

Conservación

Bacterias extremótrofas y extremófilas resistentes a radiación UV-B aisladas de la laguna de Salinas, un humedal altoandino del Perú

UV-B resistant extremotrophic and extremophilic bacteria isolated from Salinas Lake, a high Andean wetland of Peru

Kevin Gabriel Quispe-Choque * y María Rosario Elsa Valderrama-Valencia

Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Calle Santa Catalina Núm. 117, Cercado, Arequipa, 04000, Perú

*Autor para correspondencia: kquispecho@unsa.edu.pe (K.G. Quispe-Choque)

Recibido: 24 julio 2023; aceptado: 19 enero 2024

Resumen

La laguna de Salinas es un humedal salino altoandino ubicado en la región de Arequipa al sur de Perú. Actualmente, está sometido a actividades antropogénicas como la extracción de sales, el turismo de aventura y el cambio climático. A pesar de ser un entorno de importancia biológica, la diversidad de poblaciones microbianas ha sido poco explorada. La ubicación de este entorno en una región con índice UV extremos, altitud sobre 4,000 m y otros factores adversos destacan este ambiente como potencial para la bioprospección de microorganismos extremófilos y extremótrofos. En el presente estudio aislamos cepas bacterianas nativas de muestras de agua de la laguna de Salinas y realizamos la caracterización fenotípica a nivel morfológico y fisiológico mediante ensayos de tolerancia a NaCl, temperatura, pH y radiación UV-B. Reportamos cepas halotolerantes, psicotolerantes, alcalófilas moderadas y cepas resistentes a radiación UV-B y una cepa alcalófila obligada. La identificación se realizó mediante el análisis molecular basado en el DNAr 16S. Los géneros identificados fueron *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Dietzia*, *Bacillus* y *Planococcus*. Hasta donde sabemos, el presente trabajo es el primer reporte sobre microorganismos extremófilos y extremótrofos presentes en la laguna de Salinas, promoviendo un nuevo enfoque de prospección sobre este entorno.

Palabras clave: Extremófilos; Extremótrofos; Resistencia UV-B; Laguna de Salinas

Abstract

The Salinas Lagoon is a high Andean saline wetland located in the Arequipa region of southern Peru. Currently, it is subject to anthropogenic activities such as salt extraction, adventure tourism and climate change. Despite being an environment of biological importance, the diversity of microbial populations has been little explored. The location of this environment in a region with extreme UV index, altitude above 4,000 m and other adverse factors highlight this environment as a potential for the bioprospection of extremotroph and extremotrofile microorganisms. In the

present study, we isolated native bacterial strains from water samples of the Salinas Lagoon and performed phenotypic characterization at the morphological and physiological levels by means of tolerance assays to NaCl, temperature, pH and UV-B radiation. We reported halotolerant, psychrotolerant, moderate alkalophilic and UV-B radiation resistant strains and one obligate alkalophilic strain. Identification was performed by molecular analysis based on 16S rDNA. The genera identified were *Arthrobacter*, *Brachy bacterium*, *Dietzia*, *Bacillus* and *Planococcus*. To our knowledge, the present work is the first report on extremophilic and extremotrophic microorganisms present in the Salinas Lagoon, promoting a new approach to survey this environment.

Keywords: Extremophiles; Extremotrophs; UV-B resistance; Salinas Lagoon

Introducción

En los últimos años, en el altiplano de los Andes centrales han sido caracterizados ambientes extremos únicos, descritos como cuencas endorreicas rodeadas por desiertos influenciados por la actividad volcánica (Fariás, 2020). Estos entornos se han denominado como humedales andinos de gran altitud: “HAAL” (por sus siglas en inglés, High-Altitude Andean Lakes), localmente conocidos como humedales, lagunas o salares atalasalinos, ubicados entre 2,000 y 6,000 m de altitud en Perú, Bolivia, Argentina y Chile, caracterizados por distintas condiciones adversas para la vida: alta salinidad, amplia fluctuación de la temperatura, baja presión de oxígeno, balance hídrico negativo, alta concentración de arsénico y dosis altas de radiación UV-B (Albarracín et al., 2015, 2016). El potencial científico de estos entornos radica en la diversidad microbiana que albergan, cuya bioprospección brinda novedosas orientaciones para comprender el origen y evolución de la vida y la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas (Fariás, 2020; Fariás y Contreras, 2018; Visscher et al., 2020).

En Perú se han reportado 2 HAAL: Salinas Maras (Cusco) y los bofedales de Huaytire (Tacna) (Albarracín et al., 2015). Sin embargo, en la región de Arequipa, al sur del Perú también se puede destacar la laguna de Salinas (16°22'1.94" S, 71°8'10.92" O), un humedal altoandino a 4,300 m de altitud en la Puna subtropical de la región, es uno de los 3 salares del Perú y la única que se encuentra dentro de un área natural protegida: Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca (RNSAB). Su ubicación en una de las regiones con índices UV extremos y una altitud sobre 4,000 m destacan a la laguna de Salinas como un entorno potencial para la bioprospección de microorganismos bacterianos. La mayor parte del conocimiento en biología de este entorno se basa en gran medida sobre macroorganismos, especialmente en la diversidad y ecología de aves (Caballero et al., 2010). Mientras que el conocimiento sobre los microorganismos que alberga aún es exiguo, por lo que este humedal es un reservorio de materia oscura microbiana (Bernard et al., 2018).

En algunos HAAL de Sudamérica se han reportado bacterias resistentes a la radiación UV-B (Fernández-Zenoff, Heredia et al., 2006; Fernández-Zenoff, Siñeriz et al., 2006; Flores et al., 2009; Ordoñez et al., 2009; Rasuk et al., 2017). Precisamente, una de las condiciones más limitantes para los seres vivos en el altiplano de los Andes centrales es la radiación UV-B, que registra los valores más altos en el mundo (Albarracín et al., 2015). Este tipo de luz representa la banda de onda más citotóxica que llega a la superficie del planeta, cuyos efectos biológicos, directos e indirectos, pueden conducir a la muerte celular (Pfeifer, 1997; Santos et al., 2012). La bioprospección de entornos sometidos a altas dosis de radiación UV, así como otras condiciones adversas, permite nuevas posibilidades en la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas (Alonso-Reyes et al., 2021; Many et al., 2021; Santos et al., 2023; Sysoev et al., 2021).

El objetivo de la bioprospección microbiana en la laguna de Salinas toma mayor relevancia en el contexto de la importancia del conocimiento de la diversidad y conservación del acervo genético microbiano. Puesto que este humedal es un lugar que será probablemente afectado por el cambio climático (Cabrol et al., 2009) y, además, no es un ambiente totalmente prístino debido a las actividades humanas como extracción de sales y minerales no metálicos y el turismo de aventura, su estudio debe ser prioritario. De esta manera, en el presente estudio se planteó realizar la caracterización de las bacterias aisladas de muestras de agua de la laguna de Salinas a nivel fenotípico morfológico y fisiológico, este último mediante ensayos de tolerancia a factores de estrés como NaCl, temperatura, pH y radiación UV-B; y genotípico mediante el DNAr 16S.

Materiales y métodos

Las muestras se obtuvieron de la zona de la laguna de Salinas con menor actividad humana, como es la extracción de sales. Se tomaron muestras de 3 puntos de muestreo (P1: 16°21'14.89" S, 71°10'33.67" O; P2: 16°21'33.72" S, 71°11'0.83" O; P3: 16°22'21.72" S, 71°10'45.64" O). Para la colección de muestras se siguió el procedimiento

de Ordoñez et al. (2009); se recolectaron muestras de agua superficiales empleando frascos previamente esterilizados y se trasladaron a 4 °C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. Se registraron datos fisicoquímicos como temperatura, pH y salinidad, empleando un multiparámetro HANNA HI 98194.

Cultivo y aislamiento de bacterias. Se tomó 1 ml de la muestra y se diluyó asépticamente en solución salina estéril 0.9% NaCl y se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Se tomaron 100 μ l y se esparció sobre la superficie de medios de agar en placas de Petri. Se emplearon los siguientes medios de cultivo para el aislamiento de bacterias: "Lake Medium" (LM) (Ordoñez et al., 2009), preparado con agua del lago previamente filtrada (para mantener la salinidad de la muestra), 0.25% de extracto de levadura y 1.5% de agar, y medio MGM (Dyall-Smith, 2009), cuya composición es: NaCl 8%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.17%, KCl 0.23%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 Ml.67 ml, Triptona 0.033%, extracto de levadura 0.033%, para obtener un 10% de salinidad. El pH de todos los medios fue ajustado a 7.5. Las placas se incubaron a 20 °C y las observaciones se realizaron a partir de 72 h. Las cepas purificadas se subcultivaron en medio agar Luria Bertani (LB): triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y agar 1.5%. Las cepas purificadas fueron conservadas en crioviales con glicerol (35%) a -80 °C.

Para la caracterización se prepararon cultivos bacterianos incubados a 30 °C en agar LB durante 48-72 h. Se examinaron los rasgos como el color y la morfología celular mediante el empleo de un microscopio óptico (ZEISS, Primo Star). Se empleó el método de Moreno y Albarracín (2012) para la tinción de Gram.

El DNA genómico total se extrajo de cada colonia purificada con el método del CTAB, descrito por Fernández-Zenoff, Siñeriz et al. (2006). La amplificación del gen 16S se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplearon los cebadores universales ARI C/T (5' CTGGCTCAGGACTGAACGCTG) 3' y pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'). Los productos de PCR fueron comprobados en gel de agarosa a 1% para su visualización. La concentración de DNA se cuantificó con un espectrofotómetro (EPOCH 2, Microplate reader, Biotek). La secuenciación fue realizada en MACROGEN (Corea del Sur). Las secuencias parciales del gen DNAr 16S se ensamblaron en un contig usando Unipro UGENE v43.0 y se compararon con las secuencias de EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>) y GenBank, empleando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), para la asignación de especies basado en el vecino más cercano. Las secuencias recuperadas de las bases de datos y relacionadas con las cepas en estudio se seleccionaron

para la alineación y análisis filogenéticos utilizando el programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021). La matriz de la distancia evolutiva se calculó utilizando los parámetros del modelo de Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) y el árbol filogenético se construyó a partir de las distancias evolutivas calculadas mediante el método de Neighbour-joining (Saitou y Nei, 1987), con valores de bootstrap basados en 1,000 repeticiones. Las secuencias parciales del gen 16S determinadas en el presente estudio se depositaron en el GenBank. Se utilizó *Pseudoalteromonas tetradonis* IAM 14160 como cepa de grupo externo para las construcciones de árboles. El árbol filogenético obtenido se convirtió al formato Newick y se visualizó empleando el servidor de Interactive Tree Of Life (iTOL) (<https://itol.embl.de/>).

Se empleó el método de Albarracín et al. (2014) para la evaluación de la tolerancia a la salinidad, el pH y temperatura. Las cepas purificadas se cultivaron en medio LB a 30 °C en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, se extrajeron las células en la fase exponencial intermedia de cada cepa, previa centrifugación de la muestra (8,000 rpm; 30 min; 4 °C). Los pellets se lavaron 2 veces en solución 0.9% de NaCl y se resuspendieron en la misma solución hasta una DO_{600} : 0.6. De esta suspensión celular se extrajo una alícuota de 100 μ l y se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-5}). De cada dilución se inocularon 5 μ l en las placas de agar LB. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para la evaluación de la tolerancia a la salinidad los medios se suplementaron con diferentes concentraciones de NaCl (0%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20% y 25%); para pH se establecieron en valores de 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10, 11 y 12; y de temperatura de 4, 8, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 50 y 65 °C. Los controles fueron placas LB inoculadas con las cepas estudiadas sin el factor de estrés.

El crecimiento microbiano se registró mediante el método según Bequer-Urbano et al. (2013). Cuatro signos positivos (++++) cuando el crecimiento fue similar al control; 3 signos positivos (+++) cuando el crecimiento fue ligeramente diferente del crecimiento en el control; 2 signos positivos (++) cuando el crecimiento fue significativamente diferente al crecimiento del control; con 1 signo positivo (+) cuando el crecimiento fue demasiado bajo; y con un signo negativo (-) cuando no se observó crecimiento. Para la representación gráfica, los signos se tomaban como 4, 3, 2 o 1 unidades de crecimiento para cada dilución y luego se sumaron para representar el total como un único valor. El signo negativo se consideró como una unidad nula de crecimiento.

Ensayos de resistencia a irradiación UV-B. Se empleó el método de Albarracín et al. (2012), las cepas se cultivaron en medio LB a 30 °C en agitación de 200 rpm hasta su fase

exponencial intermedia. Luego, las células se extrajeron por centrifugación a 8,000 rpm por 30 min a 4 °C. Los pellets se lavaron 2 veces en 0.9% NaCl y se resuspendieron en la misma solución. Una porción de cada suspensión celular de cada cepa (DO_{600} : 0.6; 20 ml) se colocó en placas de Petri sin tapa en agitación constante (50 rpm) a 20 °C y se expusieron a dosis de irradiación UV-B entre 0.2 y 0.3 mW/cm² durante 240 min, empleando una lámpara UV-B (Philips, mayor intensidad en 312 nm) a 15 cm de altura. Los controles se colocaron bajo las mismas condiciones, pero cubiertos con papel aluminio. Para la medición de luz UV-B se empleó un medidor de radiación (PCE Instruments, PCE-UV34). Durante diferentes intervalos (0, 15, 30, 60, 90, 180 y 240 min) se extrajeron alícuotas de 100 µl y se determinó el número de UFC para la determinación del porcentaje de supervivencia, luego de 48 h de incubación en placas de agar LB, a 30 °C en oscuridad para prevenir la fotorreactivación. El ensayo se llevó a cabo con 3 réplicas para cada cepa. Los resultados de los experimentos se analizaron mediante Anova unidireccional y posteriormente se realizó una prueba de comparación múltiple por pares mediante una prueba de Tukey.

Resultados

La salinidad en las muestras de agua se registró con un valor promedio de 1.96 (g/100 ml), el pH con valores en el rango alcalino (pH > 8 y < 8.5) y la temperatura del agua se registró con valores variables (9 °C a las 10:00 am y 20 °C al mediodía).

Se obtuvieron en total 5 morfotipos de cultivos puros de cepas bacterianas que mostraban diferentes morfologías y pigmentación (fig. 1, tabla 1). Todas las cepas se obtuvieron en medio LM. La morfología a nivel celular correspondía con la forma de cocos a excepción de la cepa LS6-A3 que tiene forma de bacilo. Adicionalmente, se observó la presencia de endosporas en la cepa LS6-A3 visualizado mediante microscopio. Respecto al carácter de la pared celular, todas las cepas se caracterizaron como Gram-positivas (tabla 1).

El análisis de las secuencias de ARNr 16S de las cepas bacterianas aisladas permitió la identificación de 5 géneros. La secuencia de la cepa LS2-A1 (MW386765) tiene 99.92% de similitud génica con la cepa *Arthrobacter ruber* RQ7, 99.32% con *Arthrobacter bussei* KR32 y 99.17% con

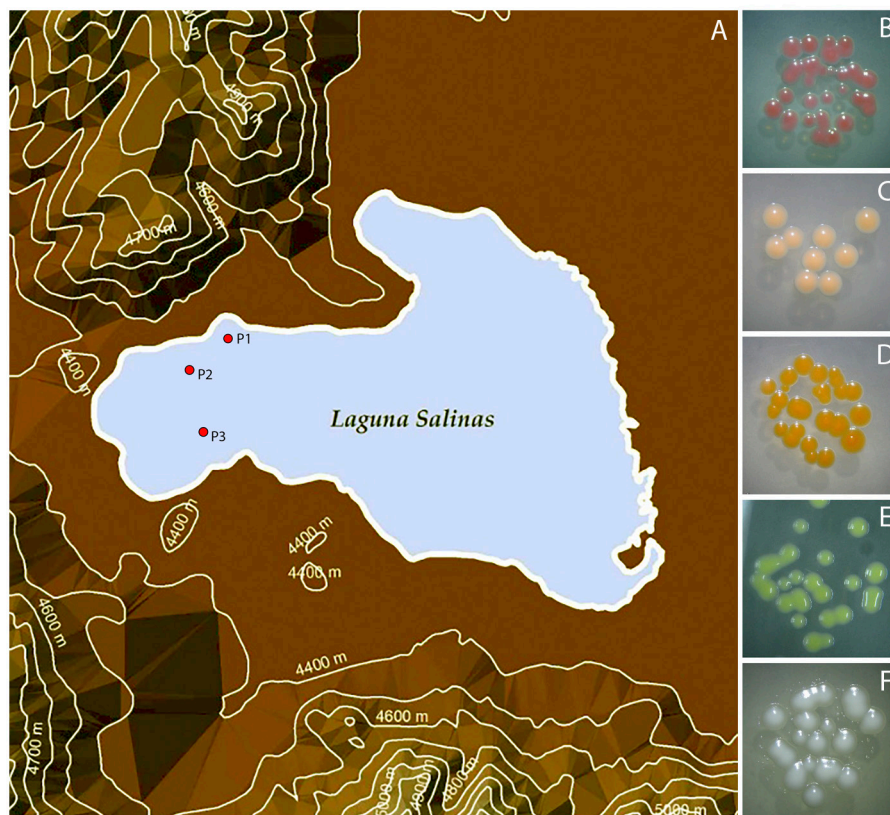


Figura 1. A) Localizaciones de zonas de muestreo en la laguna de Salinas. Cepas bacterianas aisladas de muestras de agua de la laguna de Salinas: B, LS4-A2; C, LS2-A1; D, LS1-A1; E, LS3-A2; F, LS6-A3.

Tabla 1

Caracterización fenotípica y genotípica de cepas bacterianas aisladas de la laguna de Salinas.

Fenotípico				
Cepas	Gram	Morfología	Color	Resistencia UV-B (*)
LS2-A1	Positivo	Coco	Tangerine	R+
LS4-A2	Positivo	Coco	Rojo	R+
LS1-A1	Positivo	Coco	Naranja	R+
LS6-A3	Positivo	Bacilo	Blanco	R
LS3-A2	Positivo	Coco	Amarillo	R
Genotípico				
Cepas	Núm. acceso GenBank	Afiliación filogenética	% Identidad	Phylum
LS2-A1	MW386765	<i>Arthrobacter ruber</i> S2	99.92	Actinobacteria
LS4-A2	MW386763	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> S4	99.87	Actinobacteria
LS1-A1	MW386761	<i>Dietzia maris</i> S1	100	Actinobacteria
LS6-A3	MW386764	<i>Priestia megaterium</i> S6	99.93	Firmicutes
LS3-A2	MW386762	<i>Planococcus maritimus</i> S3	99.67	Firmicutes

* R+: Altamente resistente; R: medianamente resistente.

Arthrobacter agilis DSM 20550, y un valor de bootstrap de 86% en el árbol filogenético. La secuencia de la cepa LS4-A2 (MW386763) mostró similitud génica de 99.87% con la cepa *Brachybacterium paraconglomeratum* LMG 19861 y 99.49% con *Brachybacterium conglomeratum* NCIB 9859, y un valor de bootstrap de 70%. La secuencia de la cepa LS1-A1 (MW386761) presentó 100% de similitud génica con las cepas *Dietzia maris* DSM 43672 y *Dietzia kunjamensis* subsp. *kunjamensis* DSM 44907, y un valor de bootstrap de 79%. La secuencia de la cepa LS6-A3 (MW386764) tiene similitud génica de 99.93% con la cepa *Priestia megaterium* NBRC 15308 y 99.78% con *Prestia aryabhatai* B8W22, y un valor de bootstrap de 96%. La secuencia de la cepa LS3-A2 (MW386762) presentó 99.67% de similitud génica con *Planococcus maritimus* SQA-41, y un valor de bootstrap de 89%. Todas las cepas presentaron un porcentaje de similitud mayor de 99% con las cepas estrechamente relacionadas correspondientemente (fig. 2). Los números de acceso a las secuencias en el GenBank se encuentran en la tabla 1.

De acuerdo con los ensayos para determinar el perfil de crecimiento de las cepas bacterianas frente a factores adversos, se obtuvo que las cepas aisladas toleraron entre 5% y 15% de NaCl, por lo que se consideraron como halotolerantes. Respecto de los ensayos de tolerancia a la temperatura, la mayoría de las cepas crecen en el rango de 8-37 °C, caracterizándose como psicotolerantes, mientras que la cepa LS6-A3 crece en el rango de 15-45 °C,

considerándose como mesotérmica. El perfil de tolerancia de pH se evaluó en el rango de 4-12, revelando que las cepas bacterianas fueron capaces de crecer en valores altos de pH, por lo que se consideraron como alcalófilas moderadas. La cepa LS6-A3 mostró crecimiento en un mayor rango de pH de 5-12, mientras que la cepa LS1-A1 presentó crecimiento entre el rango de pH de 7.5-12 caracterizándose como alcalófila obligada (fig. 3).

Finalmente, en relación con los ensayos de resistencia a radiación UVB, las cepas LS4-A2, LS2-A1 y LS1-A1 mostraron crecimiento hasta 240 min (40.4 KJ/m²) de exposición de 0.2-0.3 mW/cm² de irradiación UV-B, con porcentajes de supervivencia de 84.6%, 76.6% y 46.3%, respectivamente. Mientras que las cepas LS6-A3 y LS3-A2, mostraron menores porcentajes de supervivencia de 9.4% y 12.8%, respectivamente hasta 240 min (40.4 KJ/m²) de exposición de 0.2-0.3 mW/cm² de radiación UV-B, con un decrecimiento progresivo en su capacidad de supervivencia durante el tiempo de exposición (fig. 4). Los resultados del ensayo muestran una resistencia significativamente menor de la cepa LS3-A2, en comparación con las cepas LS2-A1, LS4-A2 ($p < 0.001$) (fig. 5).

Discusión

La laguna de Salinas es un entorno que puede caracterizarse desde diferentes enfoques. En primer lugar, este entorno forma parte de los sitios Ramsar, ubicado en

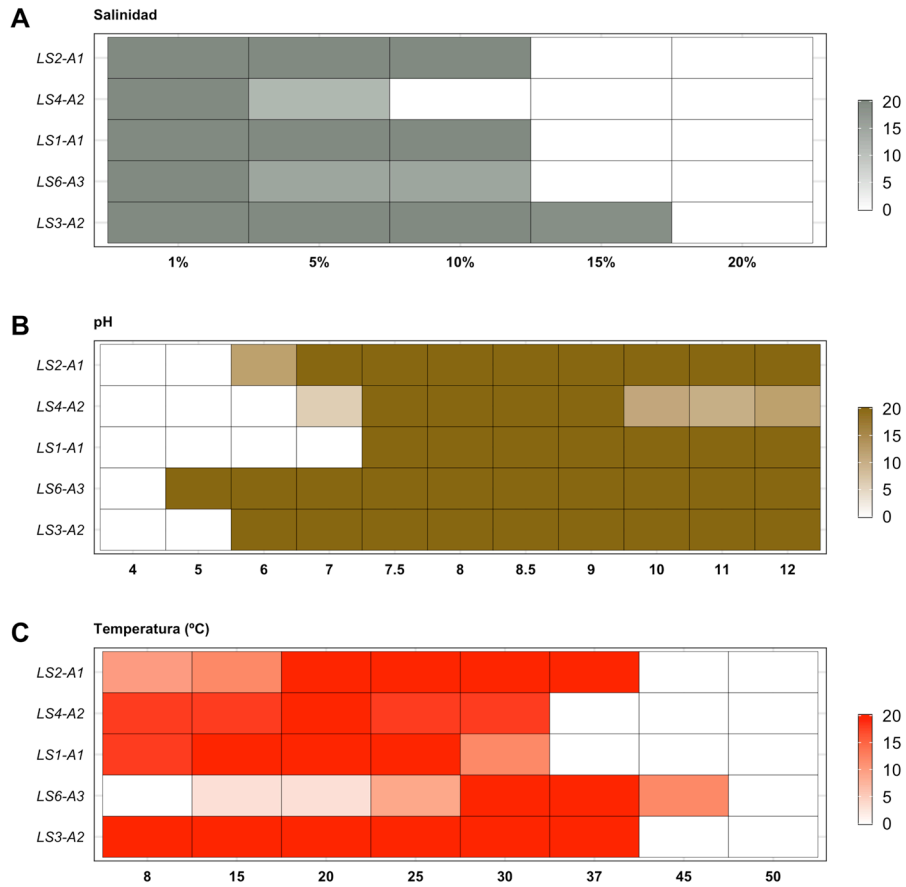


Figura 3. Perfil de tolerancia a la salinidad, pH y temperatura de las cepas aisladas de la laguna de Salinas, en medio agar LB inoculados con diluciones seriales (10^{-1} - 10^{-5}).

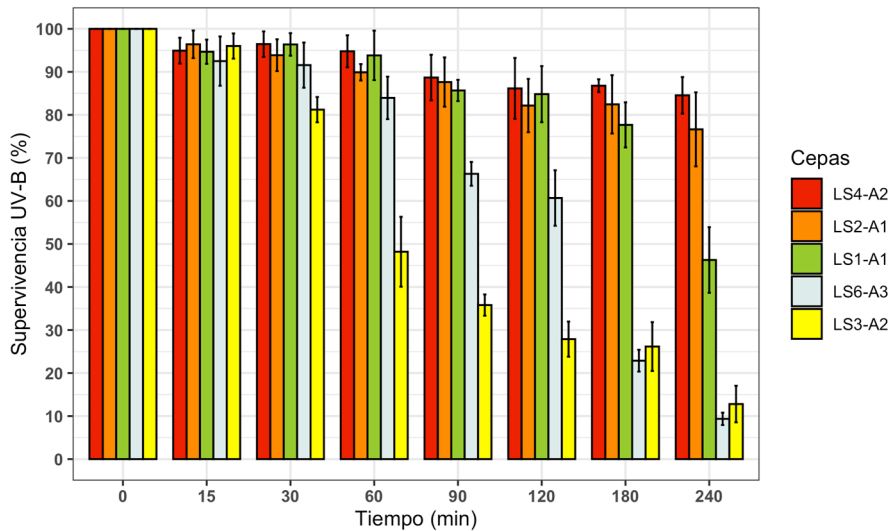


Figura 4. Perfil de resistencia a radiación UV-B de las bacterias aisladas de la laguna de Salinas hasta 240 min de exposición de UV-B.

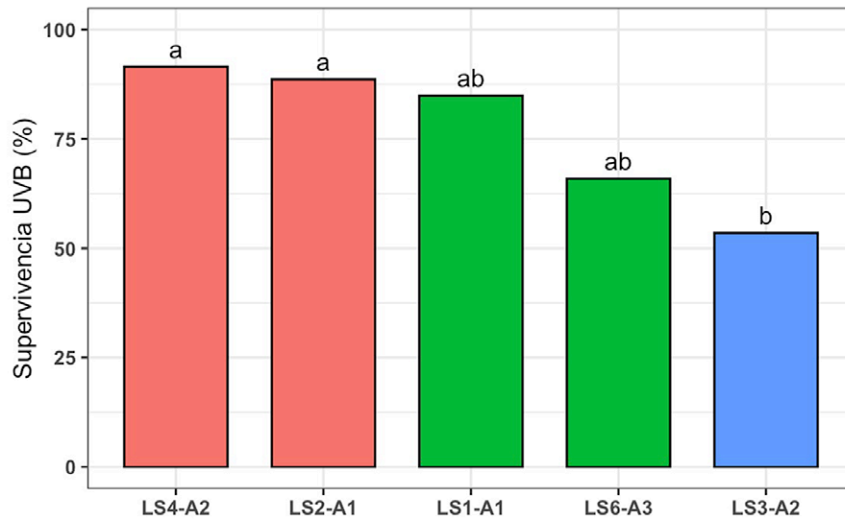


Figura 5. Análisis de la resistencia a radiación UVB mediante la prueba de Tukey. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

(Rasuk et al., 2016). Como el origen ambiental de las cepas bacterianas aisladas es un entorno salino, alcalino y con amplia fluctuación de temperatura, en el presente estudio se determinó el perfil de tolerancia a la salinidad, pH y temperatura para comprender los límites de la vida de las bacterias aisladas de la laguna de Salinas.

De acuerdo con nuestros resultados, las cepas aisladas de la laguna de Salinas se caracterizaron como microorganismos extremófilos, a excepción de LS1-A1 que está caracterizada como extremófila para la condición del pH (fig. 3). Esta cepa tiene relación filogenética con el género *Dietzia*, de la cual se tienen reportes sobre su carácter alcalófilo y extremófilo (Duckworth et al., 1996; Gholami y Etemadifar, 2015). Los resultados obtenidos podrían relacionarse con la dinámica de algunos factores de la laguna de Salinas. La salinidad depende de la dinámica del agua entre la época húmeda y seca, lo que probablemente influye en los niveles de tolerancia a la sal. No se reporta una correlación entre la tolerancia de las cepas al NaCl y la salinidad del agua en el momento del muestreo (1.96% de salinidad). Por otro lado, la laguna es un entorno con amplias fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, y las heladas se presentan durante casi todo el año, por lo que es de esperar la presencia de bacterias que toleren bajas temperaturas. El pH alcalino del agua es una condición relativamente constante en la laguna, por ello todos los aislamientos se caracterizan como alcalófilos.

Todas las cepas han mostrado supervivencia hasta los 240 min de exposición a irradiación UV-B (fig. 4). No obstante, las cepas LS6-A3 y LS3-A2 muestran los

porcentajes de supervivencia más bajos hasta los 240 min de exposición a radiación UVB, en comparación con las otras cepas. Por lo que en el presente estudio, caracterizamos las cepas LS4-A2, LS2-A1 y LS1-A1 como altamente resistentes a radiación UV-B. Cepas resistentes a los rayos UV-B también han sido reportadas en otros lagos altoandinos. Albarracín et al. (2012) reporta cepas del género *Acinetobacter*, como Ver7 y Ver5 con porcentajes de supervivencia de 100% y 50%, respectivamente, hasta una irradiación UV-B de 38 KJ/m². También se han reportado Actinobacterias como *Rhodococcus* sp. A5 que resiste hasta 45 KJ/m² (Bequer-Urbano et al., 2013) y *Nesterenkonia* Act20 con una supervivencia relativa de 70% hasta 68 KJ/m² (Portero et al., 2019).

Las cepas LS6-A3 y LS3-A2 se caracterizaron como medio resistentes a la luz UV-B. En relación con los ensayos de salinidad, pH y temperatura, la cepa LS3-A2 mostró mayor tolerancia a la salinidad hasta 15% de NaCl y LS6-A3 mostró tolerancia hasta una temperatura de 45 °C y mayor rango de crecimiento desde pH 5 a 12 (fig. 3). Tomando en consideración que la laguna de Salinas es un entorno en el que existe más de una condición ambiental adversa, cada una afecta simultáneamente en mayor o menor medida a las distintas poblaciones microbianas, ocupando distintos espacios o nichos ecológicos según su adaptación. Respecto a ello, estas cepas probablemente ocuparon nichos ecológicos en los que la condición más adversa no solo es la radiación UV-B, por lo que sus adaptaciones se encuentran dirigidas a tolerar otros factores como altas concentraciones de salinidad o amplio rango de pH.

A nivel celular, todas las cepas aisladas se han caracterizado como Gram-positivas. El carácter Gram-positivo de la pared celular ha sido vinculado con la resistencia a la radiación UV-B. Fernández-Zenoff, Heredia et al. (2006) y Dib et al. (2008), sugirieron que el predominio de bacterias Gram-positivas en humedales altoandinos podría explicarse como una adaptación al estrés por radiación UV. McKinney y Pruden (2012) observaron que bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*) fueron más resistentes a irradiación UV que bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), debido probablemente a la pared de peptidoglucano más gruesa en las bacterias Gram-positivas que contribuye a la protección de las células contra el daño de la radiación UV.

Mediante la caracterización molecular del gen DNAR 16S, las cepas bacterianas se categorizan en 2 phyla: las cepas LS2-A1, LS4-A2 y LS1-A1 pertenecen al phylum Actinobacteria y las cepas LS6-A3 y LS3-A2 pertenecen a Firmicutes. Las cepas altamente resistentes a radiación UV-B en el presente estudio, son actinobacterias (tabla 1). Cepas de este phylum han sido reportadas como resistentes a radiación UV en humedales altoandinos (Bequer-Urbano et al., 2013; Portero et al., 2019; Rasuk et al., 2017). La afiliación taxonómica en el phylum Actinobacteria probablemente es relevante debido a que este grupo filogenético está caracterizado por tener genomas con alto contenido GC (Bull, 2011), y este carácter ha sido relacionado con la contribución a la resistencia a radiación UV (Warnecke et al., 2005). Pullerits et al. (2020) observaron una correlación entre el contenido bajo y alto de GC con la clasificación de las cepas como sensibles o resistentes a la radiación UV. Esta relación posiblemente se debe a que dinucleótidos TT y TC son más fotorreactivos (Douki y Cadet, 2001). Sin embargo, según Matallana-Surget et al. (2008), los dímeros de ciclobutano de timina son lesiones menores en genomas con alto contenido de GC debido a que cuanto mayor es el contenido de GC en el genoma, las bacterias expuestas a radiación UV-B pueden producir de preferencia fotoproductos con citosinas, los cuales son altamente mutagénicos. Probablemente, esta característica ha influido en la especialización de un mecanismo eficiente de fotorreactivación, como la especialización de enzimas fotoliasas, tal como se ha reportado para *Nesterenkonia* sp. Act20 (Portero et al., 2019). La afiliación filogenética con las actinobacterias podría ser relevante y dar indicio acerca de la resistencia a radiación UV de las bacterias aisladas de la laguna de Salinas.

La capacidad de las bacterias aisladas de la laguna de Salinas de resistir a la radiación UV-B, implica mecanismos de resistencia desarrollado a lo largo de la evolución, referido a complejos sistemas genéticos y fisiológicos. Al

conjunto de genes cuyas funciones se encargan de evitar o reparar los daños provocados directa o indirectamente por la radiación UV, se le ha definido como “Resistoma UV” (Kurth et al., 2015). Es necesario realizar estudios más minuciosos y rigurosos para dilucidar el resistoma UV de las bacterias extremófilas de la laguna de Salinas.

La ubicación de la laguna de Salinas dentro de un área natural protegida no la ha excluido de actividades antropogénicas, como la extracción de sales y minerales no metálicos y el turismo de aventura, por lo que no es un área totalmente prístina. Por otro lado, en el contexto del cambio climático, en los próximos años existe la probabilidad de la desaparición de algunos lagos en la región del altiplano (Cabrol et al., 2009). En respuesta a estos escenarios, es necesario tomar medidas para garantizar la protección y conservación del acervo genético microbiano en repositorios. Precisamente, el conocimiento de la diversidad de microorganismos de la laguna de Salinas aún es exiguo, considerándose solamente el estudio de Many et al. (2021) y otras propuestas de investigación con enfoques biotecnológicos aún no publicados. En tal sentido, este humedal puede considerarse como un reservorio de materia oscura microbiana (Bernard et al., 2018), por lo que la bioprospección microbiana no solo es un desafío, sino también una oportunidad para la comprensión del mundo microbiano y la búsqueda de posibles aplicaciones a las preocupaciones globales (Singh y Gabani, 2011; Zha et al., 2022).

Nuestro estudio representa una contribución al entendimiento de la biodiversidad microbiana presente en la laguna de la Salinas. No obstante, debemos reconocer que este trabajo solo comprende bacterias cultivables, lo que implica que nuestro conocimiento de la biodiversidad es parcial, por lo que es fundamental destacar la relevancia de los enfoques independientes de cultivo, basados en tecnologías de secuenciación de nueva generación que permiten un análisis más profundo de la diversidad microbiana a través de enfoques metagenómicos (Arya y Ravindra, 2020; Dubey et al., 2022) y también posibilitan la búsqueda de genes de interés ecológico y biotecnológico (Alonso-Reyes et al., 2020; Negri et al., 2022; Rascovan et al., 2016). En entornos análogos a la laguna de Salinas, como en el salar de Huasco, Maras y Acos, mediante estos métodos se ha logrado reportar comunidades muy diversas y una dominancia de los phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, Balneolaeota y Actinobacteria (Castelán-Sánchez et al., 2019; Castro-Severyn et al., 2021). En estromatolitos de la laguna de Socompa se ha logrado identificar representantes de *Deinococcus-Thermus*, *Rhodobacteraceae*, *Desulfobacterales* y *Spirochaetes*, además de secuencias que no pudieron clasificarse como phylum, mostrando menos de 80% de identidad

sugiriendo nuevos linajes distantes (Fariás et al., 2013). Ambos enfoques (de cultivo e independientes de cultivo) son valiosos tanto para estudios sobre la biodiversidad microbiana en su totalidad, como para análisis detallados de las características y propiedades de una cepa microbiana en estudio.

En el presente trabajo, reportamos cepas bacterianas resistentes a radiación UV-B, halotolerantes, psicotolerantes, alcalófilas moderadas y una alcalófila obligada en las condiciones establecidas, caracterizándose como extremófilos y extremótrofos. Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte sobre microorganismos extremófilos y extremótrofos de la laguna de Salinas, que promueve un enfoque nuevo de prospección sobre este entorno. Se propone a este humedal como un reservorio de microorganismos que puede ofrecer oportunidades para futuros programas de estudio en el aprovechamiento de los recursos genéticos, en áreas como la biotecnología o como modelos para astrobiología, por lo que es un entorno de importancia científica.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa por la subvención otorgada para la realización de este trabajo (contrato TP-059-2018-UNSA). Asimismo, agradecemos a Juan Ernesto Palo Tejada, profesor de la Escuela de Física en la misma Universidad por el apoyo brindado.

Referencias

- Albarracín, V. H., Gärtner, W. y Fariás, M. E. (2016). Forged under the sun: life and art of extremophiles from Andean Lakes. *Photochemistry and Photobiology*, 92, 14–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/php.12555>
- Albarracín, V. H., Kurth, D., Ordoñez, O. F., Belfiore, C., Luccini, E., Salum, G. M. et al. (2015). High-up: a remote reservoir of microbial extremophiles in central Andean Wetlands. *Frontiers in Microbiology*, 6, 01404. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01404>
- Albarracín, V. H., Pathak, G. P., Douki, T., Cadet, J., Borsarelli, C. D., Gärtner, W. et al. (2012). Extremophilic *Acinetobacter* strains from high-altitude lakes in Argentinean Puna: remarkable UV-B resistance and efficient DNA damage repair. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 42, 201–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11084-012-9276-3>
- Albarracín, V. H., Simon, J., Pathak, G. P., Valle, L., Douki, T., Cadet, J. et al. (2014). First characterization of a CPD-class I photolyase from a UV-resistant extremophile isolated from High-Altitude Andean Lakes. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 13, 739–750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C3PP50399B>
- Alonso-Reyes, D. G., Fariás, M. E. y Albarracín, V. H. (2020). Uncovering cryptochrome/photolyase gene diversity in aquatic microbiomes exposed to diverse UV-B regimes. *Aquatic Microbial Ecology*, 85, 141–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.3354/ame01947>
- Alonso-Reyes, D. G., Galván, F. S., Portero, L. R., Alvarado, N. N., Fariás, M. E., Vázquez, M. P. et al. (2021). Genomic insights into an Andean multiresistant soil actinobacterium of biotechnological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11274-021-03129-9>
- Álvarez-Campos, O., Olson, E. J., Welp, L. R., Frisbee, M. D., Zúñiga-Medina, S. A., Rodríguez, J. D. et al. (2022). Evidence for high-elevation solar recharge and interbasin groundwater flow in the Western Cordillera of the Peruvian Andes. *Hydrology and Earth System Sciences*, 26, 483–503. <https://doi.org/https://doi.org/10.5194/hess-26-483-2022>
- Arya, P. y Ravindra. (2020). Metagenomics based approach to reveal the secrets of unculturable microbial diversity from aquatic environment. En S. De Mandal y P. Bhatt (Eds.), *Recent advancements in microbial diversity* (pp. 537–559). Cambridge: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821265-3.00022-0>
- Bequer-Urbano, S., Albarracín, V. H., Ordoñez, O. F., Fariás, M. E. y Álvarez, H. M. (2013). Lipid storage in high-altitude Andean Lakes extremophiles and its mobilization under stress conditions in *Rhodococcus* sp. A5, a UV-resistant actinobacterium. *Extremophiles*, 17, 217–227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00792-012-0508-2>
- Bernard, G., Pathmanathan, J. S., Lannes, R., López, P. y Bapteste, E. (2018). Microbial dark matter investigations: how microbial studies transform biological knowledge and empirically sketch a logic of scientific discovery. *Genome Biology and Evolution*, 10, 707–715. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/gbe/evy031>
- Blumthaler, M., Ambach, W. y Huber, M. (1993). Altitude effect of solar UV radiation dependent on albedo, turbidity, and solar elevation. *Meteorologische Zeitschrift*, 2, 116–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1127/metz/2/1993/116>
- Bull, A. T. (2011). Actinobacteria of the Extremobiosphere. En K. Horikoshi (Ed.), *Extremophiles handbook* (pp. 1203–1240). Tokio: Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_58
- Caballero, K. C., Taya, V., Cornejo, A., Avendaño, M., Escobar, E. y Zeballos, H. (2010). Aves acuáticas de los sitios Ramsar de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca, sur del Perú. En H. Zeballos, J. A. Ochoa, y E. López (Eds.), *Diversidad biológica de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca* (pp. 33–47). Lima: Desco, PROFONANPE, SERNANP.
- Cabrol, N. A., Feister, U., Häder, D. P., Piazena, H., Grin, E. A. y Klein, A. (2014). Record solar UV irradiance in the tropical Andes. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 0019. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00019>
- Cabrol, N. A., Grin, E. A., Chong, G., Minkley, E., Hock, A. N., Yu, Y. et al. (2009). The High-Lakes Project. *Journal of*

- Geophysical Research: Biogeosciences*, 114, 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1029/2008JG000818>
- Castelán-Sánchez, H. G., Elorrieta, P., Romoacca, P., Liñan-Torres, A., Sierra, J. L., Vera, I. et al. (2019). Intermediate-salinity systems at high altitudes in the Peruvian Andes unveil a high diversity and abundance of bacteria and viruses. *Genes*, 10, 891. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/genes10110891>
- Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Méndez, K. N., Fortt, J., Márquez, S., Molina, F. et al. (2021). Living to the high extreme: unraveling the composition, structure, and functional insights of bacterial communities thriving in the Arsenic-rich Salar de Huasco altiplanic ecosystem. *Microbiology Spectrum*, 9, e00444-21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/Spectrum.00444-21>
- Catorci, A., Piermarteri, K. y Tardella, F. M. (2014). Distribution of the nurse species *Pycnophyllum molle* J. Rémy and *P. weberbaueri* Muschl. in the Andean Dry Puna (Arequipa District — Southern Peru): role of topographic/soil variability and disturbance regime. *Polish Journal of Ecology*, 62, 385–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.3161/104.062.0201>
- Cordero, R. R., Damiani, A., Seckmeyer, G., Jorquera, J., Caballero, M., Rowe, P. et al. (2016). The solar spectrum in the Atacama Desert. *Scientific Reports*, 6, 22457. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/srep22457>
- Dib, J., Motok, J., Fernández-Zenoff, V., Ordoñez, O. y Fariás, M. E. (2008). Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and Arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4,400 m) Andean Wetlands. *Current Microbiology*, 56, 510–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00284-008-9103-2>
- Douki, T. y Cadet, J. (2001). Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry*, 40, 2495–2501. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bi0022543>
- Dubey, A., Malla, M. A. y Kumar, A. (2022). Role of next-generation sequencing (NGS) in understanding the microbial diversity. En A. Kumar, B. Choudhury, S. Dayanandan y M. L. Khan (Eds.), *Molecular Genetics and genomics tools in biodiversity conservation* (pp. 307–328). Singapur: Springer Nature. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-16-6005-4_16
- Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E. y Steenberg, R. (1996). Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 19, 181–191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00211.x>
- Dyall-Smith, M. (Ed.). (2009). *The halo handbook, protocols for haloarchaeal genetics*. Recuperado el 07 de junio de, 2022 de: https://haloarchaea.com/wp-content/uploads/2018/10/Halohandbook_2009_v7.3mds.pdf
- Fariás, M. E. (2020). Microbial ecosystems in central Andes extreme environments: biofilms, microbial mats, microbialites and endoevaporites. En *Microbial ecosystems in Central Andes extreme environments: biofilms, microbial mats, microbialites and endoevaporites*. Cham, Suiza: Springer International Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-36192-1>
- Fariás, M. E. y Contreras, M. (2018). *Extremofilos y origen de la vida en Atacama*. Santiago, Chile: Alvimpress.
- Fariás, M. E., Rascovan, N., Toneatti, D. M., Albarracín, V. H., Flores, M. R., Poiré, D. G. et al. (2013). The discovery of stromatolites developing at 3,570 m above sea level in a high-altitude volcanic Lake Socompa, Argentinean Andes. *Plos One*, 8, e53497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053497>
- Fernández-Zenoff, V., Heredia, J., Ferrero, M., Siñeriz, F. y Fariás, M. E. (2006). Diverse UV-B resistance of culturable bacterial community from high-altitude wetland water. *Current Microbiology*, 52, 359–362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00284-005-0241-5>
- Fernández-Zenoff, V., Siñeriz, F. y Fariás, M. E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7857–7863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Flores, M. R., Ordoñez, O. F., Maldonado, M. J. y Fariás, M. E. (2009). Isolation of UV-B resistant bacteria from two high altitude Andean lakes (4,400 m) with saline and non-saline conditions. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55, 447–458. <https://doi.org/https://doi.org/10.2323/jgam.55.447>
- Gholami, M. y Etemadifar, Z. (2015). Isolation and characterization of a novel strain of genus *Dietzia* capable of multiple-extreme resistance. *Microbiology*, 84, 389–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1134/S0026261715030054>
- Horikoshi, K. (2011). *Extremophiles handbook (Vol. 1)*. Tokyo: Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>
- INRENA (Instituto Nacional de Recursos Naturales). (2007). *Plan maestro de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca*. Lima: INRENA.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kurth, D., Belfiore, C., Gorriti, M. F., Cortez, N., Fariás, M. E. y Albarracín, V. H. (2015). Genomic and proteomic evidences unravel the UV-resistome of the poly-extremophile *Acinetobacter* sp. Ver3. *Frontiers in Microbiology*, 6, 328. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00328>
- Manya, W. F., Lizárraga, W. C., Mormontoy, C. G., Taira, M. A. y Ramírez, P. S. (2021). Complete genome sequence of *Halomonas* sp. strain SH5A2, a dye-degrading halotolerant bacterium isolated from the Salinas and Aguada Blanca National Reserve in Peru. *Microbiology Resource Announcements*, 10, e01083-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MRA.01083-20>
- Matallana-Surget, S., Meador, J. A., Joux, F. y Douki, T. (2008). Effect of the GC content of DNA on the distribution of UVB-induced bipyrimidine photoproducts. *Photochemical*

- and *Photobiological Sciences*, 7, 794–801. <https://doi.org/http://doi.org/10.1039/b719929e>
- McKinney, C. W. y Pruden, A. (2012). Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environmental Science and Technology*, 46, 13393–13400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/es303652q>
- Moreno, J. R. y Albarracín, V. H. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 5, 79–93. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/17156>
- Negri, T., Mantri, S., Angelov, A., Peter, S., Muth, G., Eustáquio, A. S. et al. (2022). A rapid and efficient strategy to identify and recover biosynthetic gene clusters from soil metagenomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 3293–3306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-022-11917-y>
- Ordoñez, O. F., Flores, M. R., Dib, J. R., Paz, A. y Farías, M. E. (2009). Extremophile culture collection from Andean lakes: extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microbial Ecology*, 58, 461–473. <https://doi.org/http://doi.org/10.1007/s00248-009-9527-7>
- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and Photobiology*, 65, 270–283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb08560.x>
- Portero, L. R., Alonso-Reyes, D. G., Zannier, F., Vázquez, M. P., Farías, M. E., Gärtner, W. et al. (2019). Photolyases and cryptochromes in UV-resistant bacteria from high-altitude Andean lakes. *Photochemistry and Photobiology*, 95, 315–330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/php.13061>
- Pullerits, K., Ahlinder, J., Holmer, L., Salomonsson, E., Öhrman, C., Jacobsson, K. et al. (2020). Impact of UV irradiation at full scale on bacterial communities in drinking water. *Npj Clean Water*, 3, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41545-020-0057-7>
- Rascovan, N., Maldonado, J., Vázquez, M. P. y Farías, M. E. (2016). Metagenomic study of red biofilms from Diamante Lake reveals ancient arsenic bioenergetics in haloarchaea. *ISME Journal*, 10, 299–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ismej.2015.109>
- Rasuk, M. C., Ferrer, G. M., Kurth, D., Portero, L. R., Farías, M. E. y Albarracín, V. H. (2017). UV-resistant actinobacteria from high-altitude Andean lakes: isolation, characterization and antagonistic activities. *Photochemistry and Photobiology*, 93, 865–880. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/php.12759>
- Rasuk, M. C., Ferrer, G. M., Moreno, J. R., Farías, M. E. y Albarracín, V. H. (2016). The diversity of microbial extremophiles. En T. B. Rodrigues y A. E. Trindade (Eds.), *Molecular diversity of environmental Prokaryotes* (pp. 87–126). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781315381909>
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Santos, A. L., Gomes, N. C. M., Henriques, I., Almeida, A., Correia, A. y Cunha, Â. (2012). Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 40–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphoto.2012.08.016>
- Santos, A. P., Belfiore, C., Úrbez, C., Ferrando, A., Blázquez, M. A. y Farías, M. E. (2023). Extremophiles as plant probiotics to promote germination and alleviate salt stress in soybean. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 946–959. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00344-022-10605-5>
- Singh, O. V. y Gabani, P. (2011). Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 851–861. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04971.x>
- Suárez-Salas, L. F., Flores-Rojas, J. L., Pereira-Filho, A. J. y Karam, H. A. (2017). Ultraviolet solar radiation in the tropical central Andes (12.0°S). *Photochemical and Photobiological Sciences*, 16, 954–971. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C6PP00161K>
- Sysoev, M., Grötzing, S. W., Renn, D., Eppinger, J., Rueping, M. y Karan, R. (2021). Bioprospecting of novel extremozymes from prokaryotes— The advent of culture-independent methods. *Frontiers in Microbiology*, 12, 630013. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630013>
- Tamura, K., Stecher, G. y Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Visscher, P. T., Gallagher, K. L., Bouton, A., Farías, M. E., Kurth, D., Sancho-Tomás, M. et al. (2020). Modern arsenotrophic microbial mats provide an analogue for life in the anoxic Archean. *Communications Earth and Environment*, 1, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s43247-020-00025-2>
- Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R., Hofer, J. S. y Pernthaler, J. (2005). Abundances, identity, and growth state of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5551–5559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5551-5559.2005>
- Zeballos, H., Ochoa, J. A. y Cornejo, A. (2010). La Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca, una muestra representativa de la puna seca de América del Sur. En H. Zeballos, J. A. Ochoa y E. López (Eds.), *Diversidad biológica de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca* (pp. 17–31). Lima: Desco/ PROFONANPE/ SERNANP.
- Zha, Y., Chong, H., Yang, P. y Ning, K. (2022). Microbial dark matter: from discovery to applications. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 20, 867–881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.02.007>