1997, fueron clasificados como (Gelisoles) en la taxonomía de suelos de los Estados Unidos. Otro dato a resaltar, es la elaboración del primer mapa del suelo en South Victoria Land producido por McCraw para Taylor Valley <sup>31</sup>.

Actualmente, se reconocen dos tipos de suelos en este continente, el primero de ellos y el más extenso corresponde a los "suelos frígidos" o "desprovistos de humus", el segundo grupo, lleva una cubierta delgada de plantas en la superficie y son conocidos como, "suelos *protoranker*". <sup>31</sup> Los suelos antárticos sin hielo representan solo el 0.18% del área continental, sin embargo, son los sitios donde históricamente ha ocurrido la mayor parte de la actividad humana.

La mayoría son oligotróficos y pocos organismos pueden sobrevivir. Los suelos están sometidos a cambios constantes y drásticos en la temperatura, tienen alta incidencia de radiación solar y acumulación constante de sales, estas últimas presentes al igual que en otras regiones áridas de la tierra <sup>20</sup>. En la mayoría de los suelos, especialmente en las zonas montañosas de la Antártida y en el este costero del continente, la evaporación excede la precipitación y las sales solubles se acumulan dentro del perfil del suelo siendo indicadores muy importantes de las condiciones climáticas pasadas y presentes en la Antártida <sup>32</sup>.

Diversos estudios han evidenciado la existencia de más de treinta sales, pero solo diez de ellas prevalecen en el Continente blanco, estas son sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sulfato de calcio hidratado ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ),

carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), darapskita ( $\text{NaNO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), nitato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), decahidrato de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), bloedita ( $\text{Na}_2\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), heptahidrato de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y sulfato de magnesio hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Por otra parte, las sales que predominan en las zonas costeras son en gran parte cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), con algo de sulfato, carbonato y cationes bivalentes como el magnesio ( $\text{Mg}$ ), presentes sólo en pequeñas cantidades. Aunque los suelos de la Antártida se describen comúnmente como alcalinos, existe una buena correlación entre el pH y la proporción de cloruro/sulfato en las sales solubles: cuanto menor es el pH menor la relación cloruro/sulfato <sup>32</sup>

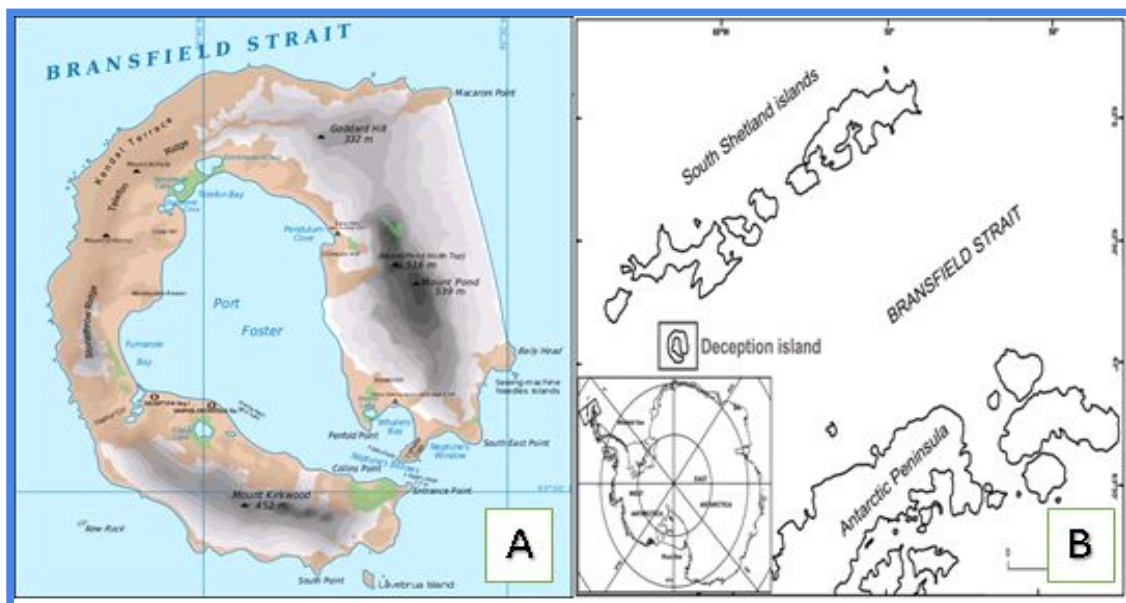


**Figura 5.** Suelo árido de McMurdo Dry Valley (5.a); Marítimo y paisaje influenciados por los pingüinos antárticos marítimos (5.b). Fotos de Megan Balks (33)

A pesar de las condiciones extremas de estos tipos de suelos y sus características inusuales, han sido fuentes principales para descubrir y recuperar comunidades microbianas, las cuales han servido para investigaciones relacionadas con la microbiología y la biotecnología industrial.

## 2.2 Isla Decepción

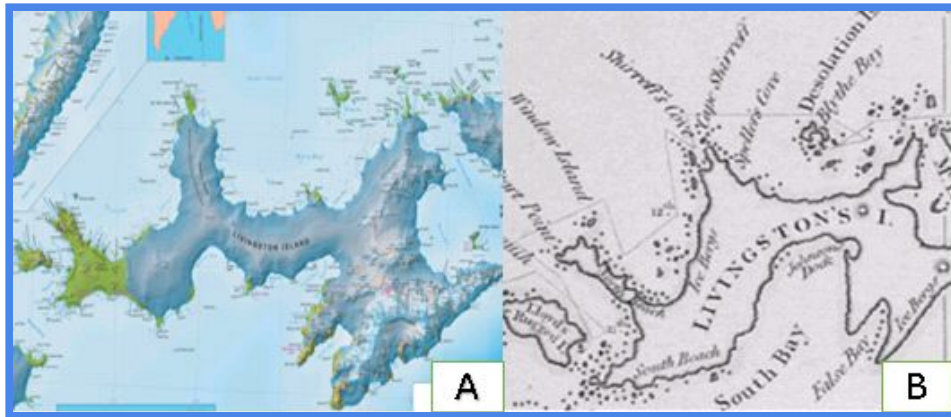
Localizada al suroeste del archipiélago de las Shetland del Sur ( $62^{\circ}57'S$ ,  $60^{\circ}38'W$ ), la isla cuenta con un diámetro de  $15 \text{ km}^2$  y una elevación máxima de  $539 \text{ m.s.n.m.}$  en Mount Pond.<sup>34</sup> Cerca del 57% de la isla está cubierta por glaciares y el área restante de aproximadamente  $47 \text{ km}^2$  está libre de ellos, toda la isla es la parte superior de un volcán activo semisumergido, estructuralmente tiene forma de herradura, cuyo espacio central es el cráter volcánico de  $7 \text{ km}^2$  inundado por el mar<sup>34</sup>



**Figura 6.** Ubicación geográfica isla Decepción. (34)

El espesor del permafrost está entre 3 y 25 m en la Isla y como resultado de erupciones recientes, la Isla Decepción está cubierta por cenizas volcánicas y piroclastos. Estas características están fuertemente influenciadas por los restos piroclásticos de alta porosidad de la isla, que muestran un alto contenido de hielo en la base de la capa activa<sup>34</sup>

### 2.3 Isla Livingston



**Figura 7.** Ubicación geográfica isla livingston A. Mapa topográfico. (35)

Livingston ( $62^{\circ}39'S$ ,  $60^{\circ}21'W$ ) es la segunda isla más grande del archipiélago de las Shetland del Sur, en el Océano Austral que se encuentra cerca la Península Antártica, la isla tiene alrededor de 60 km de largo y 34 km de ancho, se encuentra ubicada a 20km de la isla Decepción y colinda con las islas Snow y Greenwich; presenta un relieve variable con costas altas e inalcanzables, 10% de su superficie está libre de hielo (zona montañosa). El archipiélago está separado de la Península Antártica por el estrecho de Bransfield y de América del Sur por el Pasaje Drake. Se extiende desde  $61^{\circ}$  a  $63^{\circ}$  de latitud sur y de  $54^{\circ}$  a  $63^{\circ}$  de longitud oeste <sup>35</sup> Las temperaturas medias anuales son de  $-2.8^{\circ}C$  con temperaturas medias en verano por encima del punto de congelación, y la temperatura media máxima es de  $4.3^{\circ}C$ . La precipitación media anual es de 444.5 mm, con un 75% de caída en verano y otoño.<sup>36</sup> El espesor de la capa activa del permafrost depende fuertemente de la altura, los valores van desde 2-3 m hasta 275 m <sup>37</sup>

## 2.4. Microorganismos extremófilos

El término extremófilo fue usado por vez primera por Macelroy en 1974 <sup>40</sup> y hace referencia a los microorganismos capaces de colonizar ambientes inhóspitos para la mayoría de formas de vida. Dicho término abarca un gran número de organismos que a su vez están clasificados según ciertos parámetros como el pH bajo (acidófilos pH menor de 4), pH elevado (alcalófilos pH por encima de 8), temperaturas bajas (psicrófilos o criófilos 15°C o menores), temperatura elevada (termófilos 55 a 121°C), altas presiones barométricas (barófilos o piezófilos, los cuales prosperan a altas presiones que oscilan entre los 300 bares ó 290 atmósferas en las profundidades del mar) <sup>41</sup>.

A pesar de las condiciones extremas, los microorganismos logran llevar a cabo su actividad metabólica, lo cual genera un gran interés para la comunidad científica <sup>42</sup>.

Entre los microorganismos que logran adaptarse a estos nichos ecológicos extremos se encuentran miembros que hacen parte de los tres dominios de la vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* <sup>41</sup>. Establecerse en este tipo de condiciones ambientales principalmente obedece a mutaciones genéticas, y transferencia horizontal de genes, la cual les permite a los microorganismos el intercambio de ADN entre diferentes especies <sup>40</sup>.

## **2.5. Clasificación de los microorganismos según la temperatura**

Los microorganismos, basados en la temperatura que soportan, se clasifican en psicrófilos, mesófilos y termófilos. Los psicrófilos y los termófilos son aquellos que se adaptan a las regiones con temperaturas extremas, donde solo unos pocos organismos podrían sobrevivir <sup>39</sup>.

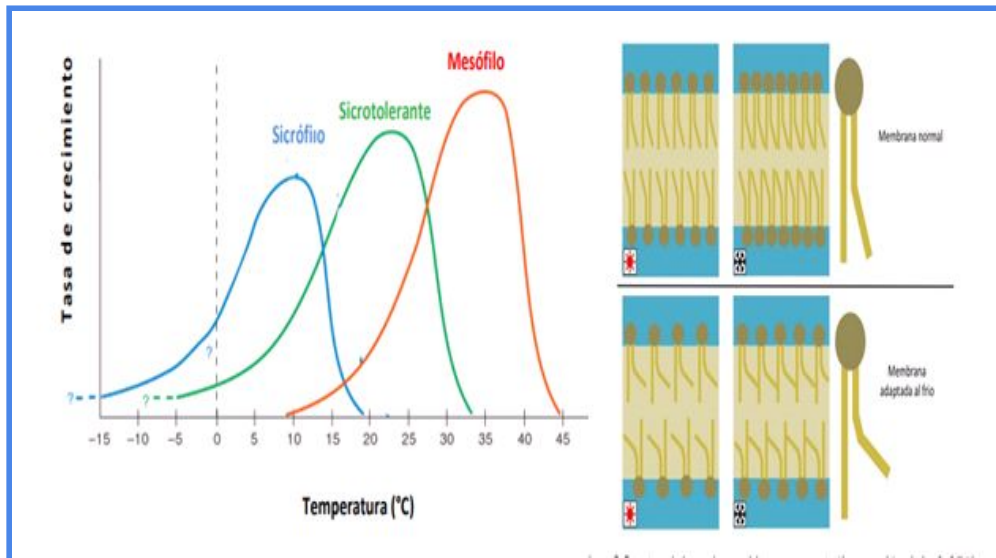
### **2.5.1 Microorganismos psicrófilos**

Los psicrófilos hacen parte de los microorganismos extremófilos de bajas temperaturas, se clasifican como psicotolerantes si crecen en temperaturas superiores 25°C, pero también a 15°C, y psicrófilos si crecen a temperaturas entre 10°C a 20°C <sup>43,44</sup>, aunque pueden crecer a temperaturas por debajo de 5°C. En estas temperaturas su actividad metabólica es necesaria para asegurar procesos de descomposición de materia orgánica y proporcionar nutrientes a las plantas por lo que juegan un papel fundamental en el ciclo del carbón en los ecosistemas de las regiones polares <sup>44,45</sup>.

El habitar en condiciones donde el clima oscila por debajo de los 0°C, implica que los microorganismos han superado barreras como el transporte alterado de nutrientes, fallas en los procesos del ciclo celular, incluyendo transcripción, traducción, y plegamiento de proteínas, todo esto a causa de la disminución de la fluidez membranal; esta adaptación a bajas temperaturas se da gracias a las proteínas de tipo anticongelantes (AFP), las cuales evitan la formación de cristales de hielo sobre la membrana del microorganismo ayudándolo a sobrevivir en respuesta al cambio climático a través de la acumulación de lípidos insaturados mediante la formación de dobles enlaces entre ellos, lo que impide la compactación de las cadenas, manteniendo así la fluidez de la membrana, y la acumulación de glicerol como un crioprotector en bajas temperaturas <sup>46,47,48</sup>; estos ácidos grasos corresponden a ácido eicosapentanoico (20:5 ω3) (EPA) o el ácido docosahexaenoico (22:6 ω3) (DHA) <sup>57</sup>.



Los psicrófilos tienen en su genoma un mayor porcentaje de adenina y timina, lo cual hace que las cadenas se unan de manera menos estable, permitiendo que a pesar del frío, se puedan separar para realizar la transcripción y la posterior traducción.



**Figura 8.** Relación entre tasa y temperatura de crecimiento. (57)

Según estudios realizados durante las últimas décadas, los microorganismos más comúnmente encontrados en suelos antárticos son levaduras del género *Cryptococcus* spp. y hongos filamentosos como *Penicillium* y *Cladosporium*, microalgas como *Chloromonas* y bacterias en su mayoría Gram negativas, proteobacterias como *Pseudomonas* spp, y bacteroides como *Cytophaga* y *Flavobacterium* <sup>49</sup>. En aguas profundas es habitual encontrar gran diversidad de microorganismos pertenecientes al dominio Archaea, entre los cuales se destacan los géneros *Methanogenium* y *Methanococcus* <sup>50</sup>. Adicionalmente, se ha evidenciado la presencia de las AFP en la secuenciación de los genomas completos de *Desulfotalea psychrophila*, *Colwellia psychrerythraea* 34H y *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, organismos encontrados en sedimentos marinos de bajas temperaturas <sup>51</sup>.

## 2.5.2 Microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos se desarrollan a una temperatura por encima de los 55°C hasta los 80°C, al sobrepasar esta temperatura los microorganismos son denominados hipertermófilos, generalmente viven en áreas volcánicas y fuentes termales ricas en azufre. La membrana citoplasmática de los termófilos tiene gran cantidad de ácidos grasos saturados, mediante estos se forman enlaces hidrófobos muy estables al calor, lo cual aplica para la mayoría de microorganismos por ejemplo en el dominio Bacteria, presenta alargamiento de las cadenas de ácidos grasos (C18-C24). Por otra parte, la membrana de las Arqueas no tiene ácidos grasos, posee hidrocarburos de cadena larga; Éteres de hidrocarburos unidos al glicol (enlace éter más resistente) <sup>52</sup>.

Entre los microorganismos termófilos encontrados hasta el momento se describen bacterias que tienen gran relevancia como *Thermus aquaticus*, crece a temperaturas mayores de 70°C y es ampliamente utilizada en la industria para la tecnología PCR (Polymerase Chain Reaction) dentro de estos microorganismos extremófilos también se encuentra el dominio Archaea compuesto por dos ramas, *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* de las cuales se desprenden algunos géneros como *Pyrodictium*, *Pyrolobus*, *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus*, *Sulfolobus*, *Methanopyrus*, *Thermococcus*, *Methanothermus* y *Archaeoglobus* <sup>52</sup>.

Las enzimas de los microorganismos termófilos presentan alta estabilidad térmica, debido principalmente a redes de interacciones iónicas, modificaciones de la membrana plasmática, incremento de ácidos grasos saturados, presencia de ramificaciones y ciclos hopanoides (compuestos pentacíclicos similares a los esteroides, cuya función principal es conferir rigidez a la membrana plasmática en procariotas) <sup>40</sup>. Además, proteínas especiales termoestables conocidas como *chaperoninas* contribuyen con la apertura y el cierre de la hélice de ADN, evitando su desnaturalización <sup>40,53</sup>.

### **2.5.3 Hongos psicrófilos**

Los hongos son capaces de crecer y sobrevivir a bajas temperaturas y existen ampliamente en hábitats polares y no polares, se caracterizan por ser miembros de simbiosis mutualistas. La Antártida se encuentra en un proceso de congelación y descongelación frecuente, sin embargo, la mayoría de los hongos se adaptan a estas condiciones al desarrollar diversas estrategias en su metabolismo y fisiología, y se han identificado en diferentes hábitats del continente incluyendo suelos, lodos y lagos congelados.

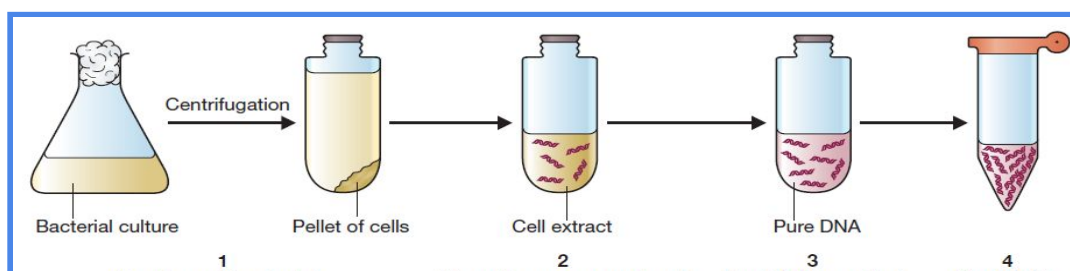
La distribución de hongos en la Antártida está relacionada con la distribución de poblaciones de invertebrados y vegetación, que consiste en briofita y comunidades de líquenes. Los estudios micológicos han sido llevados a cabo en la región subantártica, la Península Antártica y en regiones del continente de la Antártida más ecológicamente estresadas, como el desierto de Ross y las regiones libres de hielo de los Valles Secos de McMurdo<sup>54</sup>.

## 2.6. Identificación molecular de microorganismos mediante amplificación y secuenciación.

La identificación molecular de los microorganismos consiste en la extracción del material genético (ADN o ARN), amplificación por medio de PCR de la región de interés y secuenciación de los productos de amplificación.

### 2.6.1. Extracción de ADN.

La extracción del ADN consta principalmente de tres etapas, la primera etapa consiste en la lisis celular donde se busca generar la ruptura de la pared celular, la segunda es una purificación realizada con lavados implementando solventes orgánicos (fenol, cloroformo o etanol) y finalmente la tercera etapa es la recuperación a partir de precipitación <sup>62</sup>.



**Figura 9.** Pasos para extracción de ADN(62)

### 2.6.2 Amplificación de ADN mediante PCR

Es una técnica de síntesis enzimática que se utiliza para amplificar fragmentos específicos de ADN *in vitro*, creada y desarrollada por Millis y col. de la *Cetus Corporation*. Es una poderosa herramienta que cumple con los requisitos de especificidad y sensibilidad que exigen la caracterización de los ácidos nucleicos, pudiendo detectar con ella de forma fácil la presencia de estas biomoléculas en una muestra, aún cuando sus cantidades se enmarcan en el orden de las pequeñas cantidades (ng, pg o fg). Utiliza ADN molde, dos cebadores oligonucleótidos, desoxinucleótidos, enzima taq polimerasa y cloruro de magnesio <sup>68</sup>.

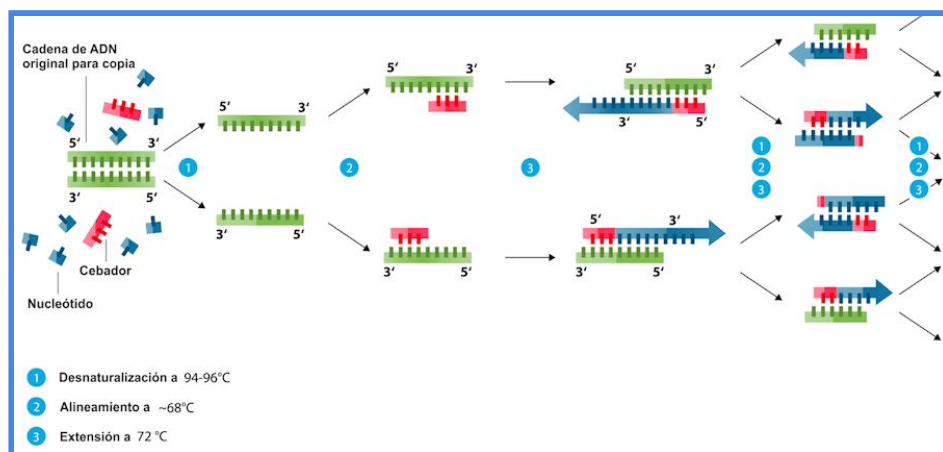
### 2.6.3 Pasos para realizar Amplificación de ADN mediante PCR

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarse nuevamente.

El proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.

Desnaturalización: e se realiza por calentamiento de la mezcla a 95°C, se separan las dos cadenas del ADN molde, la hibridación, en donde la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

Elongación: la mezcla se calienta a 72°C y la enzima Taq ADN polimerasa se usa para replicar las hebras de DNA. La Taq polimerasa comienza el proceso de extensión de la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.



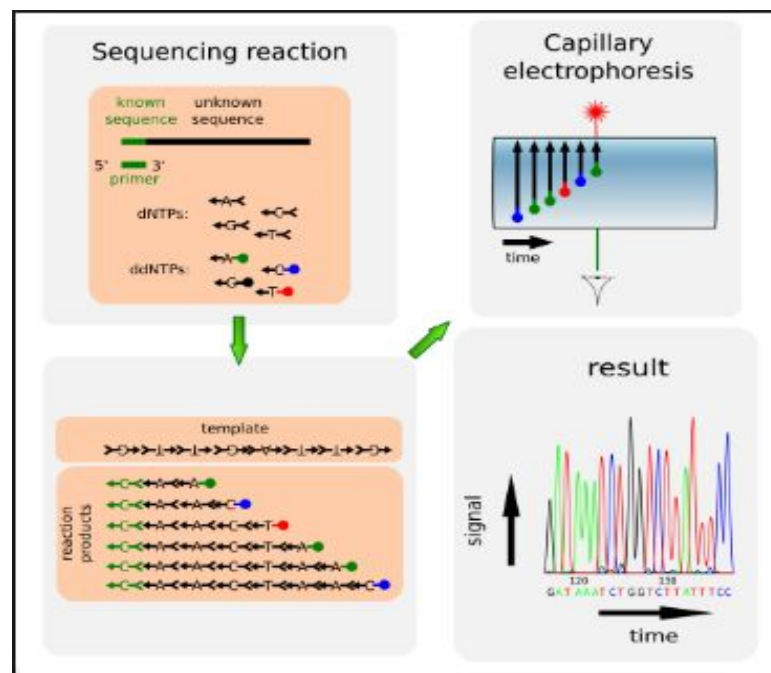
**Figura 10.** Pasos para la realización de una PCR 1, desnaturalización del ADN molde, 2,hibridación de las cadenas simples con primers,3 polimerización o elongación del complejo ADN- iniciador por la polimerasa termoestable. (68)

#### 2.6.4. Secuenciación de productos de amplificación

Es sabido que para llevar a cabo la reacción de secuenciación de amplificados, estos deben estar previamente purificados, es decir libres de restos de *primers*, dNTPs, enzimas y demás compuestos utilizados durante la PCR, la calidad de las secuencias está directamente relacionada con el proceso de purificación empleado, en este proceso se determina la secuencia de bases de los nucleótidos (As, Ts, Cs y Gs) de un fragmento de ADN <sup>68</sup>.

##### 2.6.4.1 Secuenciación mediante el método Sanger.

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxynucleótidos que sirven como terminadores de la reacción. En la actualidad la reacción de secuenciación se basa en una modificación de la PCR con dideoxynucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar. El sistema más utilizado es el desarrollado por Applied Biosystems <sup>66</sup>.



**Figura 3.** Técnica de secuenciación mediante el método de Sanger.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 Universo, población, muestra

**Universo:** Microorganismos presentes en suelos del continente Antártico.

**Población:** Microorganismos presentes en suelos provenientes de Islas en el continente Antártico.

**Muestra:** Microorganismos aislados de suelos procedentes de la Isla Decepción y la isla Livingston en la Antártida.

#### 3.2 Hipótesis, Variables, indicadores

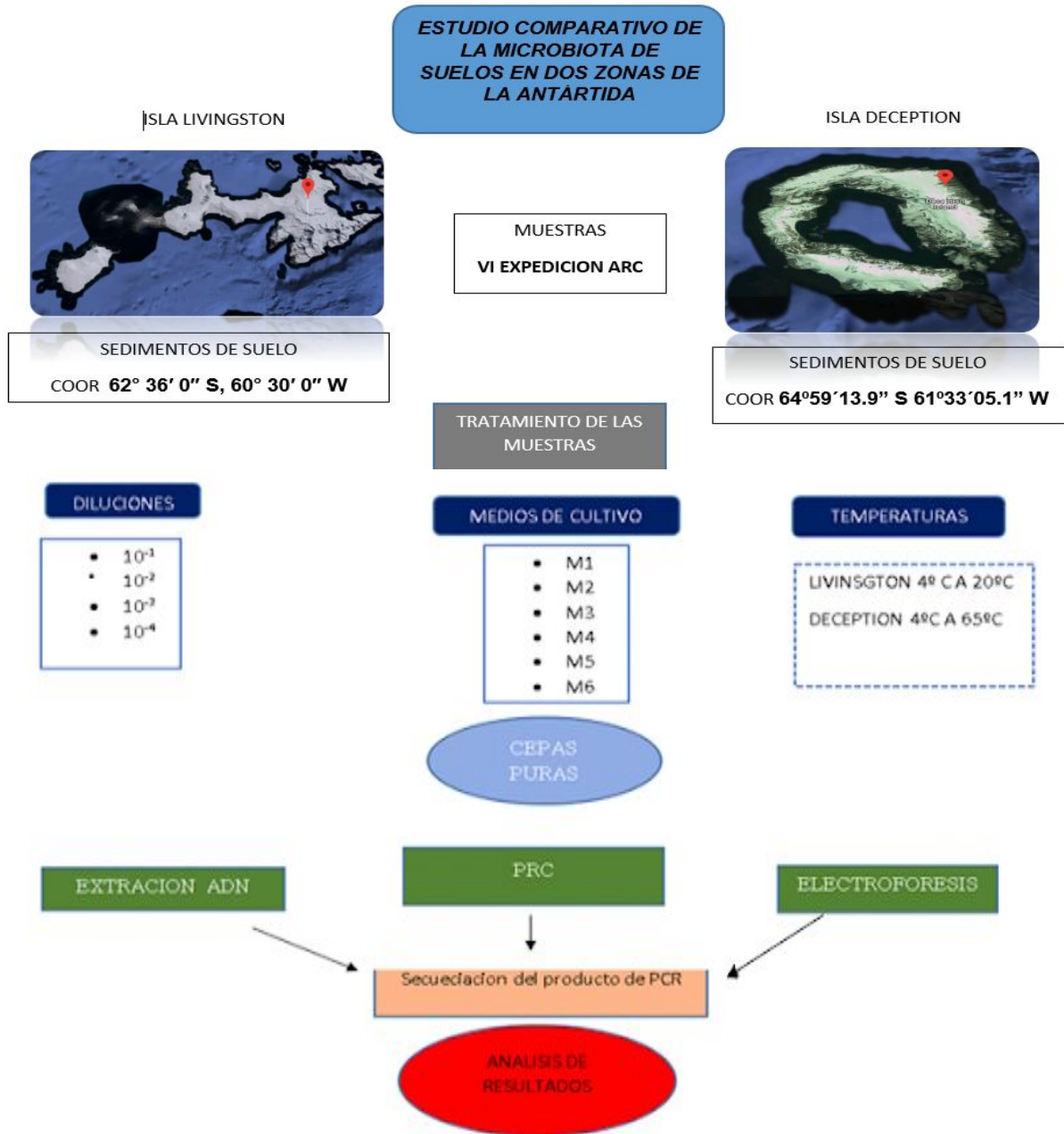
##### Hipótesis

Existe diversidad microbiana cultivable en las muestras de suelo recolectadas de las islas livingston y decepción en la Antártida.

##### Variables e indicadores

Objetivos	Variables	INDICADORES
1 Recuperar algunos microorganismos por medio de técnicas microbiológicas de dos muestras de suelos provenientes de las islas Livingston y Decepción en la Antártida.	<b>1. Medios de cultivo</b>  <b>1.1 Clasificación según coloración de Gram</b>	%de microorganismos recuperados por medio de técnicas microbiológicas  <hr/> muestra de suelo proveniente de la isla (Livingston o Decepción)
2. Identificar los organismos aislados por medio de la secuenciación parcial del gen 16S rRNA.	<b>2. Condiciones de PCR</b> <b>2.1 Resultados del algoritmo BLASn</b>	Identidad > 97% según el algoritmo BLASn  <hr/> Identidad del total de secuencias según el algoritmo BLASn
3. Comparar la diversidad microbiana presente en las muestras de los suelos provenientes de las islas livingston y decepción.	<b>3. Temperatura de crecimiento</b>  <b>3.1 Isla de la que proviene la muestra</b>	% de microorganismos (psicrófilo / psicrotolerante)  <hr/> total de microorganismos extremófilos aislados de las dos muestras  % de microorganismos (fúngicos/ bacterianos )  <hr/> total de microorganismos aislados

### 3.3 Técnicas y procedimientos



**Figura 12.** Procedimiento general de muestras provenientes de la isla Livingston y la isla Decepción de la Antártida. Autoras,2018



### 3.3.1 Tratamiento de la muestra

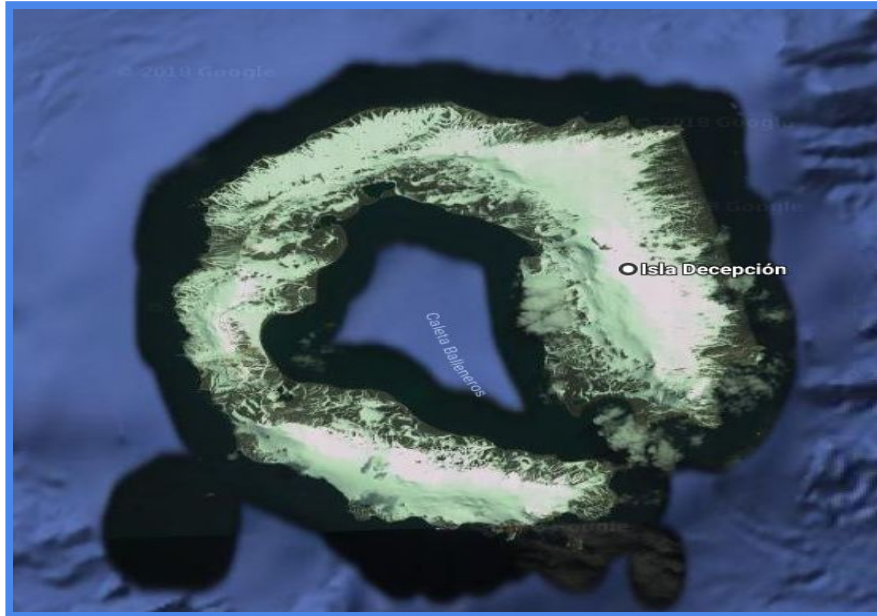
#### Fase 1. Muestreo

Realizado por parte de la IV expedición del buque ARC perteneciente a la Armada Colombiana hacia la Antártida, en el mes de enero del año 2016 organizada por la CCO (Comisión Colombiana del Océano). Las muestras fueron recolectadas de dos islas pertenecientes al archipiélago Shetland del Sur.



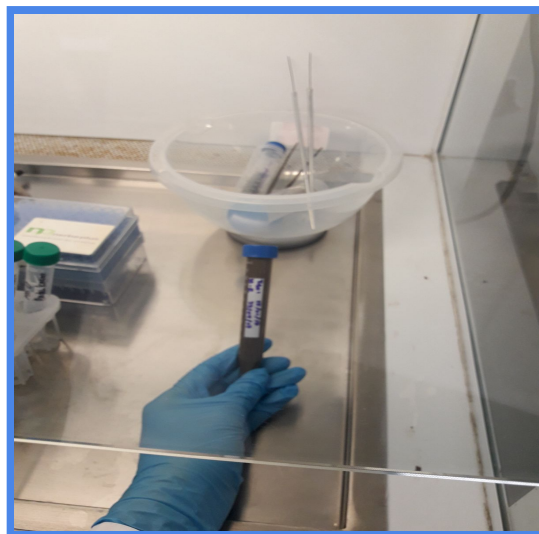
**Figura 13.** Ubicación geográfica del muestreo realizado en la isla Livingston  
Tomado de google maps

La primera muestra corresponde a la isla Livingston ubicada en las siguientes coordenadas **62° 36' 0" S, 60° 30' 0" W** se utilizó un ancla (sistema de fondeo) obteniendo así un sedimento marino tipo lodo.



**Figura 14.** Ubicación geográfica del muestreo realizado en la isla Decepción  
Tomado de google maps

Muestra obtenida de la isla de decepción localizada en **62°57'0.42" S 60°33'45.5" W**, esta segunda muestra se obtuvo directamente de suelo en la laguna costera, obteniendo sedimento arenoso de una laguna pequeña con poca recirculación<sup>53</sup>.

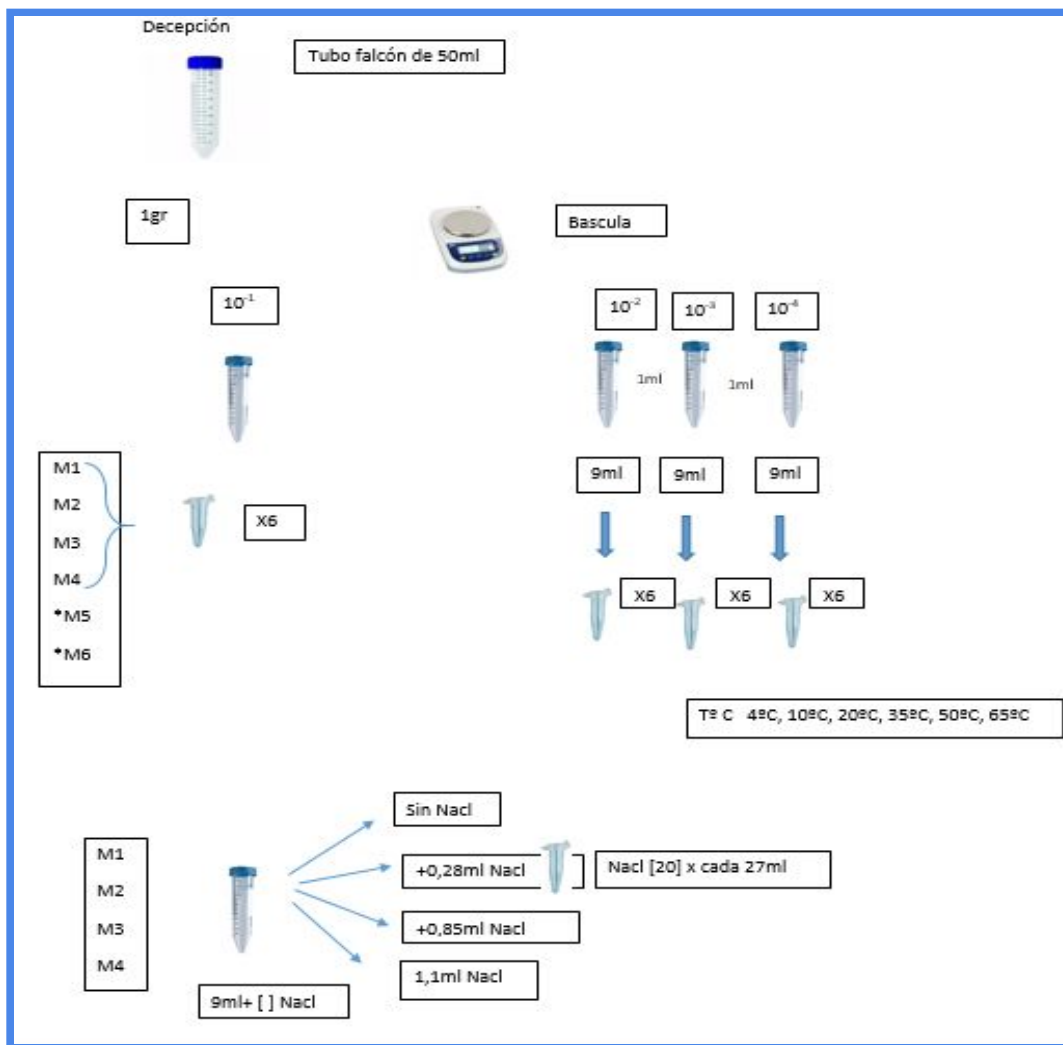


**Figura 15.** Muestra de sedimento previa al procesamiento. laboratorio 1,  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Autoras 2018

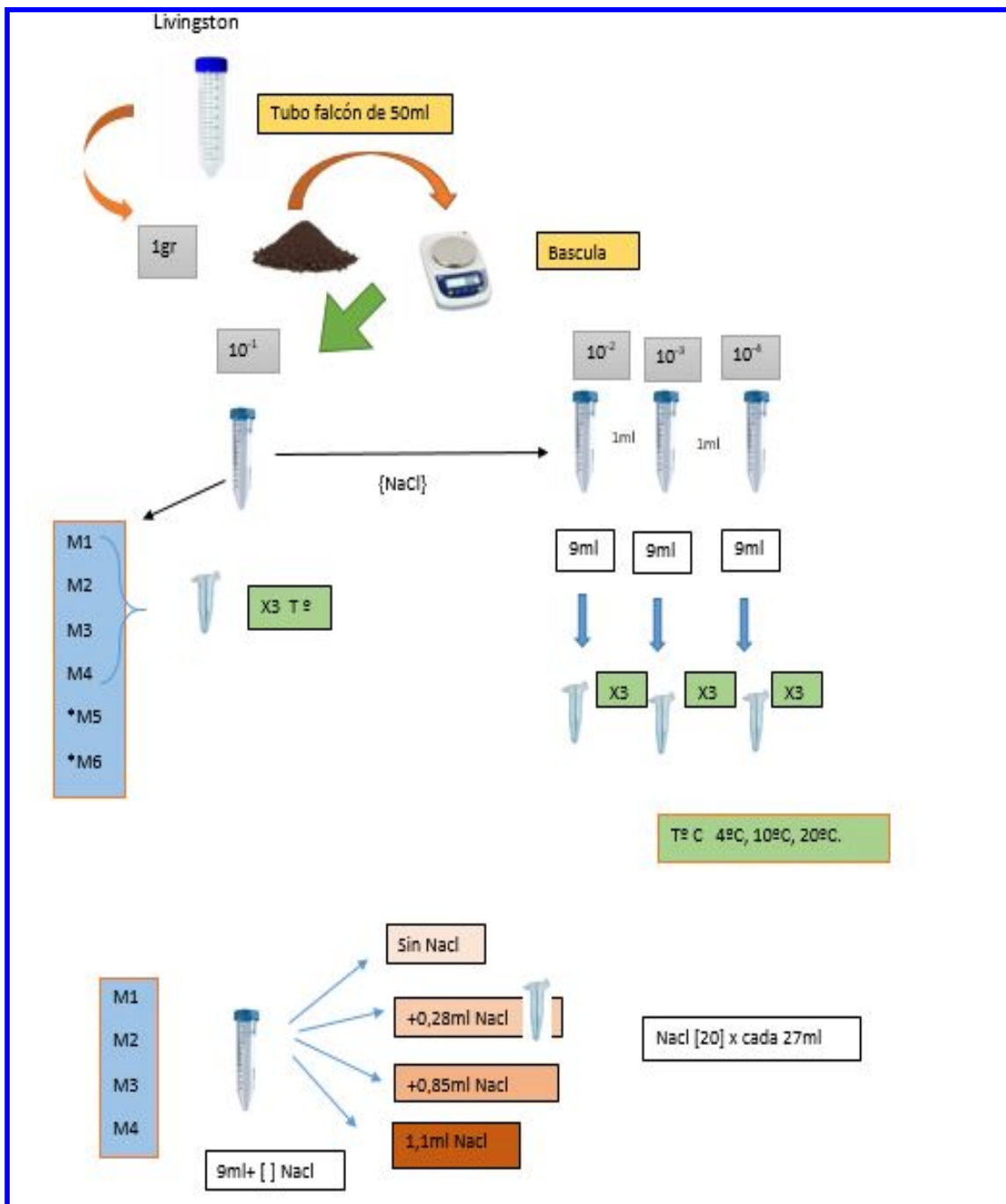
Las muestras fueron colectadas en tubos Falcon de 50ml, debidamente rotulados, se trasladaron manteniendo la cadena de frío hasta la llegada a los laboratorios de Universidad de la Sabana y posteriormente a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, donde fueron procesadas ambas muestras <sup>54</sup>.

## Fase 2. Aislamiento microbiológico en caldos

A continuación se detalla el procedimiento que se le dio a cada una de las muestras de acuerdo a su procedencia; Isla Decepción (Figura 16), Isla Livingston (Figura 17).

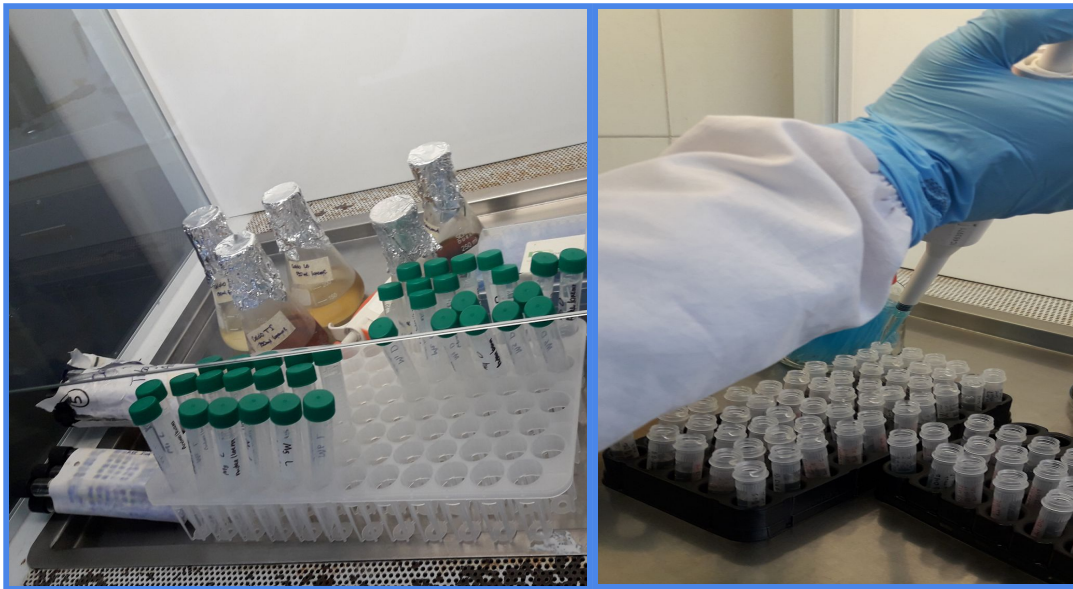


**Figura 16.** Procedimiento para siembra de las muestras en medios de cultivo líquido Isla Decepción. Autoras,2018.



**Figura 17.** Procedimiento para siembra de las muestras en medios de cultivo líquido Isla Livingston. Autoras, 2018.

## Siembra microbiológica en caldos



**Figura 18.** Aislamiento microbiológico en caldos (tubos Falcon y Eppendorf) laboratorio 1, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Autoras, 2018.

Se eligieron seis tipos de medios de cultivos líquidos (caldos) para ambas muestras, con el fin de realizar un aislamiento primario garantizando de esta forma el crecimiento de la mayoría de microorganismos, se clasificaron los caldos desde **M1** hasta **M6** tanto para la muestra proveniente de la isla Livingston como para la muestra obtenida de la isla Deception, siendo **M1** (caldo Nutritivo), **M2** (caldo Sabouraud), **M3** (caldo luria), **M4** (caldo Trypticase Soja), **M5** (Medio Mínimo) y **M6** (Medio R2A).

Inicialmente, todos los medios líquidos se almacenaron en tubos Falcon de 15 ml, pero únicamente los medios **M1** a **M4** fueron sometidos a diferentes concentraciones de salinidad; esto se decidió, teniendo en cuenta las condiciones del continente ([0], [0,57], [0,85], [1,1]). Para los caldos **M5** y **M6** se omitió este paso debido a que sus componentes son básicamente sales. Posteriormente, se marcaron tubos Eppendorf de 1,5ml a cuatro diluciones diferentes desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  con el fin de evaluar el crecimiento microbiano en diferentes concentraciones de sal, esto mismo se realizó para cada uno de los caldos, para un total de 216 tubos Eppendorf.

Para el enriquecimiento de la muestra en los caldos, se realizaron cuatro diluciones seriadas, para la primera dilución se tomó 1 gramo de suelo y 9 ml del medio líquido, y se continuó con la realización de las tres diluciones restantes, agregando 1 ml de la primera dilución en 9 ml del medio líquido repitiendo este paso en tres oportunidades, este procedimiento se llevó a cabo en todos los medios (M1 - M6).

Cada siembra fue sometida a temperaturas variadas según el origen de la muestra; para la isla Deception, se estipuló una variable de temperatura que iba desde 4°C hasta 65°C teniendo en cuenta que en esta isla existen microclimas que van desde los 2°C hasta alcanzar incluso temperaturas superiores a los 100°C. Por lo anterior, las temperaturas para aislamiento primario de esta muestra fueron las siguientes: 4°C, 10°C, 20°C, 35°C, 50°C y 65°C, mientras que en la isla Livingston, se utilizó una variable de 4°C hasta 20°C, (4°C,10°C,20°C). Estas variables de temperatura para la segunda muestra, se escogieron debido a que la isla se caracteriza por una temperatura media que rodea los 7°C.

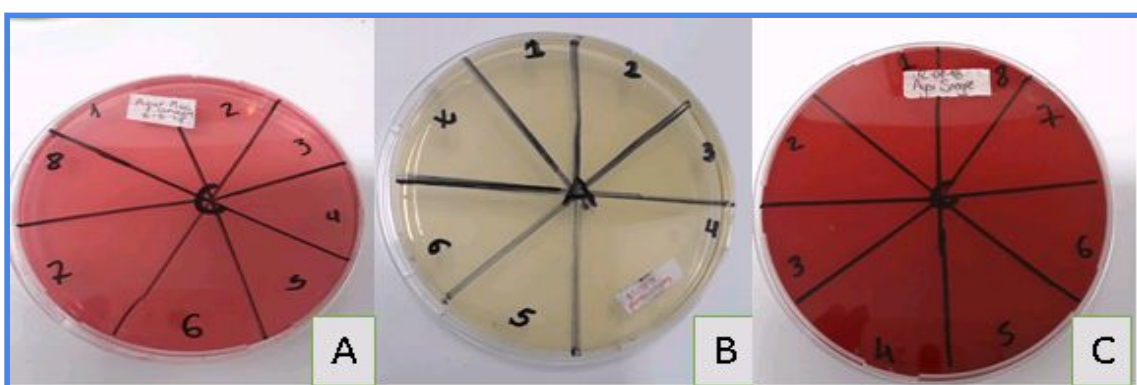
Los tubos Eppendorf se revisaron cada semana, durante tres semanas, para verificar el crecimiento manteniendo las condiciones de temperatura para cada una de las siembras.

### **Fase 3. Estudio macroscópico y microscópico**

Al cabo de tres semanas de incubación, se seleccionaron las muestras de los Eppendorf, donde se evaluó el crecimiento por indicadores de turbidez mediante observación (Sin turbidez, ligeramente turbio, turbio), realizando a los medios ligeramente turbios y turbios tinción de Gram para determinar el tipo de microorganismos aislados.

#### Fase 4. Aislamiento en Medios de cultivo

Se sembraron las muestras en tres medios de cultivo para realizar el aislamiento en placa; Agar Sabouraud para hongos, Agar McConkey para Bacterias Gram negativas y agar sangre para observar la capacidad hemolítica de los microorganismos aislados; se realizó una siembra por agotamiento de las diluciones mayores  $10^{-4}$  por cada agar, y se pusieron en las mismas condiciones de temperatura, se observaron cada 3 días y se realizó tinción Gram para bacterias y azul de lactofenol para hongos. Se hicieron siembras de las colonias que no estaban puras hasta lograr su purificación <sup>4</sup>.



**Figura 19.** Medios de cultivo sólidos para el aislamiento de muestras. A. agar mac conkey. B agar sabouraud. C agar sangre. Autoras, 2018.

#### Fase 5. Identificación BBL CRYSTAL

Una vez purificados los aislamientos, se les realizaron pruebas bioquímicas automatizadas con el sistema BBL Crystal. Además, pruebas de catalasa y oxidasa.

##### Fase 5.1 Alistamiento de las muestras para biología molecular

Las cepas puras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  con glicerol para lograr un efecto crioprotector, debido a la disminución de la concentración de solutos por competencia. Se guardaron 4 viales de cada cepa pura, las cuales fueron descongeladas y reactivadas mediante siembra con el fin de garantizar la pureza de las cepas previo a la realización análisis molecular.

## Fase 6. Biología molecular

De los 21 microorganismos aislados, se les realizó extracción de ADN a las 20 muestras bacterianas; el microorganismo número 21 fue un hongo y su identificación se realizó mediante tinción de azul de lactofenol y por medio de claves dicótomas.

Se realizó la extracción del material genético de las 20 cepas puras, utilizando el kit WIZARD GENOMIC DNA PURIFICATION (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (ver anexo 9). Posteriormente se efectuó la amplificación del material genético mediante una PCR convencional, la amplificación de la región 16S del rRNA por PCR se realizó utilizando los cebadores 16S-8F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3 y 16S-1492R 5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3

A continuación se describen las cantidades utilizadas de cada reactivo para la preparación de la Master Mix.

**Tabla 1.** Cálculos Master Mix para realizar PCR Castillo C., Guzmán A. 2018

Componentes	Para volumen final de 50 µl
<b>OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix</b>	25,0 µl
<b>Primer 16S-8F (10mM)</b>	1,0 µl
<b>Primer 16S-1492R (10mM)</b>	1,0 µl
<b>Agua Desionizada</b>	21,0 µl
<b>DNA (25-100ng/µl)</b>	2,0 µl

Se utilizó el termociclador (Multigene Optimax Labnet) para realizar la PCR de la región 16S del rRNA.



**Tabla 2.** Condiciones de la PCR para la amplificación de la región 16S del rRNA, CASTILLO C, GUZMÁN A 2018

Desnaturalización		94°C, 10 min
Desnaturalización	94°C, 30 sec	ciclos 35-40
Anillamiento	50°C, 1:30 min	
Extensión	72°C, 2 min	
Extensión final	72°C, 15 min	

Los productos de PCR de la región 16S del rRNA de las 20 muestras fueron observados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (TBE 0,5X) y se utilizó el marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (Anexo 27).

#### **Fase 7. Secuenciación de productos de PCR**

De los 50µl de producto, fueron sembrados en los geles 15µl para su observación y los restantes 35µl fueron conservados a 4°C hasta su envío al servicio de secuenciación de Corpogen - Universidad de los Andes (Bogotá, Colombia) mediante el método de Sanger.

Finalmente, se realizó la edición de las secuencias obtenidas por medio del programa Chromas Lite (versión 2.6.5), para comparar las secuencias editadas con las bases de datos pertenecientes al GenBank del El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos, se utilizó el algoritmo BLASTn, asumiendo una identidad significativa superior o igual al 97% con respecto a la base de datos del NCBI.

## 4. RESULTADOS

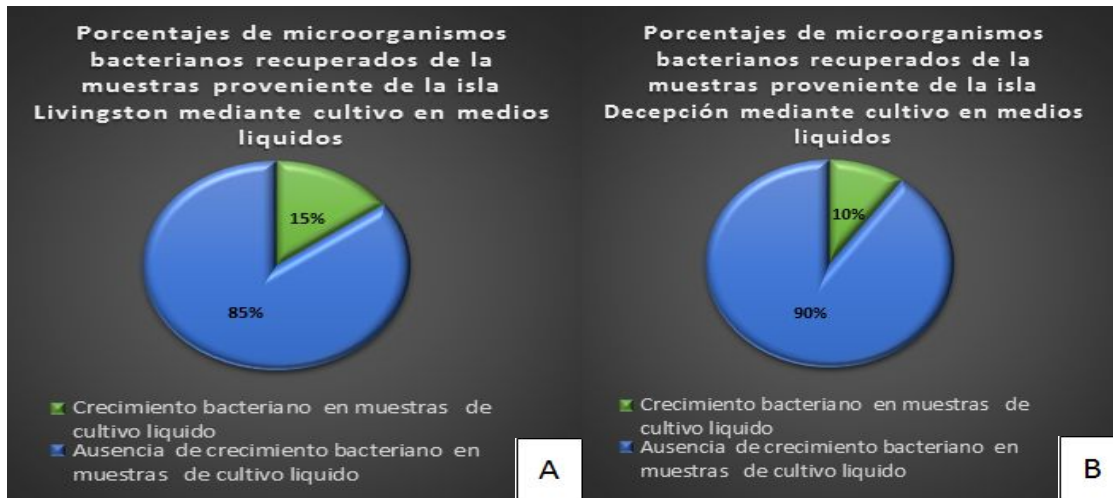
### 4.1 Crecimiento de las muestras provenientes de la isla Livingston y Decepción en medio de cultivo líquido.



**Figura 20.** Visualización del crecimiento en medios de cultivo líquidos a las tres semanas de incubación (criterio turbidez). Autoras, 2018

Durante tres semanas de incubación se evaluó el crecimiento de las muestras en los medios de cultivo líquidos, al transcurrir este periodo de tiempo se logró evidenciar el crecimiento por criterios de turbidez, obteniendo como resultado el aislamiento de un microorganismo fúngico y de 17 microorganismos bacterianos once de ellos correspondientes a la isla Decepción y seis provenientes de la isla Livingston.

Se observó mediante coloración de Gram que en tres de las muestras bacterianas, se presentaba doble población, por lo cual fue necesario realizar tres pases a medios de cultivo sólidos para obtener así las 20 cepas puras, la **Figura 21** muestra los porcentajes de microorganismos bacterianos recuperados por medio del crecimiento en medios de cultivo líquidos.



**Figura 21.** Porcentaje de microorganismos bacterianos recuperados de muestras de las Islas Livingston y Decepción en medios de cultivos líquidos, A. Isla Livingston. B. Isla Decepción. Autoras, 2018.

Para la isla Livingston el porcentaje de crecimiento de microorganismos bacterianos recuperados por medio de técnicas microbiológicas en medios de cultivo líquido fue del 15%, con respecto al porcentaje de crecimiento de microorganismos aislados de la isla Decepción correspondiente al 10%.



**Figura 22.** Comparación de crecimiento (número de aislamientos) según medios de cultivos líquidos, Isla Livingston, Autoras, 2018.

En la Isla Livingston, los medios líquidos M3, M4 y M6, presentaron crecimiento, M4 (Caldo Tripticasa soya), presentó el crecimiento más satisfactorio con un total de 4 de los 7 microorganismos bacterianos aislados, seguido por M3 (Caldo

Luria Bertani) con 2 microorganismos y finalmente M6 (Caldo R2A) del cual se obtuvo 1 microorganismo, en los medios restantes M1, M2 Y M5 no se obtuvo crecimiento.



**Figura 23** Comparación de crecimiento bacteriano (número de aislamientos) según medios de cultivo de muestras de la Isla Decepción. Autoras, 2018

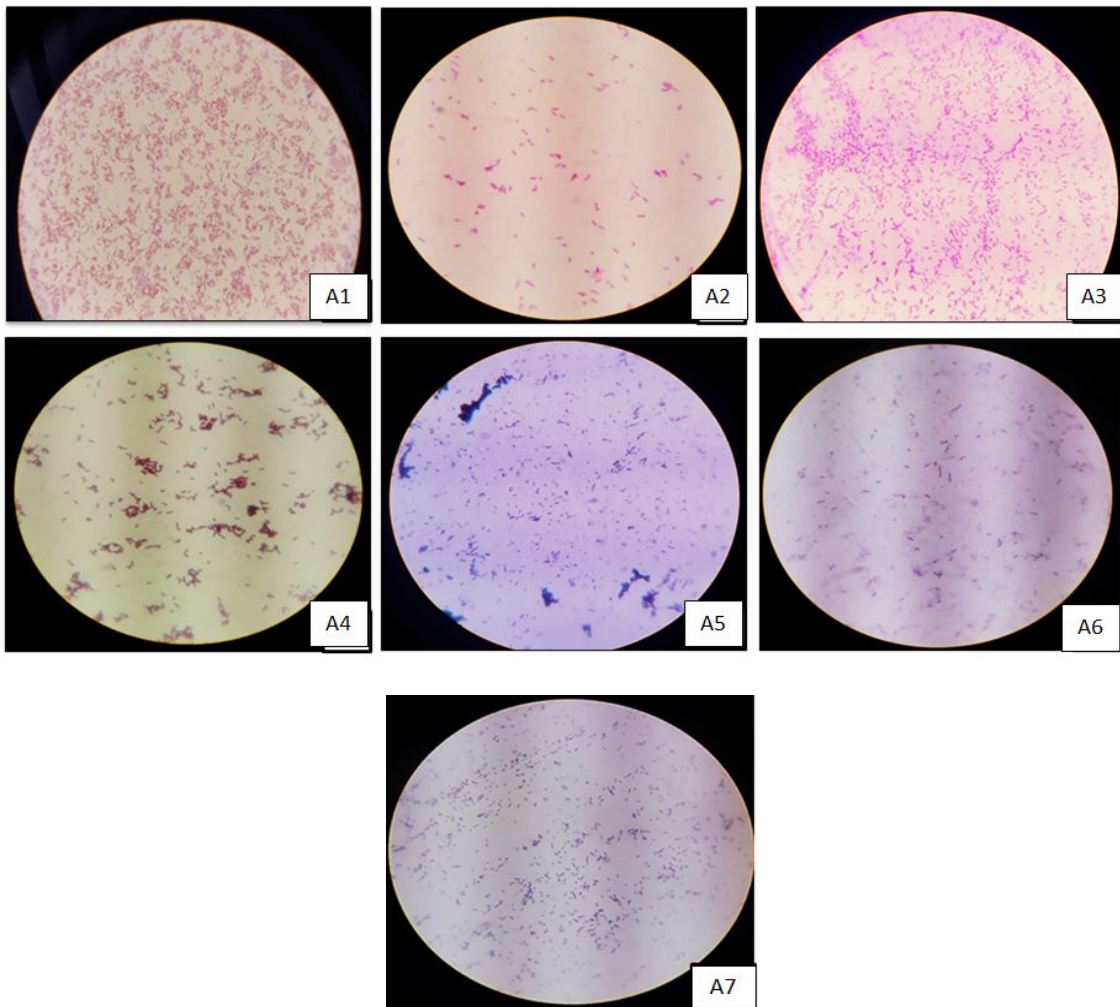
En la Isla Decepción, las muestras sembradas en los medios líquidos M1, M3, M4, M5 y M6, presentaron crecimiento; para el caso M3 (Caldo Luria Bertani) se obtuvo el crecimiento más satisfactorio con un total de 4 microorganismos aislados, seguido de M1 (Caldo Nutritivo) en el cual crecieron 3 microorganismos bacterianos aislados, para M4, M5 Y M6 creció un solo microorganismo por cada medio, el único medio en el que no hubo crecimiento fue M2 (agar Sabouraud).

En cuanto a la observación microscópica de láminas de coloración de Gram correspondientes al crecimiento bacteriano y las características de crecimiento en los medios de cultivo líquido de muestras provenientes de la isla Livingston y Decepción en caldos se puede consultar los Anexos 1 al 4)

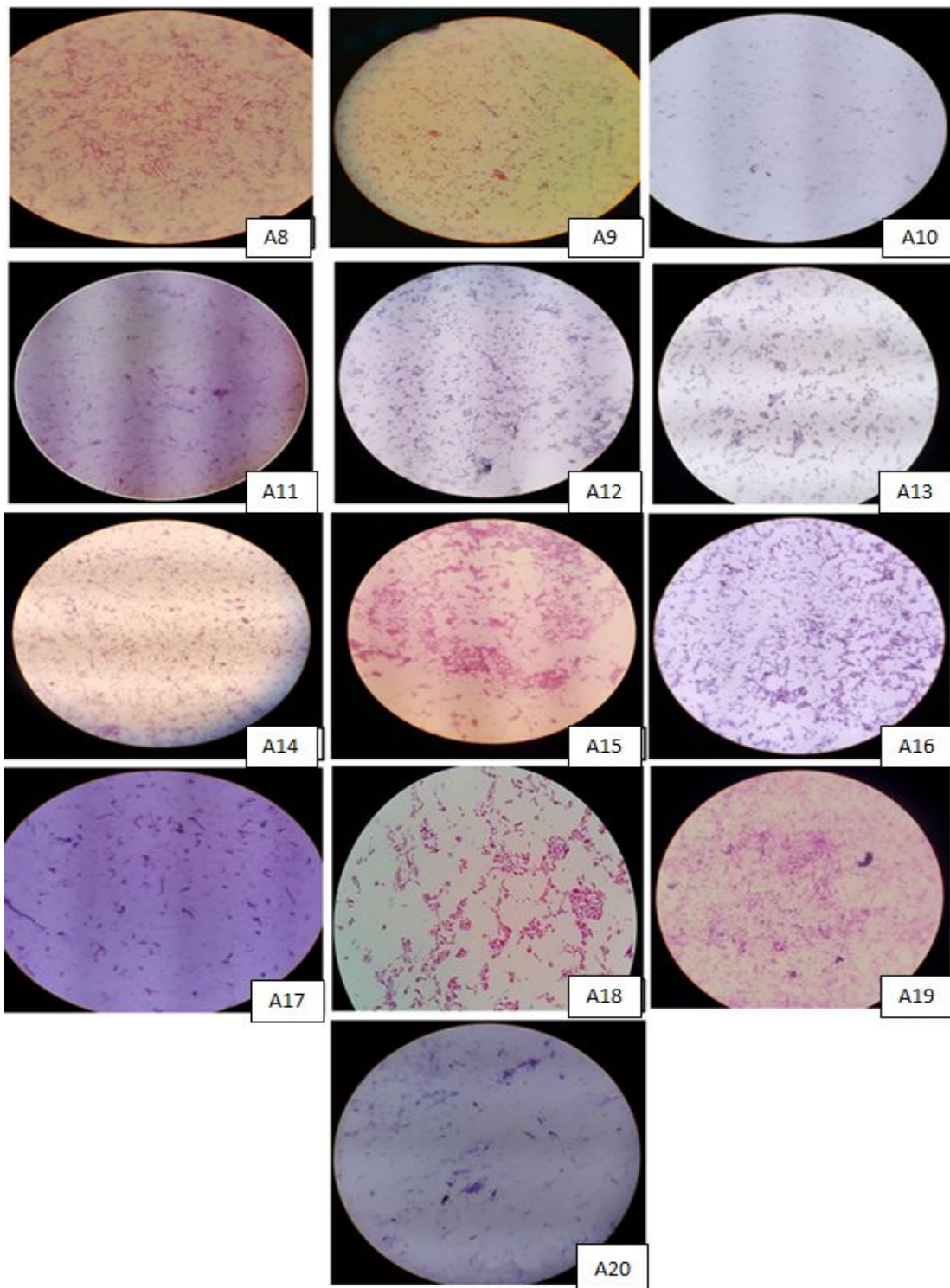
Una vez seleccionados los medios de cultivo líquido en donde se evidenció el crecimiento, se procedió a continuar con la siembra en medios de cultivo sólidos (agares), observando las características macroscópicas de cada colonia, obtenidas de la siembra por agotamiento de las diluciones en donde se observó crecimiento, se realizó un registro fotográfico y se organizaron los datos de las características morfológicas de cada cepa aislada en una tabla (Anexo 2).

#### 4.2 Obtención de cepas puras provenientes de las islas Livingston y Decepción de la Antártida.

Mediante resiembras en medios de cultivos sólidos, y observación tanto macroscópicamente para evaluar el aspecto de las colonias (Anexo 4 y 5), como microscópicamente para clasificar los microorganismos según la tinción de Gram, se obtuvieron 20 cepas puras. En las **Figuras 24 y 25** se observa microscópicamente la tinción de Gram de cada una de las cepas .



**Figura 24** Imágenes de láminas de gram de cepas puras aisladas de muestras de sedimentos provenientes de la Isla Livingston. A1. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A2. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A3. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A4. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A5. Bacilo Gram Positivos (isla Livingston), A6. Bacilo Gram Positivos (isla Livingston), A7. Bacilo Gram Positivos (isla Livingston). Autoras, 2018.



**Figura 25.** Imágenes láminas de gram de cepas puras aisladas de muestras de sedimentos provenientes de la isla Decepción. A8 Bacilo Gram Negativo. A9. Bacilo Gram Negativo A10. A11 A12. A13. Bacilo Gram Positivos (isla Decepción), A14. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A15. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A16. A17. Bacilo Gram Positivos (isla Decepción), A18. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A19. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A20. Bacilo Gram Positivos. Autoras, 2018.



**Figura 26** Porcentaje de crecimiento de cepas bacterianas puras, obtenidas de la muestra proveniente de la Isla Decepción en la Antártida según temperatura. Autoras 2018.

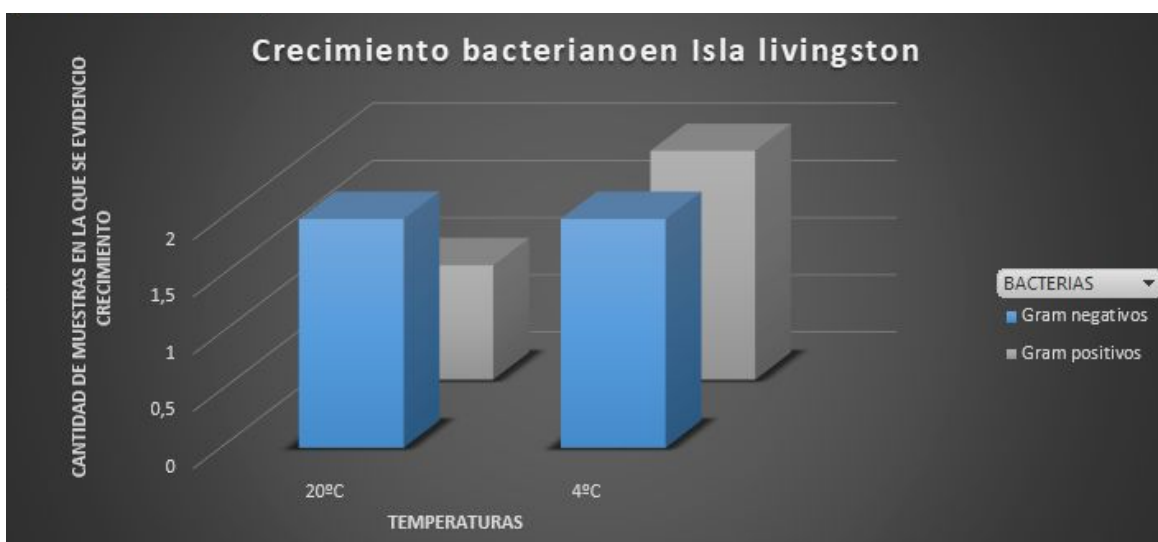
El desarrollo bacteriano según la temperatura para la muestra proveniente de la Isla Decepción, tuvo un mayor porcentaje de crecimiento de aislamientos a 20°C, 10 cepas bacterianas lograron crecer, representando el 77% de un total de trece aislados, dos bacterias crecieron a una temperatura de 4°C para un porcentaje del 15%, el 8% restante corresponde a una cepa que creció a 50°C (ver Figura 26).



**Figura 27** Porcentaje de cepas bacterianas puras según temperatura, obtenidas de la muestra proveniente de la Isla Livingston. Autoras 2018.

En la muestra de sedimento proveniente de la Isla Livingston se lograron aislar cinco cepas bacterianas que crecieron a una temperatura de 4°C correspondiente al 71% de los 7 aislados, y un 29% para dos bacterias que crecieron a 20°C (ver figura 27).

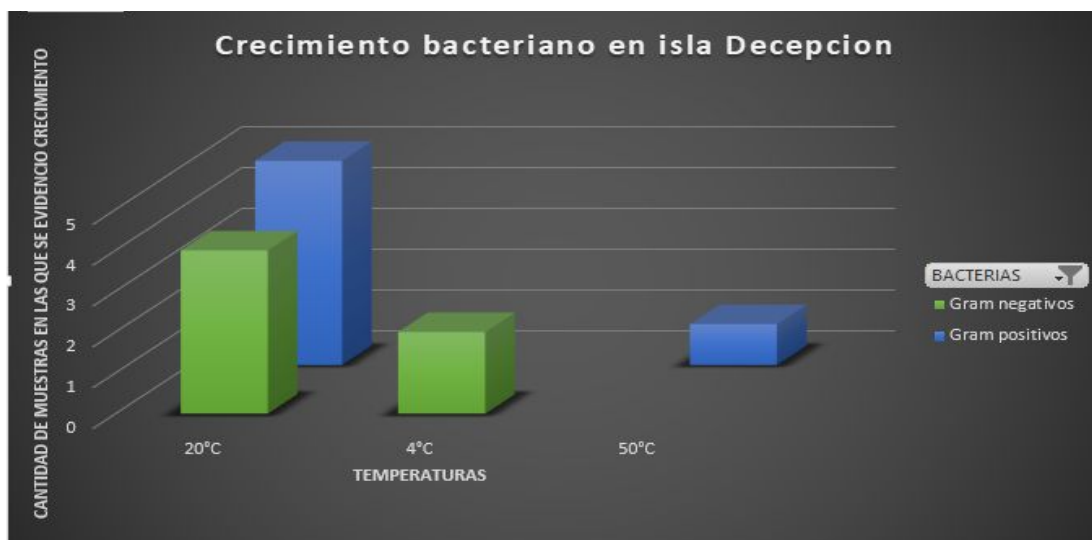
El crecimiento bacteriano que presentó la muestra proveniente de la Isla Livingston, se clasificó de acuerdo al criterio de tinción de Gram; los resultados indicaron que dos bacterias Gram positivas y una Gram negativa crecieron a 20°C; por otro lado, dos bacterias Gram positivas y dos Gram negativas se desarrollaron a una temperatura de 4°C. Ver **Figura 28**.



**Figura 28**, Clasificación de bacterias provenientes de la Isla Livingston según coloración de Gram.

El crecimiento bacteriano que presentó la muestra proveniente de la Isla Livingston se puede visualizar en la **Figura 29**, la cual muestra la clasificación del crecimiento bacteriano según la coloración de Gram, se observa el crecimiento de un microorganismo bacteriano Gram positivo a 50°C (A20), de 2 bacterias Gram negativas a 4°C, de 4 bacterias Gram negativas y 5 Gram positivas que presentaron crecimiento a 20°C .





**Figura 29**, Clasificación de bacterias provenientes de la muestra de la isla Decepción según coloración de Gram.

### 4.3 Microorganismos identificados con BBL Crystal

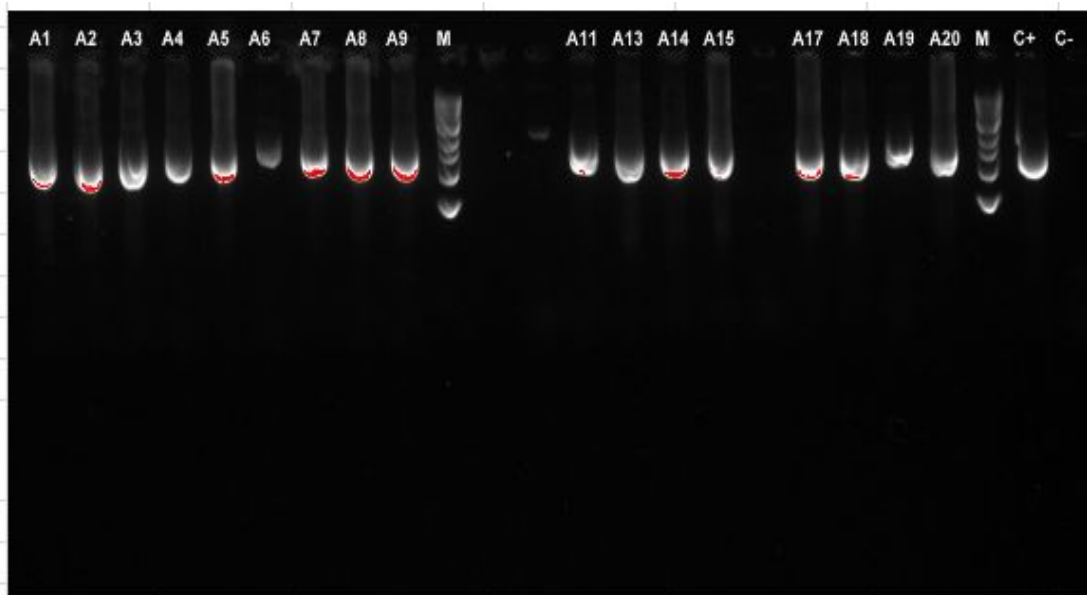
Se seleccionaron 4 cepas bacterianas para identificarlas mediante de sistema BBL Crystal, los Presuntos Géneros bacterianos identificados fueron los siguientes:

**Tabla 3.** Porcentaje de . Autoras, 2018

Convención	Gram	Interpretación Crecimiento Agar McConkey	Porcentaje de similitud con el sistema BBL Crystal	oxidasa	catalasa	Indol	Presunta identificación
A1	Bacilo Gram negativo	No fermenta la lactosa	98%	positiva	positiva	negativo	<i>Burkholderia</i> sp.
A4	Bacilo Gram positivo	Fermentación de Lactosa positiva	98%	negativa	positiva	negativo	<i>Bacillus</i> sp.
A5	Bacilo Gram negativo	No fermenta la lactosa	99%	negativa	positiva	negativo	<i>Acinetobacter</i> sp.
A10	Bacilo Gram Negativo	Lactosa Negativa	99%	negativa	positiva	negativo	<i>Salmonella</i> sp.

Mediante el sistema de identificación BBL Crystal se lograron identificar el total de cepas seleccionadas para esta prueba, mostrando como resultado cuatro géneros bacterianos: *Salmonella* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., y *Burkholderia* sp.

**4.3** Electroforesis de productos de PCR de la región 16S rRNA a partir del ADN extraído de cepas aisladas de muestras provenientes de las Islas Livingston y Decepción en la Antártida. Los productos de PCR presentan el tamaño esperado, 1500pb-1800pb.



**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% (TBE 0,5X) teñido con GelGreen Nucleic Acid Gel Stain del producto de PCR de la región 16S rRNA , a partir de DNA genómico de cepas bacterianas provenientes de muestras de suelos de las islas Livingston y Decepción en la Antártida, A1. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A2. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A3. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A4. Bacilo Gram Negativo (isla Livingston), A5. Bacilo Gram Positivos (isla Livingston), A6. Bacilo Gram Positivos (isla Livingston), A7. Bacilo Gram Positivos (isla Livingston), A8. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A9. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), M. Marcador de peso molecular, A11. Bacilo Gram Positivos (isla Decepción), A13. Bacilo Gram Positivos (isla Decepción), A14. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A15. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A17. Bacilo Gram Positivos (isla Decepción), A18. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A19. Bacilo Gram Negativo (isla Decepción), A20. Bacilo Gram Positivos (isla Decepción), M. Marcador de peso molecular 100pb DNA ladder, C+. *S. enteritidis*, C-. Control negativo de la PCR (H<sub>2</sub>O desionizada). Los productos de PCR presentan el tamaño esperado, 1500pb-1800pb.

#### 4.4 Resultado de la secuenciación de los productos de amplificación de PCR .

**Tabla 4.** Recopilación de resultados finales

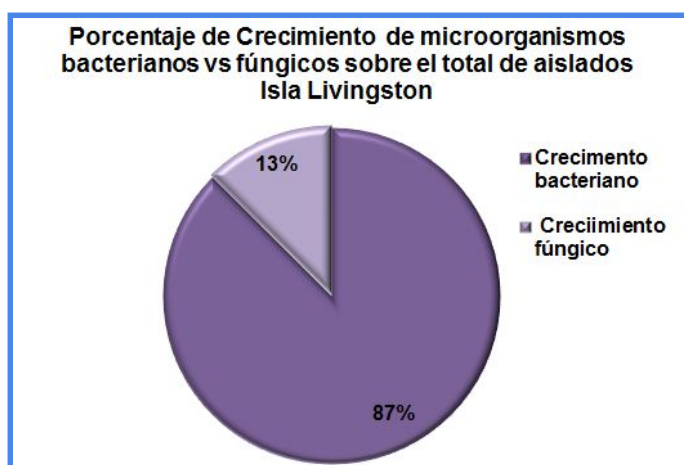
Convención /Isla a la cual pertenece la muestra	Gram	T° de crecimiento	Dirección de la secuencia	% de identidad	Bacteria reportada	Acceso en Gen Bank
A1 Isla Livingston	Bacilos Gram Negativos	20° C	Forward	89%	<b>Burkholderia sp. THG-DD5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/541136825 KF532123.1">gi 541136825 KF532123.1</a>
			Reverse	91%		
A2 Isla Livingston	Bacilos Gram negativos	4° C	Forward	100%	<b>Brevundimonas bullata strain QFF3 16S RNA ribosomal, secuencia parcial</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/187611074 EU665637.1">gi 187611074 EU665637.1</a>
			Reverse	99%		
A3 Isla Livingston	Bacilos Gram negativos	20° C	Forward	99%	<b>Pseudomonas sp. FQ-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/1031488765 KX083527.1">gi 1031488765 KX083527.1</a>
			Reverse	99%		
A4 Isla Livingston	Bacilos Gram positivos	4° C	Forward	79%	<b>Bacillus sp. Asnod6C12 partial 16S rRNA gene, isolate Asnod6C12</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/937833312 LN881422.1">gi 937833312 LN881422.1</a>
			Reverse	88%		
A5 Isla Livingston	Bacilos Gram negativo	4° C	Forward	92%	<b>Acinetobacter albensis strain KBL23 16S RNA ribosomal, secuencia parcial</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/1280074546 MG576176.1">gi 1280074546 MG576176.1</a>
			Reverse	94%		
A6 Isla Livingston	Bacilos Gram positivos	4° C	Forward	99%	<b>Arthrobacter sp. T7E 16S ribosomal</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/451913103 KC433651.1">gi 451913103 KC433651.1</a>
			Reverse	97%		

					RNA gene, partial sequence	
A7 Isla Livingston	Bacilos Gram negativo	20°C	Forward	99%	<b><i>Acinetobacter lwoffii</i> strain D81 16S RNA ribosoma, Secuencia parcial.</b>	<a href="#">gi 929049301 KT758722.1</a>
			Reverse	98%		
A8 Isla Decepción	Bacilos Gram positivo	20°C	Forward	94%	<b><i>Staphylococcus</i> sp. strain S14 16S RNA ribosomal, secuencia parcial.</b>	<a href="#">gi 1321387433 MG759527.1</a>
			Reverse	87%		
A9 Isla Decepción	Bacilos Gram negativos	20°C	Forward	99%	<b><i>Brevundimonas</i> sp. 8 16S RNA ribosomal secuencia parcial.</b>	<a href="#">gi 930068494 KR003449.1</a>
			Reverse	99%		
A10 Isla Decepción	Bacilos Gram positivo	20°C	No se le realizaron pruebas molecular			
A11 Isla Decepción	Bacilos Gram positivos	20°C	Forward	99%	<b><i>Arthrobacter</i> sp. TMN-10-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</b>	<a href="#">gi 422740831 JX949841.1</a>
			Reverse	99%		
A12 Isla Deception	Bacilos Gram Positivos alargados	20°C	No se le realizaron pruebas molecular			
A13 Isla Deception	Bacilos Gram Negativos	20°C	Forward	98%	<b><i>Oceanisphaera</i> sp. strain QHU10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</b>	<a href="#">gi 1198035737 CP021377.1</a>
			Reverse	98%		

A14 Isla Deception	Bacilos Gram negativos	4°C	Forward	100%	<i>Pseudomonas putida</i> cepa FQ-45 16S ARN ribosomal, secuencia parcial	<a href="#">gij103148</a> <a href="#">8771 KX0</a> <a href="#">83533.1</a>
			Reverse	99%		
A15 Isla Deception	Bacilos Gram negativos	20°C	Forward	93%	<i>Paeniglutamicibacter</i> sp. strain P-35-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gij135403</a> <a href="#">8729 MH0</a> <a href="#">18916.1</a>
			Reverse	88%		
A16 Isla Deception	Bacilos Gram positivos	20°C	No se le realizaron pruebas molecular			
A17 Isla Deception	Bacilos Gram positivos	20°C	Forward	97%	<i>Microbacterium</i> sp. HBUM178907 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gij944545</a> <a href="#">494 KR90</a> <a href="#">6333.1</a>
			Reverse	95%		
A18 Isla Deception	Bacilos Gram Positivos	20°C	Forward	99%	<i>Microbacterium</i> sp. MJ18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gij251854</a> <a href="#">809 GQ25</a> <a href="#">0443.1</a>
			Reverse	99%		
A19 Isla Deception	Bacilos Gram positivo	4°C	Forward	99%	<i>Sporosarcina psychrophila</i> strain COP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gij525597</a> <a href="#">816 KF026</a> <a href="#">322.1</a>
			Reverse	99%		
A20 Isla Deception	Bacilos Gram positivos	50°C	Forward	92%	<i>Bacillus</i> sp. SS16.21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">gij441089</a> <a href="#">539 KC16</a> <a href="#">0942.1</a>
			Reverse	96%		

### 4.3 Crecimiento en medios de cultivo (aislamiento fúngico).

En la muestra proveniente de la Isla Livingston se lograron aislar 7 bacterias representado por un 87% en comparación al 13% correspondiente a el crecimiento de un hongo presuntamente perteneciente al género *Penicillium* sp. el cual se identificó mediante tinción de azul de lactofenol y claves dicótomas.



**Figura 31.** Porcentaje de crecimientos de microorganismos bacterianos vs fúngicos de muestras provenientes de la Islas Livingston. Autoras 2018

#### 4.3.1 Características Microscópicas y Macroscópicas del microorganismo fúngico aislado

Taxonomía

Reino: Fungi

Filo: Ascomycetes

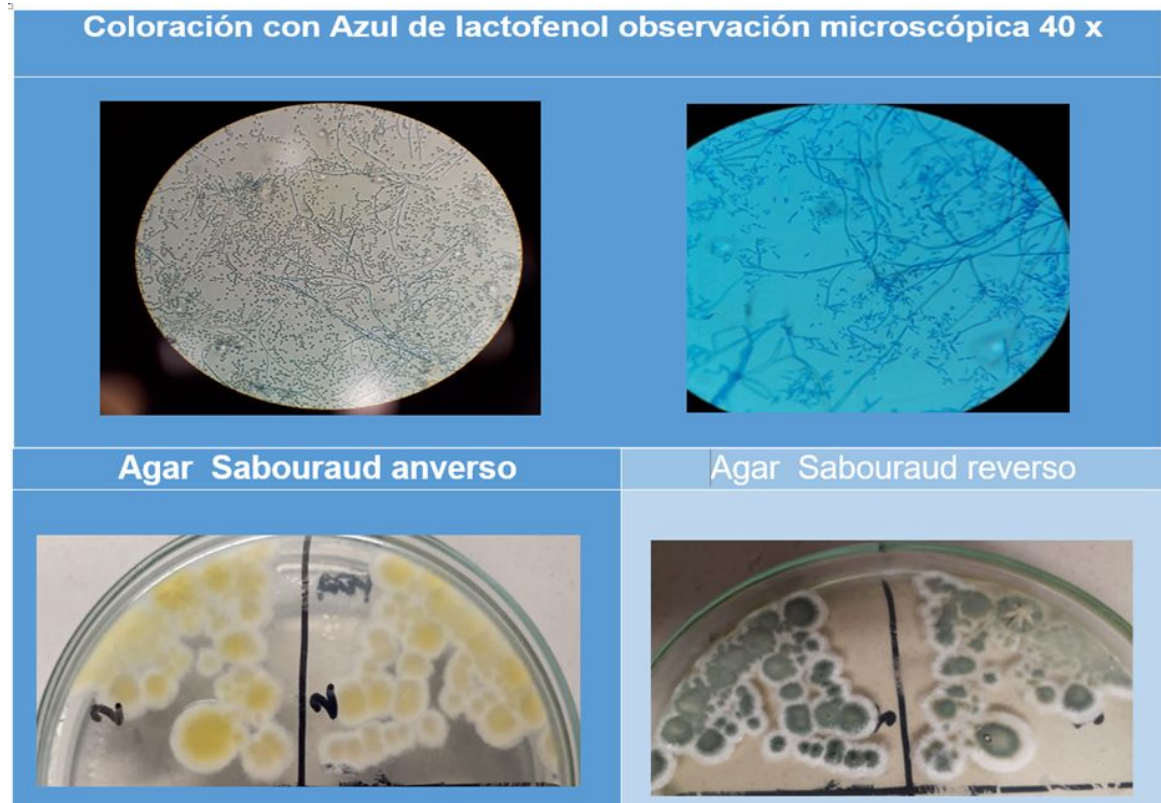
Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Penicillium*

Las colonias del hongo en agar Sabouraud se observaron delgadas, algodonosas, con pigmentos amarillos al anverso y verdes al reverso, microscópicamente hifas septadas hialinas, con conidióforos simples métulas, fiálides y conidias. La organización de las fiálides en la punta de los conidióforos se observa en forma típica de pincel (**Figura 32**).



**Figura 32.** Características Microscópicas y Macroscópicas del microorganismo fúngico aislado (*Penicillium sp.*). Autoras 2018.

## DISCUSIÓN

Es de gran importancia resaltar que la vida en ambientes cuya temperatura media oscila entre los 0°C y – 10°C, como en el caso del Continente Antártico, despierta un interés particular para la investigación científica, que hoy en día centra su atención principalmente en los microorganismos, quienes por sus modificaciones celulares, estructurales y fisiológicas han logrado sobrevivir y colonizar exitosamente diferentes nichos ecológicos.

El enfoque principal del trabajo se basó en aislar e identificar la diversidad de microorganismos cultivables provenientes de suelos del continente antártico, debido a que posee suelos con gran diversidad bacteriana hasta el momento con escasa identificación principalmente por su carácter no cultivable.

A pesar de las condiciones hostiles de los suelos Antárticos para el crecimiento de la mayoría de microorganismos, los resultados arrojados por el estudio evidencian, que existe gran variedad de especies cultivables presentes en el suelo, sin embargo, tanto en el estudio como en la mayoría de los casos descritos <sup>12,13,14,15,17</sup>, no es posible acertar correctamente con la identificación de los aislados utilizando únicamente técnicas microbiológicas básicas.

Los resultados para este estudio muestran que un 25% del total de microorganismos aislados fue identificado mediante técnicas microbiológicas, y para ampliar el porcentaje de identificación se decidió, al igual que en el estudio realizado por Tomova et al, 2014, realizar la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, logrando abarcar una identificación superior al 80%, afirmando una vez más que la microbiología tradicional logra complementarse con técnicas moleculares para obtener así una identificación más exacta y eficaz.

En total fueron cuatro los géneros bacterianos identificados mediante el sistema BBI crystal: *Burkholderia* sp., *Acinetobacter* sp., *Salmonella* sp. y *Bacillus* sp., tres de ellos fueron secuenciados *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp. y *Acinetobacter* sp., proceso que no pudo ser llevado a cabo en el género *Salmonella* sp., debido



a que el producto de PCR fue insuficiente para llevar a cabo la secuenciación.

*Burkholderia* sp., género aislado de la muestra proveniente de la Isla Livingston (A1) a una temperatura de 20°C y una concentración del 0,57% de NaCl, fue identificado mediante la técnica de BBL Crystal con un porcentaje de confiabilidad del 98%, y con un porcentaje inferior contrario a lo esperado del 91% generado por la secuenciación de la amplificación de los productos de PCR, por lo que se decidió evaluar aspectos morfológicos, bioquímicos y microscópicos evidenciando así, bacilos Gram negativos a la coloración de Gram, la no fermentación de lactosa en agar McConkey, y el resultado positivo a las pruebas de catalasa y oxidasa; permitiendo determinar que la cepa aislada pertenecía a este género, de igual forma se confirma con este caso que a pesar de que la biología molecular está en auge, por sí sola no es capaz de validar la identificación de un microorganismo cuando existen discrepancias.

Aunque la Antártida presente las temperaturas más bajas del planeta, y dependa de la radiación solar durante el verano para apoyar el crecimiento de los pocos organismos que la habitan, existe un pequeño número de sitios donde se identifica actividad volcánica, un ejemplo claro es la Isla Decepción, donde se evidencian fumarolas que alcanzan temperaturas superiores a los 100°C. En este estudio se recuperó un microorganismo a 50°C, perteneciente al Género *Bacillus* sp. (A20), del cual no se logró identificar la especie al momento de secuenciar la amplificación de productos de PCR, sin embargo, el género ya ha sido descrito en el continente en estudios como el de Logan *et al*<sup>69</sup>, que ratifican la presencia de algunas especies termófilas como es el caso de *Bacillus fumarioli* que coincide con el microorganismo aislado en cuanto al grado de temperatura de crecimiento (50°C), lo que genera gran incertidumbre frente a una especie no descrita, sin embargo se requiere realizar pruebas adicionales para confirmarlo.

Es común encontrar especies de *Acinetobacter* sp. en aguas y suelos donde su crecimiento máximo es de 44°C; Entre las características fenotípicas de este género sobresalen la acidificación de la glucosa y la hemólisis de eritrocitos para

la identificación de especies <sup>70</sup>; En este estudio se observó el crecimiento de dos cepas pertenecientes a la isla Livingston a diferentes temperaturas, *Acinetobacter lwoffii* (A7) que se desarrolló a 20°C y *Acinetobacter albensis* (A5) con un crecimiento a 4°C; estas dos especies difieren entre sí, teniendo en cuenta que *Acinetobacter lwoffii* es no productor de ácido a partir de la glucosa, y *Acinetobacter albensis* se caracteriza por metabolizar la glucosa a partir de la vía de los ácidos mixtos.

La única cepa que se logró identificar a través el sistema BBL Crystal con un 98% de identidad y no fue corroborada por medio de secuenciación, pertenece al género *Salmonella sp.* (A10), existen pocos estudios sobre la presencia de esta bacteria en el continente, y teniendo en cuenta que se caracteriza por causar enfermedades entéricas tanto en humanos como en animales <sup>71</sup>, se sugieren dos posturas frente a este hallazgo: la primera hace referencia a que en los últimos años las Islas antárticas han sido perturbadas por actividades humanas, entre ellas el turismo y el establecimiento de nuevas bases científicas, lo que indicaría la introducción de especies de origen humano pertenecientes a este género <sup>72</sup>; la otra postura se fundamenta en que existen algunos registros en donde el género ha sido encontrado en heces de pingüinos causando salmonellosis <sup>73</sup>, lo que sugiere que tal vez la muestra obtenida de la Isla Decepción podría contener heces, sin embargo en ambos casos existiría un impacto potencial en la salud pública y en la salud animal y en la conservación de la fauna, por lo tanto se sugieren realizar estudios moleculares adicionales, teniendo en cuenta el sitio de obtención de la muestra para corroborar su presencia.

Otros estudios como el de Marreo J et al, en el 2010 demuestra que la *Salmonella* es útil para procesos de biorremediación de metales pesados en sedimentos y en aguas subterráneas, la investigación afirma que esta bacteria utiliza el plásmido pMG101 para metabolizar la plata (Ag).

Los miembros del género *Oceanisphaera* son aeróbicos, psicrotolerantes y moderadamente halófilos, la mayoría han sido aislados de sedimentos marinos. En los resultados del presente estudio se logró evidenciar que la muestra de sedimento de la isla Decepción creció una especie bacteriana de este género **(A13)**, presentando una homología mediante el algoritmo Blast del 99% para *Oceanisphaera profunda* sp., aislada de sedimentos de aguas profundas del mar del sur de China por Xu et al. ,en 2014<sup>74</sup>. Existen otras especies descritas que comparten una estrecha similitud genética con la cepa aislada en diferentes ubicaciones geográficas. En el mar de Bohai, cerca de Yantai (China) se logró identificar en muestras de sedimentos costeros la especie bacteriana *Oceanisphaera psychrotolerans* aislada en el estudio realizado por Zhou S et al.<sup>75</sup>, en otro estudio realizado por Srinivas et al. se encontró una cepa de *Oceanisphaera sediminis* en la costa oeste de Spitsbergen, en el Océano Ártico<sup>76</sup>. Estudios demuestran que las especies nombradas se encuentran relacionadas con la biorremediación intrínseca de HAPs de sedimentos, características que podrían ser aprovechadas en el continente antártico<sup>77</sup>.

Otro de los géneros bacterianos aislados es *Microbacterium* sp. ha sido reportado con gran incidencia en Japón y China, en aguas, alimentos y lodos sedimentados. Existen reportes de algunas especies como *Microbacterium lacticum*<sup>78</sup> la cual es resistente a altas temperaturas y crece en leches luego de la pasteurización. Para el caso de estudio de la isla Decepción, la especie más cercana descrita hasta el momento es *Microbacterium laevaniformans*, debido a que es encontrado en aguas y lodos activos de China y Japón, según Yocotica et al<sup>79</sup>. En la muestra analizada de la isla Decepción, se identifica únicamente el

género de la cepa aislada el cual corresponde a *Microbacterium* sp., con un porcentaje de similitud del 97% (A17), microorganismo hasta el momento no reportado. Para la identificación de la especie se sugieren nuevos estudios teniendo en cuenta la localización de la muestra.

La cepa bacteriana (A 19) aislada de la isla Decepción a 4°C fue identificada mediante secuenciación como *Sporosarcina psychrophila* con un 99% de similitud, de este microorganismo existe un estudio particular realizado por Wenkai *et al*<sup>80</sup>, en el que presentan la secuencia completa del genoma del microorganismo que incluye un cromosoma circular de 4674191 pb con un contenido de GC del 40,3%, e indican que los genes que codifican la ureasa en esta bacteria proporcionan información sobre el proceso de hidrólisis, asegurando que existe un aumento del anión carbonato y alcalinidad en el medio ambiente, lo que induce la precipitación de carbonato, característica que juega un papel clave en biorremediación de aguas residuales ricas en calcio, y en el control del flujo de contaminantes del suelo, con esto se demuestra una vez más el potencial biotecnológico de las cepas aisladas en la investigación.

Los tres géneros en común para ambas islas fueron *Brevundimonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Arthrobacter* sp.

Las variables establecidas en la investigación para el crecimiento de dos cepas pertenecientes al género *Brevundimonas* (A2 Livingston 4°C, A9 Decepción 20°C), fueron similares a las del estudio realizado por So-Jung Kang *et al*, en el que aislaron de suelos salinos coreanos a una temperatura de 30°C y a una concentración de NaCl al 1.0% una cepa de *Brevundimonas bullata*<sup>81</sup>, coincidiendo en un 99% con la única especie que se logró identificar, aislada de la isla Livingston (A9), creciendo a una temperatura de 4°C con concentración de NaCl del 1.0%, lo que sugiere que esta bacteria presenta tropismo por crecer en ambientes salinos y logra abarcar un amplio rango de temperatura para su crecimiento.

En la identificación del género *Arthrobacter* sp., se detectaron dos cepas, (A6)

originaria de la isla Livingston a 4°C y (A11) de la isla Decepción a 20°C, este género posee la capacidad para degradar moléculas como fenoles, herbicidas, pesticidas y derivados del petróleo por medio mineralización; durante su ciclo de vida presentan formas de cocos y bacilos, por esto al momento de la identificación microscópica se pensaba que el cultivo era mixto <sup>82</sup>; también se aisló *Paeniglutamibacter* sp. o *Arthrobacter cryotolerans* una especie perteneciente a este género (A15). En el estudio de Ganzert del 2011 se identificaron las mismas dos cepas bacterianas mencionadas anteriormente, de un suelo cubierto de musgo de la Isla Livingston, cerca de la estación búlgara St Kliment Ohridski <sup>83</sup>. En esta investigación implementamos variables similares, como la concentración de NaCl de 0- 1.0 % y la temperatura entre -6 y 28°C, esto indica que las variables implementadas son óptimas para el desarrollo de bacterias psicrotolerantes de suelos antárticos y especies tolerantes a la sal.

La cepa bacteriana (A3) aislada de la isla Livingston y la cepa (A14) aislada de la isla Decepción pertenecen al género bacteriano *Pseudomonas* sp, sin embargo, solo (A14) logró tener un acercamiento mediante secuenciación genética de productos de PCR del 99% a la especie *Pseudomonas putida*, cepa que ha sido empleada en el tratamiento de HAPs y TPHs, obteniendo una eficiencia del 62%<sup>84</sup>. Es importante tener en cuenta que en el archipiélago de Svalbard situado en el polo norte, Abraham W et al, realizaron un estudio a mediados del año 2015 <sup>85</sup>, donde recuperaron una cepa de *Pseudomonas psychrophila* MTCC 12324, lo que confirma que este género es capaz de sobrevivir en las dos regiones más inhóspitas y frías del planeta tierra.

En este estudio, el único microorganismo fúngico aislado pertenece al género *Penicillium*, obtenido de la muestra tomada en la isla Livingston, resultado que se diferencia del estudio realizado por Gomes *et al* en el año 2014, quienes obtuvieron 44 cepas fúngicas de muestras superficiales de suelos en las islas Robert, Nelson, Rey Jorge y Penguin en el archipiélago de las Shetland del Sur en diferentes medios de cultivo y de las cuales no identificaron el género. Otro estudio publicado por la revista Iberoam Micol del 2004 muestra el aislamiento de 66 cepas fúngicas de diferentes suelos de la península antártica en

Argentina, de las cuales cuatro pertenecían a *Penicillium*<sup>86</sup>; estas dos investigaciones utilizaron técnicas de cultivo *in vitro*, con medios R2A y Sabouraud, los cuales se implementaron en el presente estudio, lo que evidencian el crecimiento de hongos del género *Penicillium* en el continente, y ratifican que este microorganismo puede sobrevivir a muy bajas temperaturas y ser cosmopolita.

## 6. CONCLUSIONES

Se logró recuperar diversos microorganismos provenientes de muestras de suelos de las islas Livingston y Decepción en la Antártida, con un total de 20 cepas bacterianas puras y un microorganismo de origen fúngico perteneciente al género *Penicillium sp.*

Mediante técnicas microbiológicas se identificaron los géneros *Salmonella sp.*, *Burkholderia sp.*, *Bacillus sp.* y *Acinetobacter sp.*

La técnica de biología molecular seleccionada para este estudio, secuenciación parcial del gen 16S rRNA, permitió la identificación de 5 géneros correspondientes a la Isla Decepción: *Staphylococcus*, *Oceanisphoera*, *Paeniglutamicibacter*, *Microbacterium*, *Sporosarcina* y 3 géneros a la isla Livingston: *Burkholderia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*.

Dentro de los géneros identificados, se determinaron 11 aislamientos bacterianos diferentes, distribuidos en las dos islas de la siguiente manera; 8 aislamientos de los géneros *Staphylococcus*, *Oceanisphoera*, *Paeniglutamicibacter*, *Microbacterium*, *Sporosarcina* correspondientes a la Isla Decepción y 6 aislamientos provenientes de la muestra de la isla Livingston pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*.

La mayoría de las cepas puras aisladas pertenecientes a las muestras provenientes de la isla Livingston fueron psicotolerantes, contrario a las cepas aisladas de la isla Decepción que mostraron ser termotolerantes.

Se observó el crecimiento de 4 géneros bacterianos a partir de muestras de ambas islas, *Brevundimonas*, *Arthrobacter*, *Paeniglutamicibacter* y *Pseudomonas*, lo que sugiere que estos géneros cuentan con características particulares que les han permitido adaptarse en estas dos islas, a pesar de que las islas Livingston y Decepción se encuentran separadas por 20 kilómetros, y

que la primera mantiene una temperatura media de  $-11^{\circ}\text{C}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ , y la isla Decepción es un volcán activo donde se pueden observar fumarolas que alcanzan hasta los  $100^{\circ}\text{C}$ .

El género *Salmonella* sp. fue identificado únicamente por medio del sistema BBL Crystal. Teniendo en cuenta que es una bacteria patógena, se podría inferir el potencial efecto en la salud animal y en la conservación de la fauna, por lo tanto se sugiere realizar estudios moleculares adicionales, teniendo en cuenta el sitio de obtención de la muestra para corroborar su presencia.

Se logró identificar hasta especie a 5 de las cepas bacterianas aisladas, 3 de la isla Livingston: *Brevundimonas bullata*, *Acinetobacter albensis*, *Acinetobacter lwoffii*, y dos de la isla Decepción; *Pseudomonas putida* y *Sporosarcina psychrophila*. Se recomienda la realización de posteriores estudios moleculares tanto con el gen 16S rRNA como con otros genes que puedan llevar a la identificación hasta especie de las cepas restantes.

*Oceanisphaera profunda* sp. nov y *Sporosarcina psychrophila*, dos bacterias aisladas de la isla Decepción, se encuentran relacionadas con estudios que muestran su papel clave en biorremediación de aguas residuales, en el control del flujo de contaminantes del suelo, y en la biorremediación intrínseca de HAPs de sedimentos, lo que hace aún más interesante el consolidado de cepas puras aisladas debido a su potencial biotecnológico.

El único microorganismo que se aisló a  $50^{\circ}\text{C}$  (termófilo) se recuperó de la isla Decepción, se determinó que pertenece al género *Bacillus* sp. se sugiere mediante estudios complementarios evaluar su importancia como biocatalizador y otros procesos de bioprospección conocidos para este género. Se reitera la importancia de que estas bacterias sean cultivables, ya que garantizan su utilización en estudios de bioprospección.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Benavides G, Hermida A. Aislamiento e identificación de la flora bacteriana nativa de los suelos de los páramos de cruz verde y guasca [Tesis pregrado]. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA; 2008 . [online] [cited 21 July 2018] disponible en <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis145.pdf>
- <sup>2</sup> Barnawal D. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced... - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2012 [cited 23 October 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22846334>
- <sup>3</sup> Siddikee MA e. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 14 June 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300550>
- <sup>4</sup> Garzón Obando D. Determinación de la Biodiversidad Bacteriana en Ecosistemas Glaciares de la Antártida [Internet]. Repositorio.uta.edu.ec. 2013 [cited 19 June 2018]. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/3179>
- <sup>5</sup> Convey P e. Antarctic terrestrial life--challenging the history of the frozen continent? - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2008 [cited 25 June 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429764>
- <sup>6</sup> Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. Fungi in Antarctica [Internet]. Science and Bio/Technology 6(1):127-141. 2007 [cited 19 July 2017]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/225693374\\_Fungi\\_in\\_Antarctica](https://www.researchgate.net/publication/225693374_Fungi_in_Antarctica)
- <sup>7</sup> Peeters K, Ertzb D, Willemsa A. Culturable bacterial diversity at the Princess Elisabeth Station (Utsteinen, Sør Rondane Mountains, East Antarctica) harbours many new taxa [Internet]. Doi.org. 2011 [cited 28 October 2017]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.02.002>

- <sup>8</sup> R M, V M. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2011 [cited 28 October 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187146>
- <sup>9</sup> Namsaraev, Z.B. Ecological niches of Antarctic phototrophic communities during global glaciation *Microbiology*. 2015 84: 125 [cited 24 October 2017]. Available from <https://doi.org/10.1134/S0026261715020083>
- <sup>10</sup> Martínez M. Identificación de moléculas de expresión diferencial a bajas temperaturas en aislamientos de bacterias de la Antártida Marítima [Maestria- Ciencias biológicas] [Internet]. iau.gub.uy. 2018 [cited 21 May 2017]. Available: <http://www.iau.gub.uy/wp-content/uploads/2018/08/Identificaci%C3%B3n-de-mol%C3%A9culas-de-expresi%C3%B3n-diferencial-a-bajas-temperaturas-en-aislamientos-de-bacterias-de-la-Ant%C3%A1rtida-mar%C3%ADtima-2012-ilovepdf-compressed.pdf>
- <sup>11</sup> Aislabe J, Chhour K, Saul D, Miyauchi S, Ayton J, Paetzold R et al. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* [Internet]. 2006 [cited 6 March 2018];38(10):3041-3056. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071706001337>
- <sup>12</sup> Zhou M, Wang G, Li D, Zhao D, Qin Q, Chen X et al. Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Bacterial Extracellular Proteases in the Coastal Sediments of King George Island, Antarctica. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 31 October 2017];8(11):e79668. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079668>
- <sup>13</sup> Navas León D. Caracterización Molecular de Actinomicetes Provenientes de Ecosistemas Antárticos [Internet]. Repo.uta.edu.ec. 2016 [cited 12 February 2017]. Available from: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22867/1/BQ%2087.pdf>
- <sup>14</sup> Tomova, Gladka, Tashyrev, & Vasileva-Tonkova. Isolation , identification and hydrolytic enzymes production of aerobic heterotrophic bacteria from two Antarctic.[Internet].2014[cited 17 July 2017]Available from:<http://ipublishing.co.in/ijesarticles/fourteen/articles/volfour/EIJES41056.pdf>
- <sup>15</sup> Bockheim b, Ugolini F. Suelos antárticos y formación de suelo en un entorno cambiante: una revisión 2008 [Internet]. *Geoderma Volumen 144*, páginas

1-8. 2008 [citado el 29 de agosto de 2017]. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.10.005>

- <sup>16</sup> Kim M, Cho A, Lim HS, Hong SG, Kim JH, Lee J, et al. Comunidades bacterianas de suelo altamente heterogéneas alrededor de la Bahía de Terra Nova del Norte de Victoria Land, Antarctica. [Internet]. 2015 [cited 17 July 2018]. Available from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119966>
- <sup>17</sup> Javani S, Marín I, Amils R, Abad J. Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [Internet]. 2015 [cited 21 July 2018];483:60-69. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/282640176>
- <sup>18</sup> See-Too, W., Salazar, S., Ee, R., Convey, P., Chan, K. and Peix, Á. *Pseudomonas versuta* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Systematic and Applied Microbiology*, - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2017 [Accessed 12 Jul. 2017] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28501448>.
- <sup>19</sup> Gomes, E., Godinho, V., Silva, D., de Paula, M., Vitoreli, G., Zani, C., Alves, T., Junior, P., Murta, S., Barbosa, E., Oliveira, J., Oliveira, F., Carvalho, C., Ferreira, M., Rosa, C. and Rosa, L.. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*. - PubMed - NCBI Ncbi.nlm.nih.gov. 2018[Internet]. [Accessed 7 Mar. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29332141>
- <sup>20</sup> Rodríguez, G. (2018). Antártida. [Blog] [patrimonionatural.com](http://patrimonionatural.com). Available at: <http://www.patrimonionatural.com/html/provincias/tierradelfuego/antartida/clima.asp> [Accessed 22 Jan. 2018]
- <sup>21</sup> Labrador c. Aislamiento y caracterización de microorganismos termófilos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termominerales de paipa e IZA (BOYACA) [Internet]. [Javeriana.edu.co](http://javeriana.edu.co). 2014 [cited 29 November 2017]. Available from: <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis249.pdf>

- <sup>22</sup> Bocangel C. Evaluación de la eficacia de un consorcio bacteriano aislado en la base peruana “Machu Picchu”- Antártida en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, a nivel de terrarios. [Internet].unmsm.edu.pe 2018 [cited 1 November 2018].Available from: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4804/1/Bocangel\\_rc.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4804/1/Bocangel_rc.pdf)
- <sup>23</sup> Garzón D.Determinación de la biodiversidad bacteriana en ecosistemas glaciares de la Antártida.[Internet]. uta.edu.ec 2015 [cited 10 November 2017] Available from: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4804/1/Bocangel\\_rc.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4804/1/Bocangel_rc.pdf)
- <sup>24</sup> Lo Giudice A, Fani R. Cold-adapted bacteria from a coastal area of the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica): linking microbial ecology to biotechnology. *Hydrobiologia* [Internet]. 2015 [cited 22 January 2018];761(1):417-441. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10750-015-2497-5>
- <sup>25</sup> Díaz R, Villamizar F. Uso Pacífico de la Antártica como Norma de los Cogens. *Magallania (Punta Arenas)* [Internet]. 2014 *Rev. Scielo* [cited 22 January 2018];42(1):17-31. Available from: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-2244201400010002](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-2244201400010002)
- <sup>26</sup> NACIONES UNIDAS. Tratado Ártico. Washington; 2018 p. 1-3. [cited 22 January 2018]Available from:<http://www.idi.mineco.gob.es/stfls/MICINN/Investigación/FICHERO S/Comité Polar definitivo/Tratado Antártico.pdf>
- <sup>27</sup> Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. Colombia hacia la investigación Antártica. Bogota D.C; 2018 p. 1. [cited 22 January 2018] Available from:<http://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article?id=1444:el-uso-sostenible-de-los-bosques-prioridad-de-minambiente-646>
- <sup>28</sup> INAE. TRATADO ANTÁRTICO. Argentina; 2016 p. 1-36. [cited 22 January 2018] Available at: [http://www.inae.gob.ec/wp-content/uploads/2016/02/tratado\\_antartico.pdf](http://www.inae.gob.ec/wp-content/uploads/2016/02/tratado_antartico.pdf)

- <sup>29</sup> El Tratado Antártico. historia general de las relaciones exteriores de la república Argentina. Argentina; 2015. p. 1-2. [cancilleria.gob.ar](http://cancilleria.gob.ar) [cited 22 January 2018] Available at:  
<https://cancilleria.gob.ar/es/politica-externor/antartida>
- <sup>30</sup> O'Neill T. Protection of Antarctic soil environments: A review of the current issues and future challenges for the Environmental Protocol. *Environmental Science & Policy* [Internet]. 2017 [cited 19 April 2018];76:153-164. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1462901117303994>
- <sup>31</sup> Campbell, I. and Claridge, G. ed. In: *Antarctica: Soils, Weathering Processes and Environment*, 16th ed. [online] I.B. Campbell, G.G.C. Claridge, pp. Volume 16, Pages ii-xxxii, 1-368 2010. Available at:  
<https://www.sciencedirect.com/bookseries/developments-in-soil-science/vol/16/suppl/C> [Accessed 19 Apr. 2018].
- <sup>32</sup> Selby M. *Antarctica: Soils, weathering processes and environment*, I. B. Campbell and G. G. C. Claridge, (developments in soil science 16), Elsevier, Amsterdam, 1987. No. of pages: 368. *Earth Surface Processes and Landforms* [Internet]. 2013 [cited 20 April 2018];14(8):753-754. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/esp.3290140811>
- <sup>33</sup> O'Neill T. Protection of Antarctic soil environments: A review of the current issues and future challenges for the Environmental Protocol. *Environmental Science & Policy* [Internet]. 2017 [cited 19 April 2018];76:153-164. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1462901117303994>
- <sup>34</sup> Ramos M, Vieira G, de Pablo M, Molina A, Abramov A, Goyanes G. Recent shallowing of the thaw depth at Crater Lake, Deception Island, Antarctica (2006–2014). *CATENA* [Internet]. 2017 [cited 20 April 2018];149:519-528. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0341816216302788?via%3Dihub>
- <sup>35</sup> Ferreira A, Vieira G, Ramos M, Nieuwendam A. Ground temperature and permafrost distribution in Hurd Peninsula (Livingston Island, Maritime Antarctic): An assessment using freezing indexes and TTOP modelling. *CATENA* [Internet]. 2017 [cited 20 April 2018];149:560-571. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0341816216303381?via%3Dihub>

- <sup>36</sup> Williams, L., Borchhardt, N., Colesie, C., Baum, C., Komsic-Buchmann, K., Rippin, M., Becker, B., Karsten, U. and Büdel, B. . Biological soil crusts of Arctic Svalbard and of Livingston Island, Antarctica. 2016 *Polar Biology*, [online] 40(2), pp.399-411. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00300-016-1967-1> [Accessed 20 Apr. 2018].
- <sup>37</sup> Hauck C, Vieira G, Gruber S, Blanco J, Ramos M. Geophysical identification of permafrost in Livingston Island, maritime Antarctica. *Journal of Geophysical Research* [Internet]. 2007 [cited 20 April 2018];112(F2). Available from: <https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1029/2006JF00054>
- <sup>38</sup> Benintende s, sanchez c. Crecimiento Bacteriano [Internet]. 3rd ed. Bogota; 2016 [cited 10 August 2018]. UNIVERSIDAD NACIONAL DE ENTRE RÍOS FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Available from: [http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad\\_3\\_crecimiento\\_bacteriano](http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano)
- <sup>39</sup> Shokrollahzade S, Sharifi F, Vaseghi A, Faridounnia M, Jahandideh S. Protein cold adaptation: Role of physico-chemical parameters in adaptation of proteins to low temperatures. *Journal of Theoretical Biology* [Internet]. 2015 [cited 10 August 2018];383:130-137. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.umng.edu.co/science/article/pii/S0022519315003501>
- <sup>40</sup> Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [Internet]. Redalyc.org. 2006 [cited 14 January 2018]. Available from: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>
- <sup>41</sup> Averhoff B, Müller V. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Research in Microbiology* [Internet]. 2010 [cited 22 January 2018];161(6):506-514. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250810001142>
- <sup>42</sup> Canganella F, Wiegel J. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* [Internet]. 2011 [cited 22 January 2018];98(4):253-279. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394529>

- <sup>43</sup> Sarmiento F, Peralta R, Blamey J. Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Front Bioeng Biotechnol.* 20;3:148. 2015 - PubMed - NCBI Ncbi.nlm.nih.gov. 2018[Internet] [cited 22 January 2018] ] Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26539430>
- <sup>44</sup> Dalmaso G, Ferreira D, Vermelho A. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs.* 13(4):1925-65.2015 - PubMed - NCBI Ncbi.nlm.nih.gov. 2018[Internet] [cited 22 January 2018] ] Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413194/>
- <sup>45</sup> Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res. Microbiol.* 162:346–361.2011 [cited 22 January 2018] Available from:<https://www.sciencedirect.com/journal/research-in-microbiology/vol/162/issue/3>
- <sup>46</sup> Tsuji M, Yokota Y, Shimohara K, Kudoh S, Hoshino T. An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. *PLoS One.*;8(3). [Internet] 2013 [cited 22 January 2018] <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059376>
- <sup>47</sup> D'Amico S, Collins T, Marx J, Feller G, Gerday C. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports* [Internet]. 2006 [cited 23 January 2018];7(4):385-389. Available from:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585939>
- <sup>48</sup> Flores p, Muñoz. GLACIAL UNION, microorganismos en el patio del polo sur [Internet]. Chile: boletín antártico chileno; 2018 p. 1-3. [cited 23 January 2018] Available from:<https://enfermeriavulare16.files.wordpress.com/2016/08/proteinas-anticongelantes.pdf>
- <sup>49</sup> Jia Z, Davies P. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences* [Internet]. 2002 [cited 23 January 2018];27(2):101-106. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11852248>
- <sup>50</sup> Nichols C, Lardièrre S, Bowman J, Nichols P, A.E. Gibson J, Guézennec J. Chemical Characterization of Exopolysaccharides from Antarctic Marine

- Bacteria. *Microbial Ecology* [Internet]. 2005 [cited 23 January 2018];49(4):578-589. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052372>
- <sup>51</sup> Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2003 [cited 23 January 2018];1(3):200-208. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro773>
- <sup>52</sup> Deming J. Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2002 sciencedirect. [cited 23 January 2018];5(3):301-309. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527402003296?via%3Dihub>
- <sup>53</sup> Aldi F, Marchetto D, Pini F, Fani R, Michaud L, Lo Giudice A et al. Biochemical and microbial features of shallow marine sediments along the Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Continental Shelf Research* [Internet]. 2010 [cited 23 January 2018];30(15):1614-1625. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278434310002025>
- <sup>54</sup> Montaña J. Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque alto andino del parque nacional natural los nevados. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS; [Internet] 2015. [cited 23 January 2018] <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/17002/MontanaLaraJoseSalvador2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- <sup>55</sup> Olufsen M, Smalås A, Moe E, Brandsdal B. Increased Flexibility as a Strategy for Cold Adaptation. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2005 [cited 10 August 2018];280(18):18042-18048. Available from: <http://www.jbc.org/content/280/18/18042.full>
- <sup>56</sup> Merino s. estructura de la membrana celular [pregrado]. universidad nacional de colombia; 2018. Available from: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/1805/2.INTRODUCCION.pdf?sequence=3>
- <sup>57</sup> vasquez c, mac cormack w. buscando bacterias psicofilas en la Antártida. researchgate. researchgate.net [Internet]. 2007; [cited 10 August 2018] Available from



[https://www.researchgate.net/profile/Marcelo\\_Leppe/publication/320536051\\_Visiones\\_sobre\\_Ciencia\\_Antartica/links/59ea30134585151983c7ea1e/Visiones-sobre-Ciencia-Antartica.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marcelo_Leppe/publication/320536051_Visiones_sobre_Ciencia_Antartica/links/59ea30134585151983c7ea1e/Visiones-sobre-Ciencia-Antartica.pdf)

- <sup>58</sup> Martínez p. Psicrófilos: los secretos para no morir de frío [Internet]. 1st ed. 2013 cienciorama.unam [cited 10 August 2018] . Available from: [http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/318\\_cienciorama.pdf](http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/318_cienciorama.pdf)
- <sup>59</sup> Feller G, Arpigny J, Narinx E, Gerday C. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* [Internet]. 2010 [cited 10 August 2018];118(3):495-499. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.umng.edu.co/science/article/pii/S030096299700011X?via%3Dihub>
- <sup>60</sup> Gerday C, Aittaleb M, Arpigny J, Baise E, Chessa J, Garsoux G et al. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* [Internet]. 2004 [cited 10 August 2018];1342(2):119-131. Available from: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.umng.edu.co/science/article/pii/S0167483897000939#FIG4>
- <sup>61</sup> Google. Proteínas anticongelantes, su producción y uso. ES2214406T3,2004. <https://patents.google.com/patent/ES2214406T3/es>
- <sup>62</sup> Navas d. Caracterización Molecular de Actinomicetos Provenientes de Ecosistemas Antárticos [pregrado]. Uta.edu.ec [Internet] 2012 [cited 10 April 2018] Available from: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/5067/1/uy24-17012.pdf>
- <sup>63</sup> Escalante Lozada, Adelfo, Gosset Lagarda, Guillermo, Martínez Jiménez, Alfredo, Bolívar Zapata, Francisco, Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas . *Agrociencia* 2004 [online] : [cited 10 April 2018] Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30238602>
- <sup>64</sup> Heath C, Hu X, Cary S, Cowan D. Identification of a Novel Alkaliphilic Esterase Active at Low Temperatures by Screening a Metagenomic Library from Antarctic Desert Soil. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2009 [cited 10 April 2018];75(13):4657-4659.

Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704825/>

- <sup>65</sup> Juidías Rodríguez V. QiimeApp – Una plataforma web para análisis metagenómicos [pregrado] . Universidad de la laguna; [Internet]. 2016[cited 10 April 2018]  
<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/2614/QiimeApp%20-%20Una%20plataforma%20web%20para%20analisis%20metagenomicos.pdf?sequence=1>.
- <sup>66</sup> Torres r. INFORME FINAL CRUCERO OCEANOGRÁFICO “Crucero Expedición de Colombia a la Antártida 2016 - 2017” [online]. colombia; 2016 p. 44-45. Available from:
- <sup>67</sup> Sanchez L, Posada M, proyecto a convocatoria interna investigaciones. Caracterización de la diversidad protista psicrófila procedente de la Antártida y su potencial aplicación en biotecnología, Universidad colegio mayor de Cundinamarca, 2016-2017.
- <sup>68</sup> Secuenciación de ADN [Internet]. Khan Academy. 2018 [cited 12 September 2018]. Available from:  
<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>
- <sup>69</sup> Logan, e. . Genomic and phenotypic comparison of *Bacillus fumarioli* isolates from geothermal Antarctic soil and gelatine.[Accessed 22 Oct. 2018]. - PubMed - NCBI 2018. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Research in Microbiology  
Available at:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249066>
- <sup>70</sup> Krizova L, e. . *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. - PubMed - NCBI.2015 [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Microbiology Society [Accessed 22 Oct. 2018]. Available at:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26245775>
- <sup>71</sup> Barreto M, *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2016 Oct [citado 2018 Oct 22] ; 33( 5 ): 547-557. Disponible en:  
[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182016000500010&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000500010&lng=es).  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>.
- <sup>72</sup> Pedraza, S. . Impacto de las actividades humanas en el estado sanitario de fócidos y otarios en la península Antártica.2011 [online] revista

científica de Ecología y medio ambiente [Accessed 22 Oct. 2018].  
Redalyc.org. Available at:  
<http://www.redalyc.org/pdf/540/54021285010.pdf>

- <sup>73</sup> CASTAÑEDA, F. DETECCIÓN DE Salmonella enterica EN PINGÜINOS PAPÚA (*Pygoscelis papua*) DEL TERRITORIO ANTÁRTICO CHILENO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS [online] Repositorio.uchile.cl. 2014 Available at: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132092/Detecci%C3%B3n-de-Salmonella-enterica-en-ping%C3%BCinos-pap%C3%BAa-%28Pygoscelis-papua%29-del-territorio-ant%C3%A1rtico-chileno-y-determinaci%C3%B3n-de-resistencia-a-antibi%C3%B3ticos.pdf?sequence=1> [Accessed 22 Oct. 2018].
- <sup>74</sup> Xu Z, e. *Oceanisphaera profunda* sp. nov., a marine bacterium isolated from deep-sea sediment, and emended description of the genus *Oceanisphaera*. - PubMed - NCBI 2014, Microbiology Society [online] Ncbi.nlm.nih.gov. [Accessed 23 Oct. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425742>
- <sup>75</sup> Zhou S, e. *Oceanisphaera psychrotolerans* sp. nov., isolated from coastal sediment samples. - PubMed - NCBI. 2015 [online] [Accessed 23 Oct. 2018].Ncbi.nlm.nih.gov. Microbiology Society. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991663>
- <sup>76</sup> Shin NR, e. *Oceanisphaera sediminis* sp. nov., isolated from marine sediment. - PubMed - NCBI 2012. [online] [Accessed 23 Oct. 2018].Ncbi.nlm.nih.gov. Microbiology Society. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856983>
- <sup>77</sup> Cecotti, e. Estudio metabólico y molecular de cultivos bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y resistentes a metales pesados.2018 [online] [Accessed 23 Oct. 2018].Digital.cic.gba.gob.ar. rev. Quimicaviva, Buenos Aires, Argentina Availableat:[https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/4400/Morelli\\_Quimica\\_Viva.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digital.cic.gba.gob.ar/bitstream/handle/11746/4400/Morelli_Quimica_Viva.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- <sup>78</sup> Gneiding, K. Identidades de *Microbacterium* spp. Encontrado en muestras clínicas humanas [online] 2008 Microbiologyresearch.org. [Accessed 23 Oct. 2018]. Available at : [https://www.researchgate.net/publication/281365585\\_Microbacterium\\_Isolated\\_from\\_Oil-contamina](https://www.researchgate.net/publication/281365585_Microbacterium_Isolated_from_Oil-contamina)

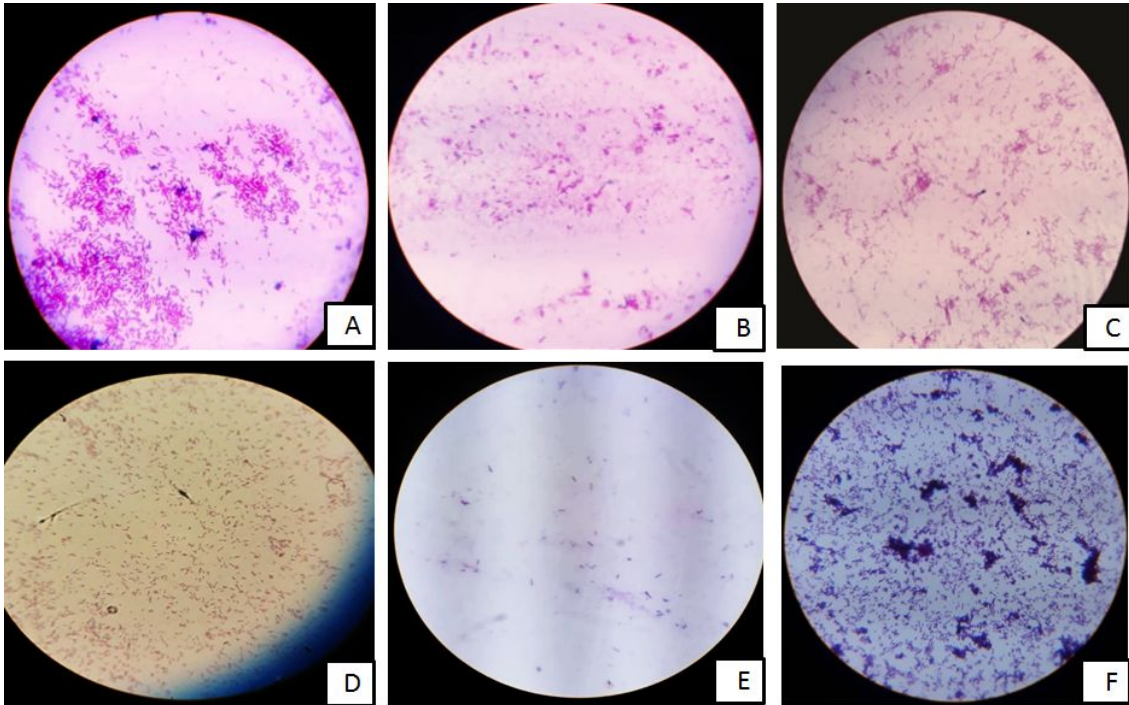
ted\_Soil\_in\_South-East\_Nigeria

- <sup>79</sup> Wen y, J. *Microbacterium halotolerans* sp. nov., isolated from a saline soil in the west of China 2018. [online] Microbiologyresearch.org.[Accessed 23 Oct. 2018]. Available at:  
<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/55/1/67.pdf?expires=1540270174&id=id&accname=guest&checksum=5EF465F10B7F427F8E385B25D1BC7EEE>
- <sup>80</sup> Yan W, e. Complete genome sequence of the *Sporosarcina psychrophila* DSM 6497, a psychrophilic *Bacillus* strain that mediates the calcium carbonate precipitation. (2016). - PubMed Journal of Biotechnology - NCBI. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. [Accessed 23 Oct. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27015981>
- <sup>81</sup> So J, Shick Choi N, choi J, lee J, Jung-Hoon Y, song J. *Brevundimonas naejangsanensis* sp. nov., a proteolytic bacterium isolated from soil, and reclassification of *Mycoplana bullata* into the genus *Brevundimonas* as *Brevundimonas bullata* comb. nov. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva* 59 [Internet]. 2009 [cited 18 October 2018];(59):3155-3160. Available from: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.011700-0;jsessionid=6A8li3a24kf19lyGORuDEtYo.x-sgm-live-03#tab9>
- <sup>82</sup> Martín I. Género *Arthrobacter*. [online] Diversidadmicrobiana.com. 2018 Available at [https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=743&Itemid=849](https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=743&Itemid=849) [Accessed 23 Oct. 2018].
- <sup>83</sup> Lars Ganzert, L. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt- and psychrotolerant species isolated from Livingston Island, Antarctica - ePIC. [online] 2011 Epic.awi.de.[Accessed 23 Oct. 2018]. Available at: <http://epic.awi.de/21540/>
- <sup>84</sup> Gualoto, M. . BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS UTILIZANDO CEPAS ANTÁRTICAS. [online] SEMINARIO “ECUADOR EN LA ANTÁRTIDA: HISTORIA, PERSPECTIVAS Y PROYECCIONES”, At Quito Ecuador. [online] 2011 [Accessed 23 Oct. 2018] Available at: [https://www.researchgate.net/publication/291334590\\_BIORREMEDIACION\\_DE\\_HIDROCARBUROS\\_UTILIZANDO\\_CEPAS\\_ANTARTICAS](https://www.researchgate.net/publication/291334590_BIORREMEDIACION_DE_HIDROCARBUROS_UTILIZANDO_CEPAS_ANTARTICAS) [Accessed 23 Oct. 2018].
- <sup>85</sup> Abraham, W. . Proyecto de secuencia del genoma de *Pseudomonas psychrophila* MTCC 12324, aislado del Ártico a 79 [online] 2015

[Accessed 10 Oct. 2018] Available at:[https://www.researchgate.net/publication/279282829\\_Draft\\_Genome\\_Sequence\\_of\\_Pseudomonas\\_psychrophila\\_MTCC\\_12324\\_Isolated\\_from\\_the\\_Arctic\\_at\\_79N](https://www.researchgate.net/publication/279282829_Draft_Genome_Sequence_of_Pseudomonas_psychrophila_MTCC_12324_Isolated_from_the_Arctic_at_79N) [Accessed 23 Oct. 2018].

<sup>86</sup> Comerio, R. . Algunos micromicetes del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. [online] 2018 [Accessed 23 Oct. 2018]. Reviberoammicol.com. Available at: <http://reviberoammicol.com/2004-21/128134>

## ANEXOS



**Anexo 1.** Observación microscópica de láminas de Gram correspondientes al crecimiento en caldos Isla Livingston. Convenciones tabla 3 A. 1(A) Bacilos gram negativos isla Livingston , B. 5(B) Bacilos gram negativos isla Livingston, C. 17(C) Bacilos gram negativos isla Livingston, D. 7(D Bacilos gram negativos isla Livingston), E. 4(E) Bacilos gram positivos isla Livingston,F. 6(F) Bacilos gram positivos isla Livingston.

**Anexo 2** Características del crecimiento de microorganismos en medios sólidos

Convenciones microorganismo	Isla de la que proviene la muestra	Temperatura de crecimiento	Medio sólido en el que creció	Descripción del medio sólido
I	Livingston	20°C	Sangre /Nutritivo /McConkey	colonia cremosa brillante superficie lisa elevación plana, borde entero, densidad opaca sin hemólisis, en agar Mc Conkey las colonias son incoloras y transparentes no fermentadoras
II	Deception	20°C	Sangre /Nutritivo	colonia cremosa translúcida superficie lisa elevación plana, densidad clara, borde entero sin hemólisis
III	Deception	20°C	Sangre /Nutritivo /	colonia cremosa opaca, superficie lisa elevación plana, densidad opaca, borde entero sin hemólisis.
IV	Livingston	20°C	Sangre /Nutritivo	colonia cremosa amarilla clara, superficie lisa elevación plana, densidad opaca, borde entero sin hemólisis
V	Livingston	4°C	Sangre /Nutritivo	colonia translúcida, superficie lisa

			o	elevación plana, borde entero sin hemólisis
VI	Livingston	4°C	Sangre /Nutritivo	colonia verde cremosa, superficie lisa elevación plana, densidad opaca, borde entero sin hemólisis
VII	Livingston	4°C	Sangre /Nutritivo	colonia blanca cremosa brillante, superficie lisa elevación plana, densidad opaca borde entero sin hemólisis
VIII	Livingston	20°C	Sangre /Nutritivo	colonia blanca opaca, superficie lisa elevación plana, densidad opaca borde entero sin hemólisis
IX	Deception	20°C	Sangre/ Mc Conkey	colonia cremosa opaca, superficie lisa elevación plana, densidad opaca borde entero sin hemólisis en agar Mc Conkey las colonias son incoloras y transparentes no fermentadoras
X	Deception	20°C	Sangre	colonia gris clara brillante, redonda, superficie lisa



				elevación plana, densidad opaca borde ondulado sin hemólisis
XI	Deceptio n	4°C	Sangre	colonia crema oscura brillante superficie lisa elevación plana, densidad opaca borde entero sin hemólisis
XII	Deceptio n	20°C	Sangre	colonia crema oscura opaca de superficie lisa elevación plana, densidad opaca borde entero sin hemólisis
XIII	Deceptio n	20°C	Sangre	colonia blanca translúcida brillante superficie lisa elevación plana, densidad borde entero con hemólisis Beta
IVX	Deceptio n	20°C	Sangre	colonia crema opaca, redonda,superficie lisa, elevación plana, densidad opaca,consistencia viscosa, sin hemólisis
XV	Deceptio n	4°C	Sangre	colonia crema amarillenta, redonda ,superficie lisa, elevación plana, densidad opaca,consistencia viscosa, sin

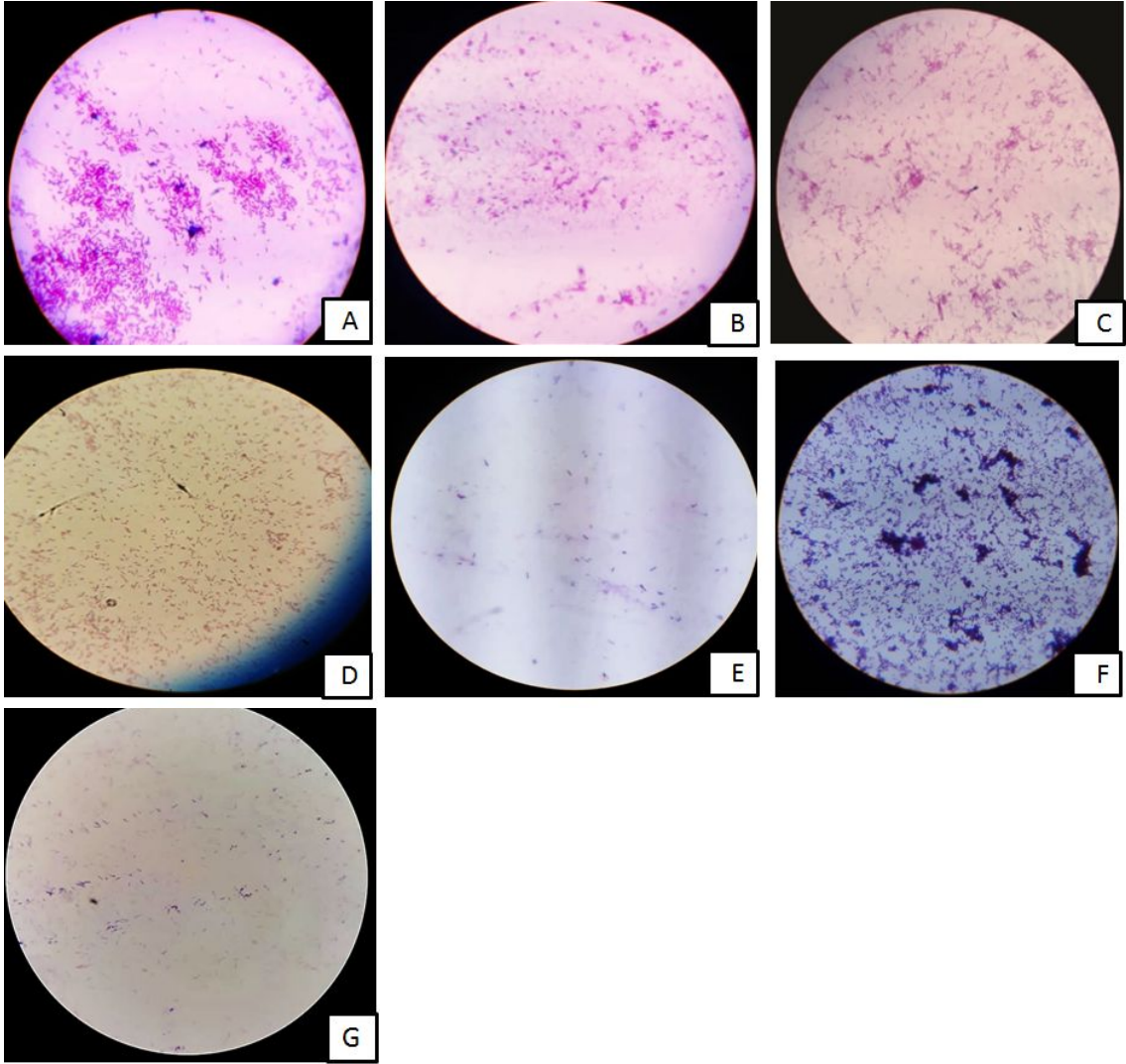
				hemólisis
XVI	Deception	50°C	Sangre	colonia amarilla translúcida de poco crecimiento, redonda, superficie lisa, elevación plana, densidad translúcida, consistencia viscosa, sin hemólisis
XVII	Livingston	4°C	Sangre	colonia amarilla cremosa, brillante, forma irregular, superficie lisa, elevación plana, consistencia viscosa, sin hemólisis
XVIII			Sangre	colonia amarilla cremosa, brillante, forma irregular, superficie lisa, elevación plana, consistencia viscosa, sin hemólisis
XIX			Sangre	Colonia blancas opacas redondas brillantes, cremosas, elevación plana, superficie lisa, viscosa, sin hemólisis.
XX			Sangre	Colonias blancas crema opacas, puntiforme, sin hemólisis.

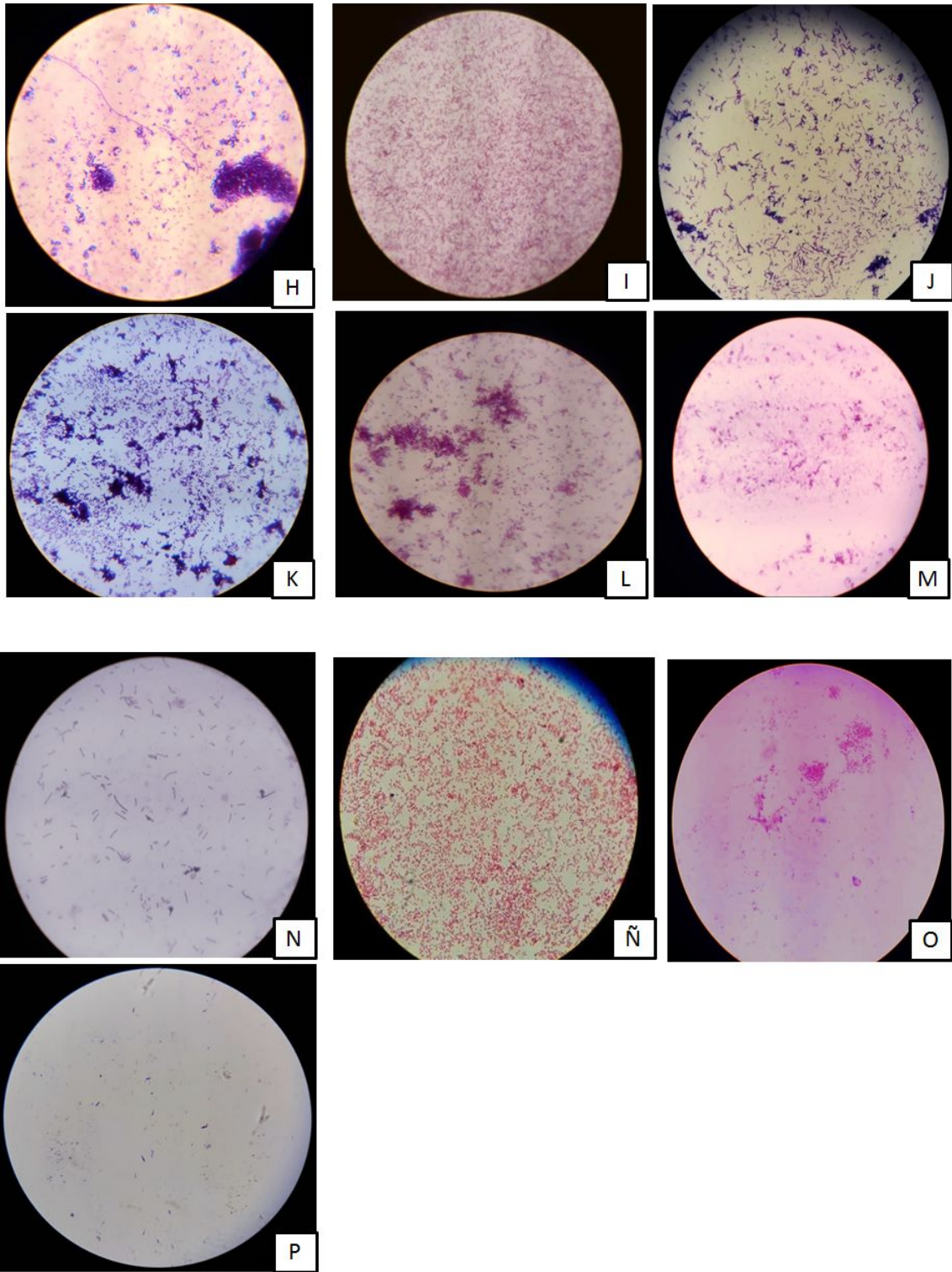
**Anexo 3.** Características del crecimiento de microorganismos en medios líquidos

<b>Convención</b>	<b>Isla de la que proviene la muestra</b>	<b>T° Crecimiento</b>	<b>[ ] NaCl</b>	<b>M</b>	<b>Observación coloración de Gram</b>
<b>1 (A)</b>	Livingston	20° C	0.85	M3	Bacilos Gram Negativo
<b>2 (H)</b>	Decepción	20° C	1.1	M3	Bacilos Gram positivos
<b>3 (I)</b>	Decepción	20° C	0.57	M1	Bacilos Gram Negativos
<b>4 (E)</b>	Livingston	4° C	0.57	M3	Bacilos Gram positivos
<b>5 (B)</b>	Livingston	4°C	0.85	M4	Coco Bacilos Gram negativos
<b>6 (F)</b>	Livingston	4°C	0.57	M4	Bacilos Gram positivos
<b>7 (D)</b>	Livingston	4°C	1.1	M4	Bacilos Gram negativos
<b>8 (G)</b>	Livingston	20°C	0	M4	Bacilos Gram negativos Pleomórficos
<b>9 (J)</b>	Decepción	20°C	0	M3	Mixta (Bacilos Gram positivos y negativos)
<b>10 (K)</b>	Decepción	20°C	0.85	M1	Bacilos Gram positivo (pequeños y grandes)
<b>11 (L)</b>	Decepción	4°C	1,1	M1	Bacilos Gram negativos

<b>12 (M)</b>	Decepción	20°C	0,57	M4	Bacilos Gram negativo
<b>13 (N)</b>	Decepción	20°C	0,57	M3	Bacilos Gram positivo mixto (pequeños y grandes)
<b>14 (Ñ)</b>	Decepción	20°C	0,85	M3	Bacilos Gram negativos
<b>15 (O)</b>	Decepción	4°C	1,1	M5	Bacilos Gram negativos
<b>16 (P)</b>	Decepción	50°C	0	M6	Bacilos Gram positivo
<b>17 (C)</b>	Livingston	20°C	0	M6	Bacilos Gram negativos

#### Anexo 4

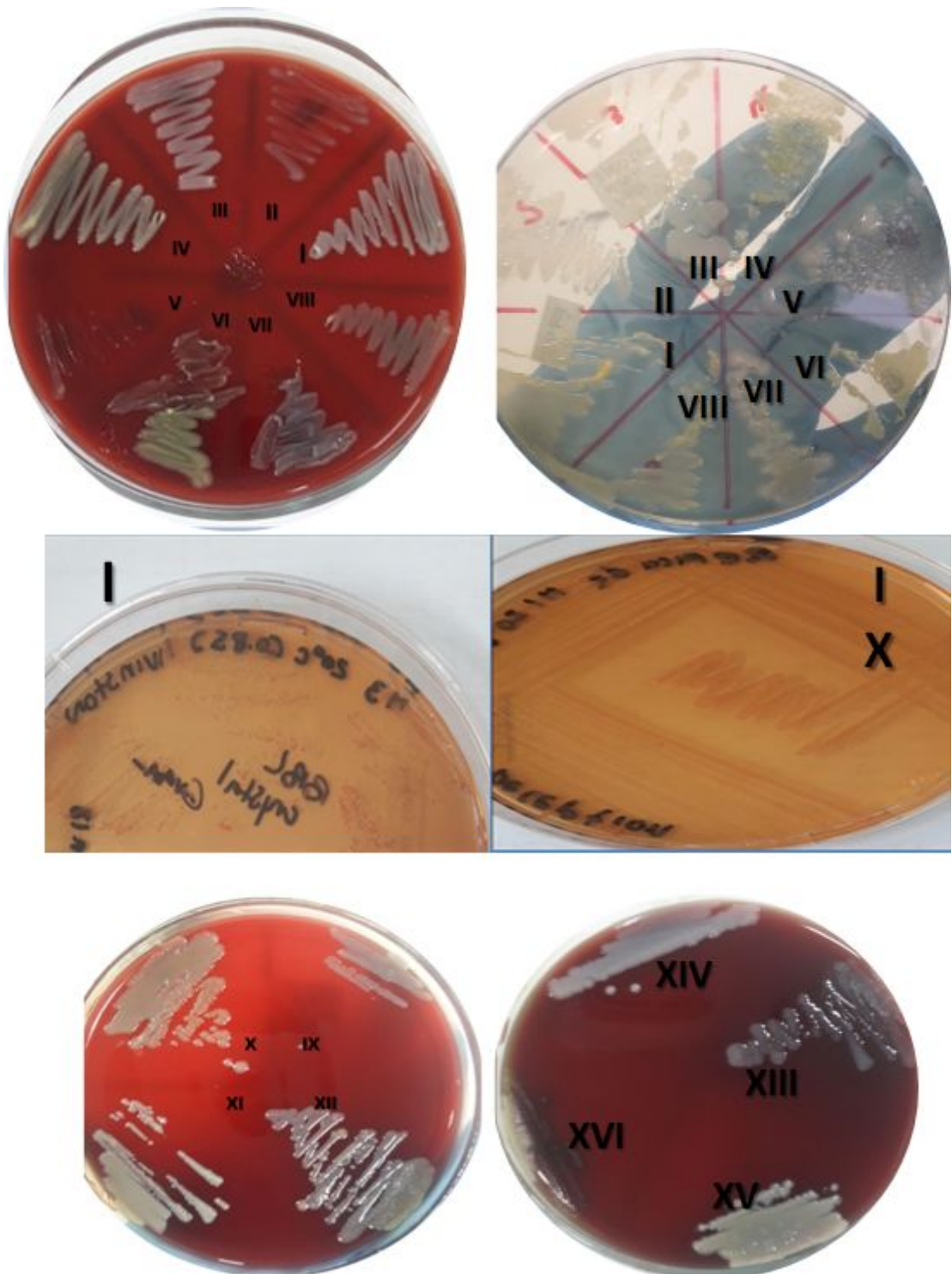




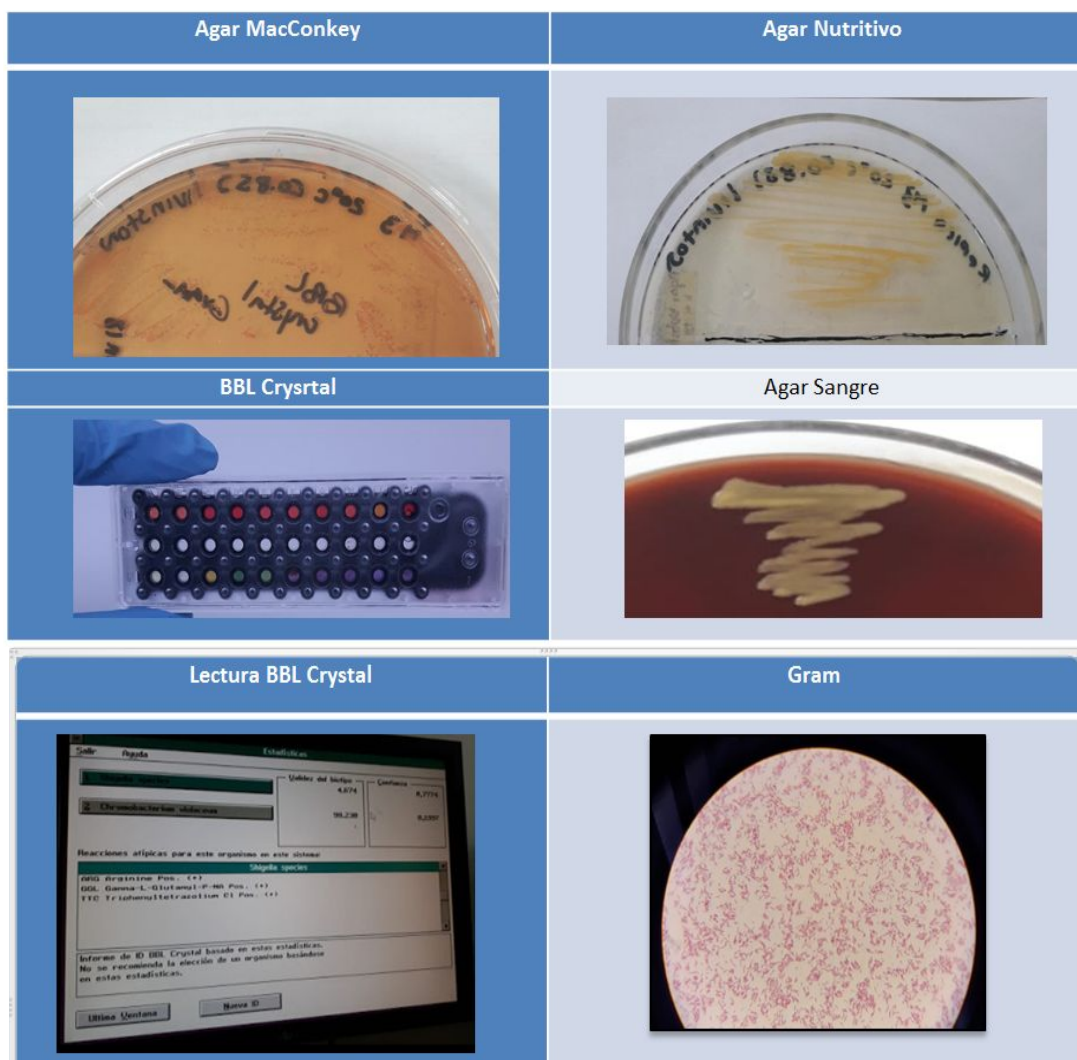
**Anexo 4** Laminas de coloración de Gram de microorganismos que crecieron en los medios de cultivo. diferentes medios de cultivo con microorganismos aislados de las dos islas livingston y decepción A(Bacilos Gram negativos) B(Bacilos Gram negativos) C (Bacilos Gram negativos) D (Bacilos Gram negativos) E (Bacilos Gram positivos) F (Bacilos Gram positivos) G (Bacilos Gram positivos)

H (Bacilos Gram positivos) I (Bacilos Gram negativos) J (Bacilos Gram positivos) k (Bacilos Gram positivos) L (Bacilos Gram negativos) M (Bacilos Gram positivos) N (Bacilos Gram positivos) Ñ (Bacilos Gram negativos) O (Bacilos Gram positivos) P (Bacilos Gram positivos).

**Anexo 5** Cepas puras en Medios de cultivo sólido aisladas de la islas Livingston y Decepción en la Antártida.

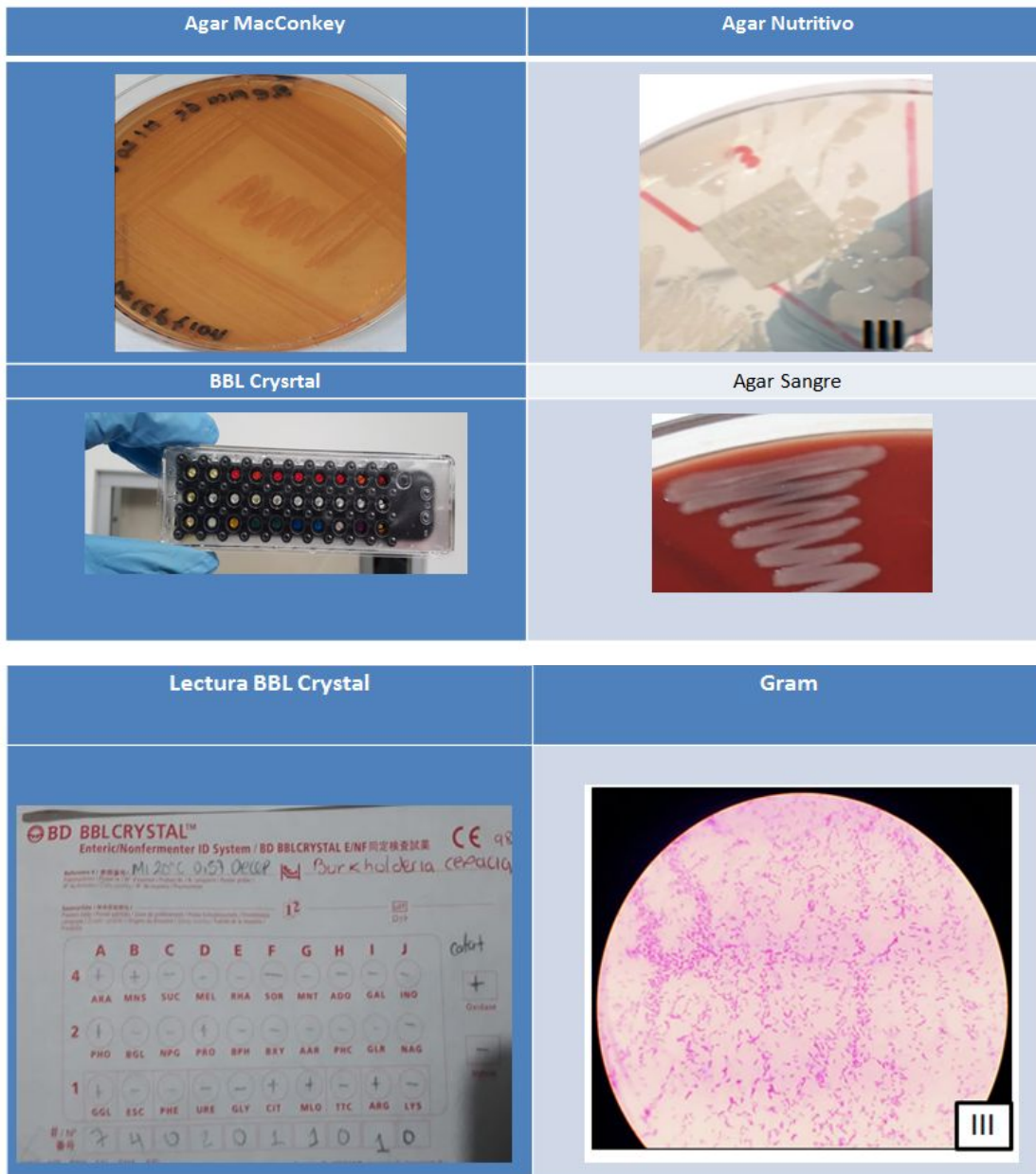


## Anexo 6 Microorganismos identificado con BBL Crystal del Género *Salmonella* sp



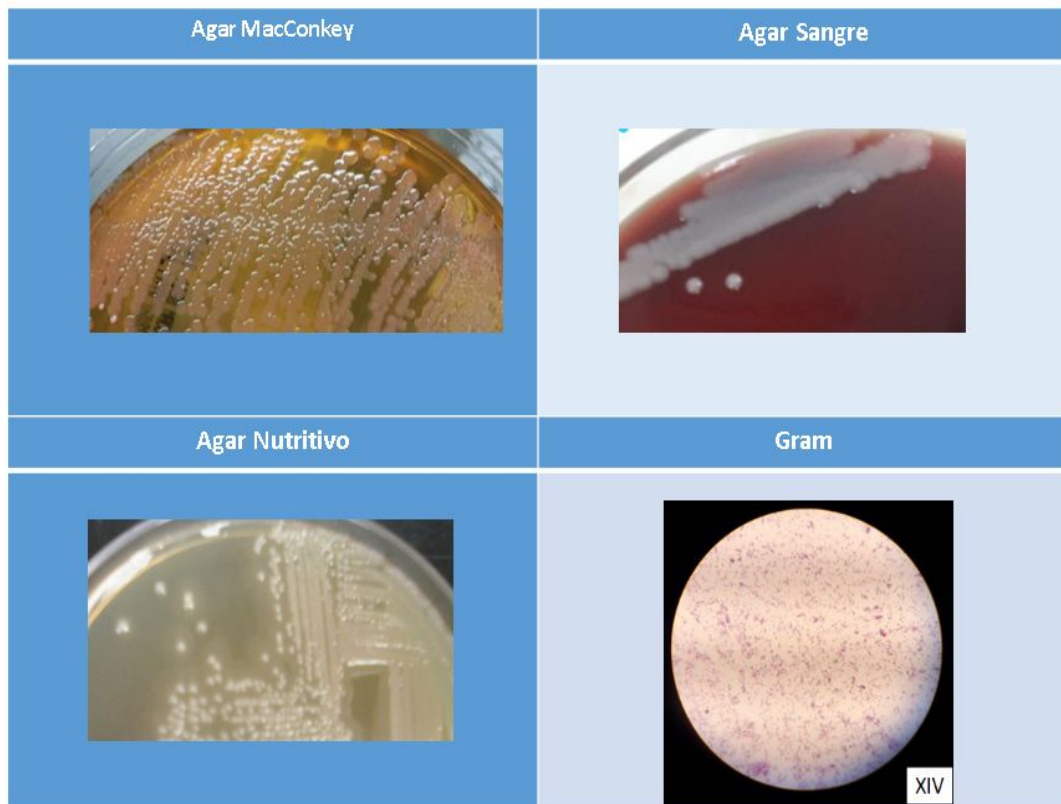


**Anexo 7** Microorganismos identificado con BBL Crystal del Género *Burkholderia* sp



## Anexo 8

Microorganismos identificado con BBL Crystal del Género *Bacillus* sp



## **Anexo 9**

### **PROTOCOLO EXTRACCIÓN DNA BACTERIANO WIZARD**

1. Centrifugar el tubo eppendorf previamente incubado toda la noche a 13,000 - 16,000 g descartar el sobrenadante.

#### **A. GRAM POSITIVAS**

1. Suspender pellet en 480 ml de EDTA 50 mM
2. Adicionar 120 ml de lisozima
3. Incubar a 37°C por 30-60 minutos
4. Centrifugar x 2 min o 13,000-16,000 g y descartar sobrenadante
5. lisis celular

#### **B.GRAM NEGATIVAS**

##### **Lisis celular**

1. Adicionar 600 ml de solución Nuclei Lysis . Pipetear suavemente para mezclar.
2. Incubar por 5 min a 80°C , luego enfríe a t° ambiente .
3. Adicionar 3 ml de solución RNasa. Mezclar, incubar a 37°C por 15-60 minutos , luego enfríe a T° ambiente .

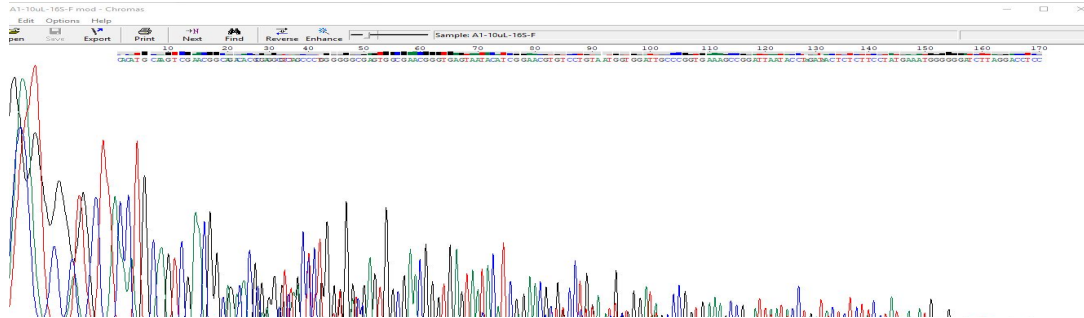
##### **Precipitacion de Proteinas**

4. Adicionar 200 ml de solución protein precipitation ,Vortex.
5. Incubar en Hielo por 5 minutos
6. centrifugar a 13,000-16,000 g por 3 minutos.

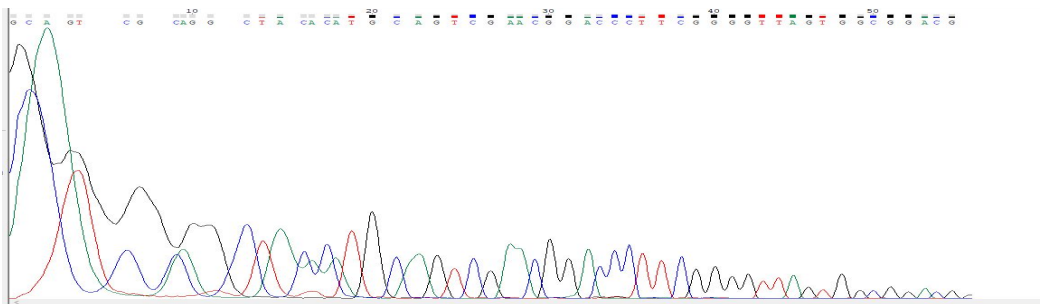
##### **Precipitación y rehidratación de DNA .**

7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 600 ml de isopropanol a T° ambiente . Mezclar .
8. Centrifugar por 2 min a 13,000 - 16,000 g
9. Adicionar 600 ml de etanol al 70% a T° ambiente . Mezclar .
10. Centrifugar por 2 min a 13,000 -16,000 g
11. Aspire el etanol y el aire del pellet por 10 - 15 minutos
12. Rehidrata el pellet de DNA en 100 ml de Rehydration solution por 1 hora a 65 °C o toda la noche a 4°C

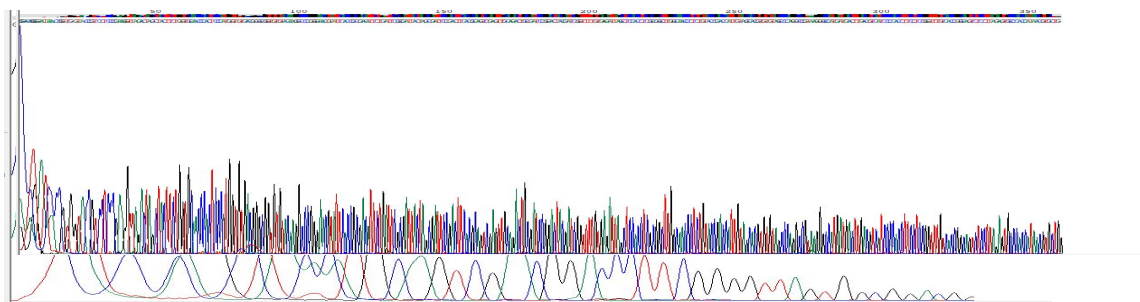
Anexo 10 secuencia A1 Burkholderia sp. THG-DD5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



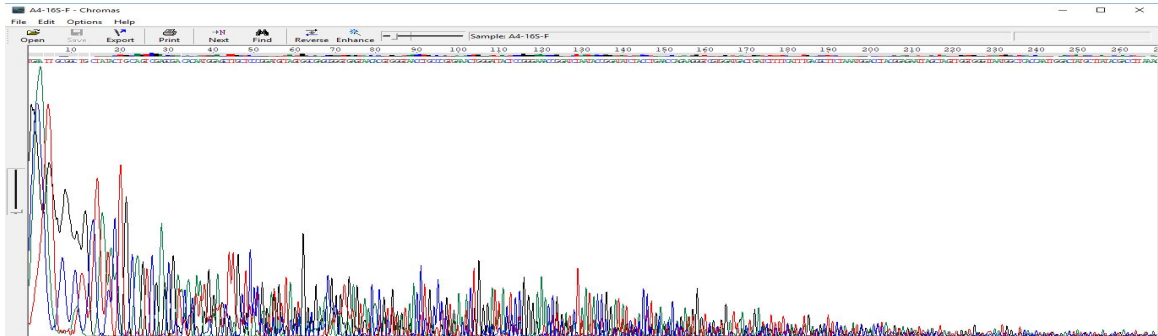
ANEXO 11 Secuencia A2 Brevundimonas bullata strain QFF3 16S RNA ribosomal, secuencia parcial



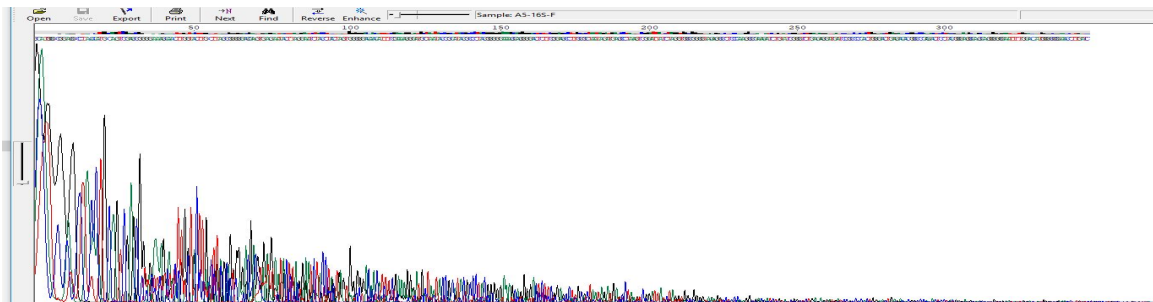
ANEXO 12 Secuencia A3 Pseudomonas sp. FQ-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



ANEXO 13 Secuencia A4 Bacillus sp. Asnod6C12 partial 16S rRNA gene, isolate Asnod6C12



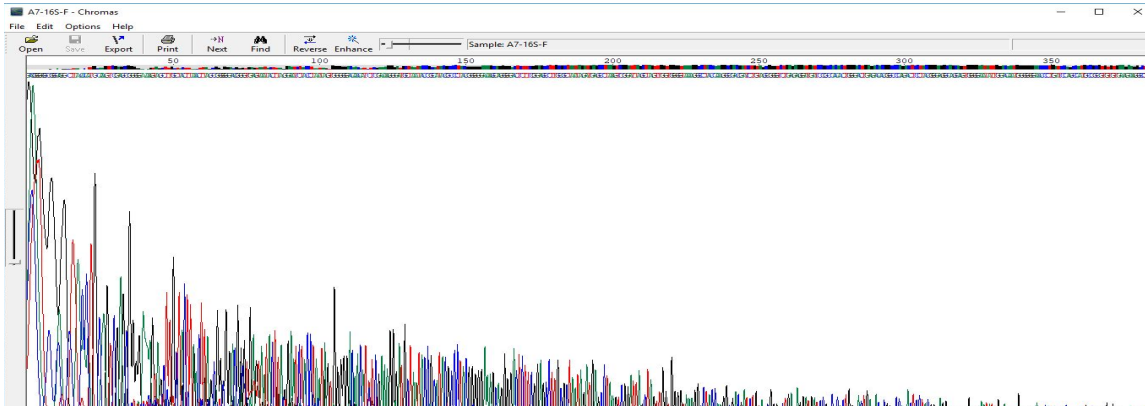
Anexo 14 Secuencia A5 Acinetobacter albensis strain KBL23 16S RNA ribosomal, secuencia parcial



Anexo 15 Secuencia A6 Arthrobacter sp. T7E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



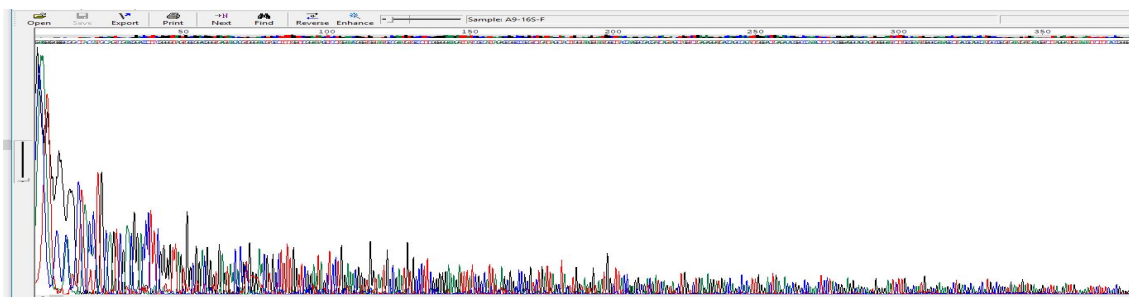
ANEXO 16 secuencia A7 Acinetobacter lwoffii strain D81 16S RNA ribosoma, Secuencia parcial.



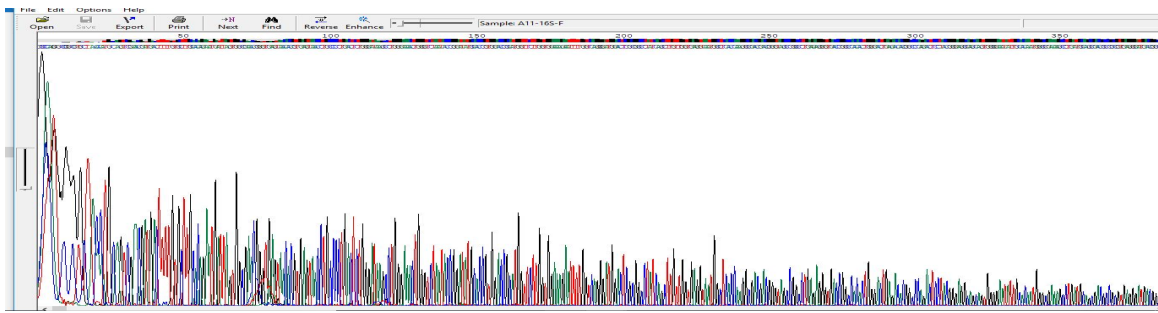
ANEXO 17 Secuencia A8 Staphylococcus sp. strain S14 16S RNA ribosomal, secuencia parcial.



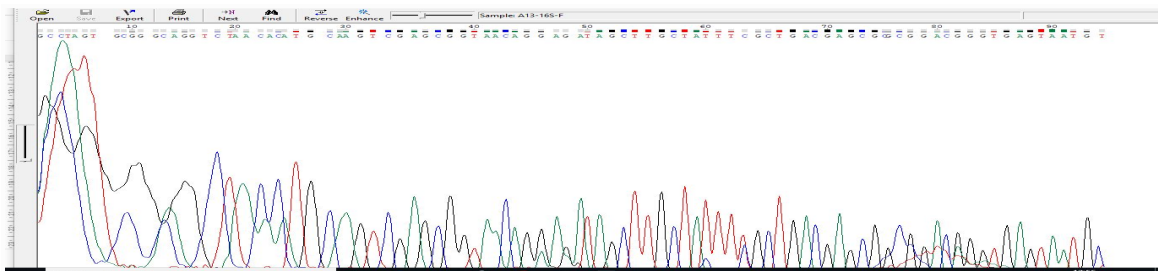
ANEXO 18 Secuencia A9 Brevundimonas sp. 8 16S RNA ribosomal secuencia parcial.



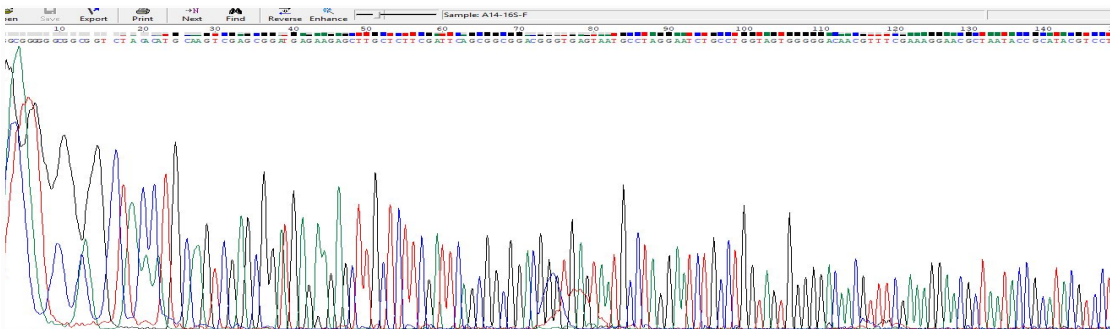
ANEXO 19 Secuencia A11 Arthrobacter sp. TMN-10-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



ANEXO 20 Secuencia Anexo A13 *Oceanisphaera* sp. strain QHU10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



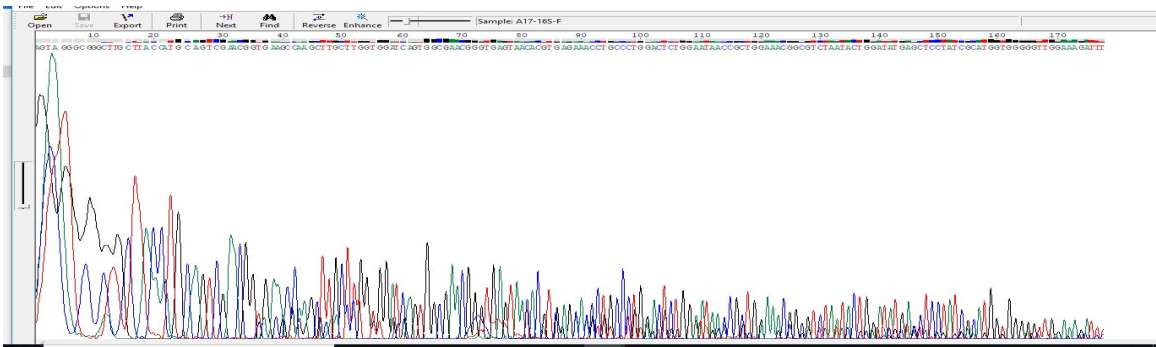
ANEXO 21 Secuencia A14 *Pseudomonas putida* cepa FQ-45 16S ARN ribosomal, secuencia parcial



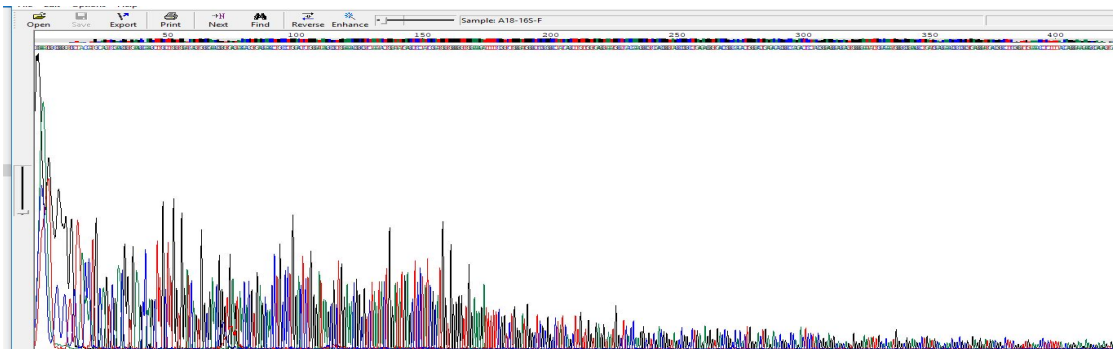
ANEXO 22 Secuencia A15 *Paeniglutamicibacter* sp. strain P-35-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



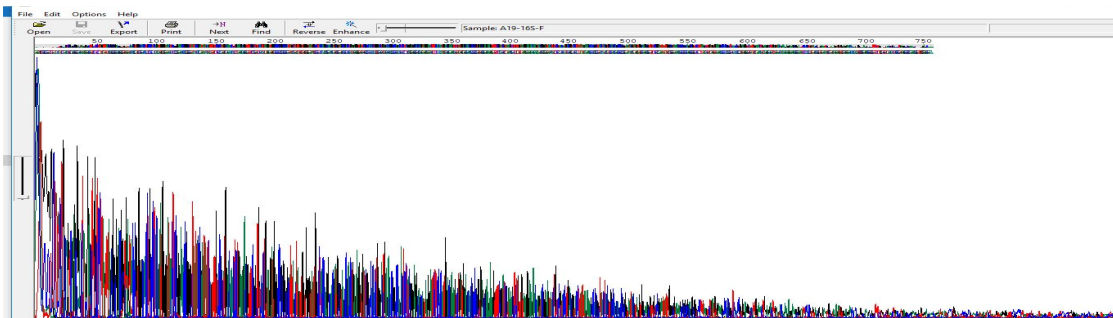
ANEXO 23 Secuencia A17 *Microbacterium* sp. HBUM178907 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



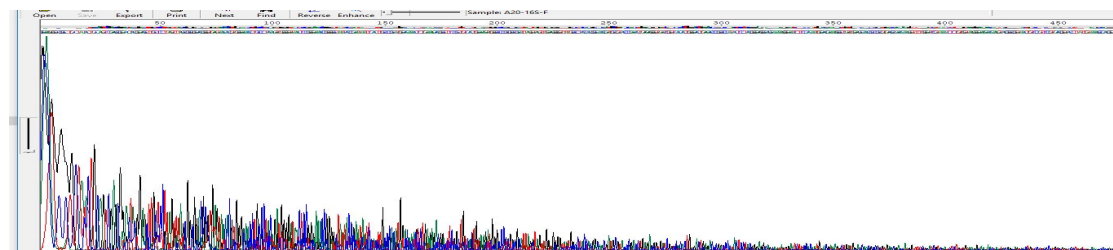
ANEXO 24 Secuencia A18 Microbacterium sp. MJ18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



Anexo 25 Secuencia A19 Sporosarcina psychrophila strain COP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence



Anexo 26 Secuencia A20 Bacillus sp. SS16.21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Bacillus sp. SS16.21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence





## Anexo 27

Invitrogen 100 bp DNA Ladder está diseñado para dimensionar y cuantificar de forma aproximada el ADN de doble cadena en el rango de 100 bp a 2,000 bp. La escalera de ADN de 100 pb consta de 13 fragmentos de ADN purificados por cromatografía individuales y tiene bandas de referencia a 2000, 1500 y 600 pb para una fácil orientación.

La escalera de ADN de 100 pb es ideal para la separación en geles de agarosa al 1-2%.

Aspectos destacados de la escalera de ADN de 100 pb:

- Bandas nítidas y transparentes: fragmentos purificados por cromatografía para obtener resultados consistentes y confiables
- Conveniente: provisto de 10X BlueJuice Gel Loading Buffer para el seguimiento de la migración de ADN de muestra
- Preciso: una cantidad exacta de ADN en cada banda

Uso del producto

La escalera de ADN de doble cadena se puede visualizar en geles de agarosa al 1-2% después de la tinción con bromo de etidio o SYBR Safe. La escalera está diseñada con una intensidad uniforme de bandas de ADN para una visión clara de cada banda. Una cantidad exacta de ADN en cada banda permite la cuantificación aproximada de las muestras de ADN.

Esta escalera puede ser radiomarcada con polinucleótido quinasa T4 o ADN polimerasa T4.