

Diseño experimental para la evaluación de perfiles de resistencia UV y habilidades de fotorreparación en extremófilos

Virginia Helena Albarracín^{1,2,3}. Julio Ricardo Moreno^{1,2}.
Wolfgang Gärtner³. María Eugenia Farías².

¹Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205-4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

²Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas (LIMLA). Planta Piloto de procesos Industriales Microbiológicos. PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros 4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

³Max-Planck Institut für Chemische Energie Konversion.
Stiftstrasse 34-36, 45470 Mülheim an der Ruhr. Germany.
virginia@proimi.org.ar julio_m@live.com.ar
wolfgang.gaertner@cec.mpg.de mefarias@proimi.org.ar

Resumen: Se evaluarán los perfiles de resistencia a UV y capacidad fotorreparadora de cepas de interés aisladas de lagunas de altura puno-andinas (LAPAs) empleando como organismo modelo *Acinetobacter* sp. Ver3. Además, utilizaremos herramientas bioinformáticas para obtener en bases de datos los genes codificantes para fotoliasas. De esta manera se podrán diseñar oligonucleótidos específicos para las reacciones de PCR para la detección de genes en el genoma de cepas extremófilas.

Palabras clave: *Acinetobacter*. Extremófilos. Luz ultravioleta. Lagunas de Altura. Fotorreactivación. Fotorreparación. Dímeros de Pirimidina. Bioinformática. Genes. Fotoliasas. PCR. Lesiones en el ADN. Luz azul. Flavoproteínas.

INTRODUCCION

La radiación ultravioleta (UV) es un tipo de radiación electromagnética, de una longitud de onda más corta que la de la luz visible (por debajo de 400 nm). La luz UV es un componente de la luz solar y es emitida por los arcos eléctricos y fuentes de luz especializadas tales como las luces negras. De acuerdo con las respuestas biológicas, la luz UV se puede dividir en tres tipos: UV-A, UV-B y UV-C. Altas dosis de UV, en especial UV-B (280-320 nm) causan daños en las células. Tanto la luz UV indirecta como directa son perjudiciales para la vida, debido a la fuerte absorción de longitudes de onda inferiores a 320 nm por parte del ADN. La luz UV-A (320 a 400 nm) causa sólo daño indirecto a ADN, proteínas y lípidos a través de la generación de intermediarios reactivos del oxígeno. Los productos más comunes, producidos la radiación por UV sobre el ADN, son dímeros de pirimidina-ciclobutano (CPD). Bajo condiciones de estrés extremo por UV,

se sabe que, en las bacterias, aumentan las mutaciones, como último mecanismo de resistencia, conocidos como errores de reparación de derivación, que permite pasar por alto las lesiones durante la replicación del ADN. En condiciones normales, estas lesiones bloquearían la replicación por la ADN polimerasa III, pero en el caso de los daños causados por radiación UV, este mecanismo evita que la célula replique su ADN y así es capaz de sobrevivir con lesiones no reparadas. Por razones obvias, esto se traduce en un alto número de mutaciones.

Aunque altas dosis de UV son perjudiciales para la vida, algunos microorganismos, llamados extremófilos, se han adaptado a estas condiciones y son capaces de crecer cuando se los expone a la radiación UV. Por ejemplo, los extremófilos aislados de Lagunas de altura Puno-Andinos (LAPAs) en el noroeste Argentino (Figs. 1-3), las cuales han demostrado ser muy resistentes a fuertes dosis de luz UV, ya que tienen mecanismos eficientes de fotorreparación, como parte de sus mecanismos de defensa contra este tipo de radiación.



Figura 1. Ubicación geográfica de las LAPAs (adaptación a partir de Google Maps).



Figura 2. Típico paisaje reinante en los ambientes extremos de las LAPAs: Laguna Verde (4.400 msnm), Catamarca, Argentina. (Fuente: María Eugenia Farías).



Figura 3. Diferentes tipos de comunidades microbianas de las LAPAs (Fuente: María Eugenia Farías).

El proceso de fotorreactivación se ejecuta por enzimas dependientes de luz conocidas como "Fotoliasas" que se encuentran conservadas a lo largo de la evolución y fueron descritas en los tres dominios biológicos. Las fotoliasas son proteínas monoméricas de 53 a 66 kDa que contienen flavin-adenina dinucleótido (FAD) como cofactores y pigmentos antena tales como deazaflavina o derivado de trimetilhidrofolato. Las fotoliasas son consideradas una de las primeras soluciones de la naturaleza a la amenaza del daño en el ADN por la radiación UV de alta intensidad.

La más común de estas lesiones es el dímero de pirimidina cis-syn ciclobutano (CPD), formado por cicloadición [2 + 2] de dos bases de pirimidina adyacentes (en general, un par de timinas). Tales lesiones CPD evitan que las polimerasas funcionen, provocando eventualmente, la muerte celular. Las fotoliasas se unen fuertemente a los CPD en condiciones de oscuridad. La absorción de luz UV-A y / o azul (320-470 nm) por la forma semi-reducida de su cofactor FAD (FADH•-) que inicia una reacción de transferencia de electrones causando la separación de los dos enlaces C-C en la unidad de CPD, que resulta en la reformación de las dos bases de pirimidina separadas.

HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS

La bioinformática es una combinación de la biología con la información tecnológica (Fig. 4). Esta disciplina abarca cualquier herramienta computacional y métodos usados

para manejar, analizar y manipular grandes cantidades de datos biológicos. Esencialmente, la bioinformática tiene tres componentes:

- La creación de base de datos permite el almacenamiento y manejo de grandes cantidades de base de datos.
- El desarrollo de algoritmos y estadísticas que determinen relaciones entre los conjuntos de datos.
- El uso de estas herramientas para el análisis e interpretación de varios tipos de datos biológicos, incluyendo ADN, ARN, secuencias y estructuras proteicas, perfiles de expresión de genes y rutas bioquímicas.

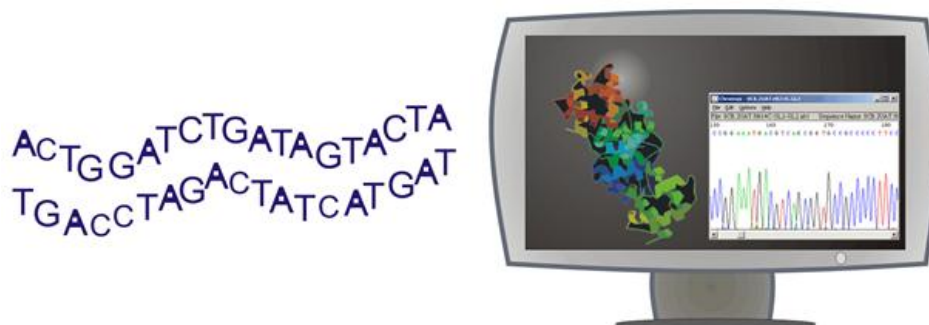


Figura 4. Representación del trabajo bioinformático.

El término Bioinformática comenzó a usarse en el año 1990 y fue originalmente un sinónimo para el manejo y análisis de ADN, ARN y secuencias proteicas. Las herramientas computacionales para realizar secuencias y análisis estuvieron disponibles desde 1960, pero solo para una minoría; hasta que se hicieron avances en la tecnología de secuenciación, junto con la rápida expansión en el número de secuencias almacenadas en bases de datos tales como GenBank.

Actualmente, el término se ha expandido e incorporado para la designación de muchos otros tipos de datos biológicos como por ejemplo estructuras proteicas, perfiles de expresión de genes e interacción de proteínas. Cada una de estas áreas requiere su propia base de datos, algoritmos y métodos estadísticos.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS. PARTE 1. ENSAYOS A LA RESISTENCIA A RADIACION UV-B

Experimento 1. Ensayos cualitativos.

Objetivo

Estos ensayos permitirán rápidamente evaluar y comparar el nivel de resistencia de

las cepas seleccionadas. Como referencia (control sensible) utilizamos dos cepas de la colección de cultivos DSMZ: *Acinetobacter johnsonii* DSM 6963 y *Acinetobacter baumannii* DSM 30007. Las cepas resistentes usadas para los experimentos son: *Acinetobacter* sp. Ver3 y *Acinetobacter* sp Ver7 pertenecientes a la Colección de extremófilos del LIMLA (www.limla.com.ar).

Metodología

Las cepas seleccionadas crecerán en medio LB (en g/l: extracto de levadura 5, NaCl 10, Triptona 10) a 30 °C en agitación (200 rpm). Se sembrarán las células en fase media-exponencial por medio de un centrifugado a 8,000 rpm; por 30 minutos a 4 °C. Los *pellets* se lavarán dos veces en 0.9% de NaCl y serán resuspendidos en la misma solución hasta una DO_{600} : 0.6. Se recogerá una alícuota de cada suspensión celular (100 μ L) y se realizarán diluciones seriales (10^{-1} hasta 10^{-5}). Las placas con medio agarizado serán inoculadas con 5 μ L de cada dilución en una fila como se representa en la figura 5. Luego de esto, las placas inoculadas se expondrán a dosis incrementadas de UV-B (hasta 380 kJ m^{-2}), se cubrirán inmediatamente y se mantendrán en oscuridad para prevenir la fotoreactivación. Se determinará el crecimiento luego de 48 hs. de incubación a 30° C. El crecimiento relativo se comparará con los inoculados en las placas control no expuestas a radiación UV-B.

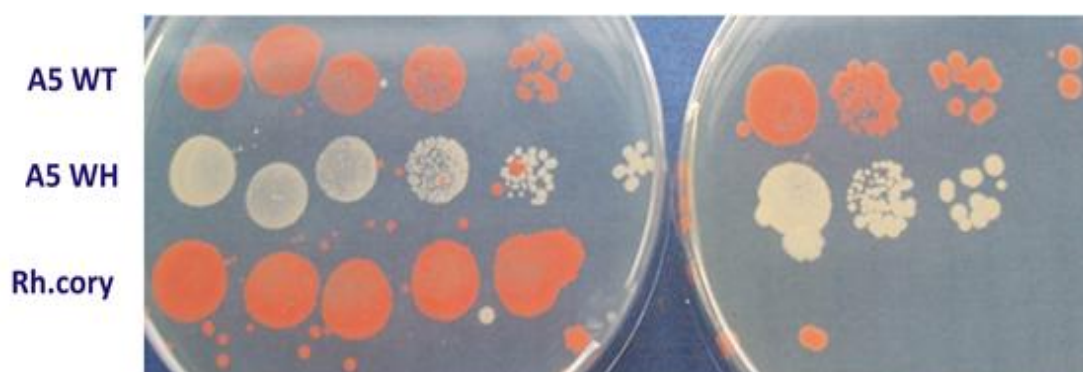


Figura 5. Perfiles de Resistencia a UV-B de dos cepas resistentes (A5 WT y A5 WH) y una cepa control sensible: *Rhodococcus corynebacteroides*. Se emplearon diluciones seriadas: 10^{-1} a 10^{-5} (de izquierda a derecha). La placa de la izquierda es el control no expuesto a UV, la placa de la derecha presenta las diluciones expuestas al tratamiento.

Informe

Analizar el crecimiento en las placas de agar inoculadas y escribir los resultados en la siguiente tabla como signos positivos (Tabla 1). Realizar las conclusiones correspondientes.

Cepa/Diluciones	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Non-exposed controls					
Ver3					
Ver7					
AB					
AJ					
10 min UV/B					
Ver3					
Ver7					
AB					
AJ					
30 min UV/B					
Ver3					
Ver7					
AB					
AJ					
60 min UV/B					
Ver3					
Ver7					
AB					
AJ					

Tabla 1. Toma de datos de los resultados del ensayo de Resistencia a UV-B cuantitativo.

Experimento 2. Ensayos cuantitativos

Objetivo

Este ensayo permitirá evaluar cuantitativamente los niveles de resistencia y habilidades de fotorreparación de las cepas seleccionadas por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) luego de la exposición a UV, y luego de los periodos de reparación (en luz u oscuridad). En este caso se usarán dos cepas de *E. coli* BL21, una cepa con un plasmido recombinante (pET28) que lleva un gen para la fotoliasa previamente clonado de *Acinetobacter* sp. Ver3, y cepas control sin el plasmido recombinante.

Metodología

Las cepas seleccionadas crecerán en medio LB (con los correspondientes antibióticos para las cepas transformadas) a 30° C en agitación (200 rpm.). Se sembrarán las células en fase media-exponencial por centrifugado a 8,000 rpm, durante 30 minutos, a 4° C. Los pellets se lavarán dos veces en NaCl al 0.9% y resuspendidos en la misma solución. Una porción de cada suspensión celular (DO₆₀₀: 0.6; 20 ml) se expondrá a radiación UV-B por 10 minutos (38 kJ/m⁻²) (Vilbert Lourmat VL-4; máxima intensidad a 312 nm; intensidad promedio: 7mW/cm⁻²) en agitación (50 rpm) a 20° C. Los controles se incubarán, en oscuridad, bajo las mismas condiciones. Luego de la exposición a UV-B, se removerá una alícuota (100 µL) y se evaluará el crecimiento microbiano por conteo de

número de unidades formadoras de colonia (UFC) luego de 48 hs de incubación a 30 ° C en oscuridad, para prevenir la fotoreactivación.

Tanto los controles como las suspensiones celulares expuestas a la UV-B serán sujetos a condiciones de fotorreparación (FR) o de reparación en oscuridad (RO). La fotorreparación se permitirá mediante la incubación de las suspensiones bajo radiación foto-activa (RFA) durante 120 minutos (18 W/m^2) usando una lámpara OSRAM L18 77 W con un agitador continuo (50 rpm) a 20° C, mientras que la reparación en oscuridad se evaluará bajo las mismas condiciones experimentales, pero en ausencia de RFA. Luego de cada tratamiento, se removerá una alícuota (100 μL) y se determinará el número de UFCs luego de 48 hs. de incubación, a 30° C, bajo condiciones de oscuridad, para prevenir la fotoreactivación.

Informe

Realizar el conteo de UFCs y escribir los resultados en la siguiente tabla como UFC por ml (tabla 5 y 6). Usar el programa excel para presentar los resultados en forma gráfica. Indicar sus conclusiones.

Tratamiento/Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Cepa de <i>E. coli</i> BL21 (sin el plásmido recombinante)							
T0							
T130							
UV10							
RO							
FR							
Cepa de <i>E. coli</i> BL21 (con el plásmido recombinante y gen fotoliasa)							
T0							
T130							
UV10							
RO							
FR							

Tabla 2. Toma de datos de los resultados del ensayo de Resistencia a UV-B cuantitativo.

PARTE 2. BIOINFORMATICA

Objetivo

Este ejercicio permitirá determinar la diversidad de secuencias de fotoliasas en genoma de cepas de *Acinetobacter* presentes en bases de datos. Teniendo en cuenta esta diversidad de secuencias, se aprenderá a diseñar oligonucleótidos de genes de fotoliasa para ser utilizados en ensayos de PCR para las cepas resistentes a UV en estudio.

Metodología

Emplearemos principalmente la base de datos del NCBI:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Aquí hay algunos links de herramientas bioinformáticas útiles tanto para este curso, como información general:

Para búsqueda de secuencias homologas

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi#!>

<http://www.fasta.genome.ad.jp/>

<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

Para realizar alineaciones múltiples

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

<http://www.toulouse.intra.fr/multalin.html>

<http://dot.imagen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>

Para comparación de dos secuencias

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>

Para diseño de oligonucleótidos

<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi#!>

http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primers/primers3_www.cgi

<http://insilico.ehu.es/>

Traducción de ADN en proteínas

<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/dna.html>

<http://www2.ebi.ac.uk/translate/>

<http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Identificación de ORFs y análisis de proteínas

<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi#!>

Identificación de secuencias de consenso y dominios estructurales

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

<http://www.smart.embl-heidelberg.de/>

<http://www.expasy.ch/>

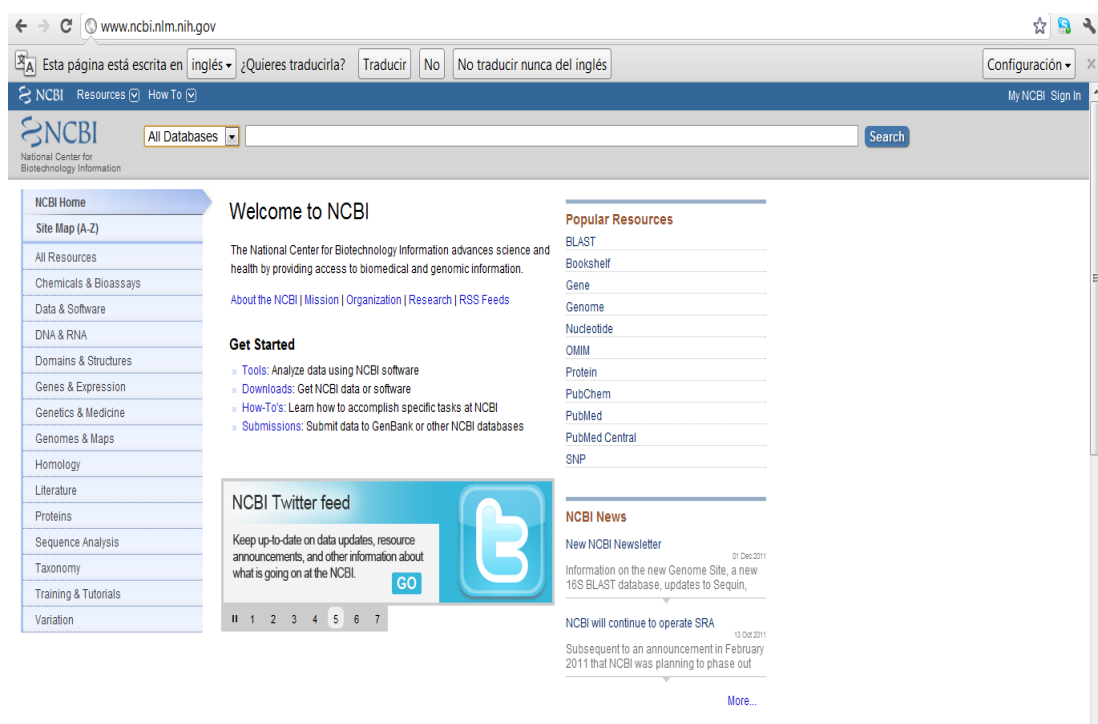


Figura 6. Página de inicio del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Búsqueda de homólogos de genes fotorreceptores en genomas de *Acinetobacter* sp.

1. Buscar y copiar la secuencia proteica correspondiente al gen para fotoliasa (phrB) en *E. coli*.

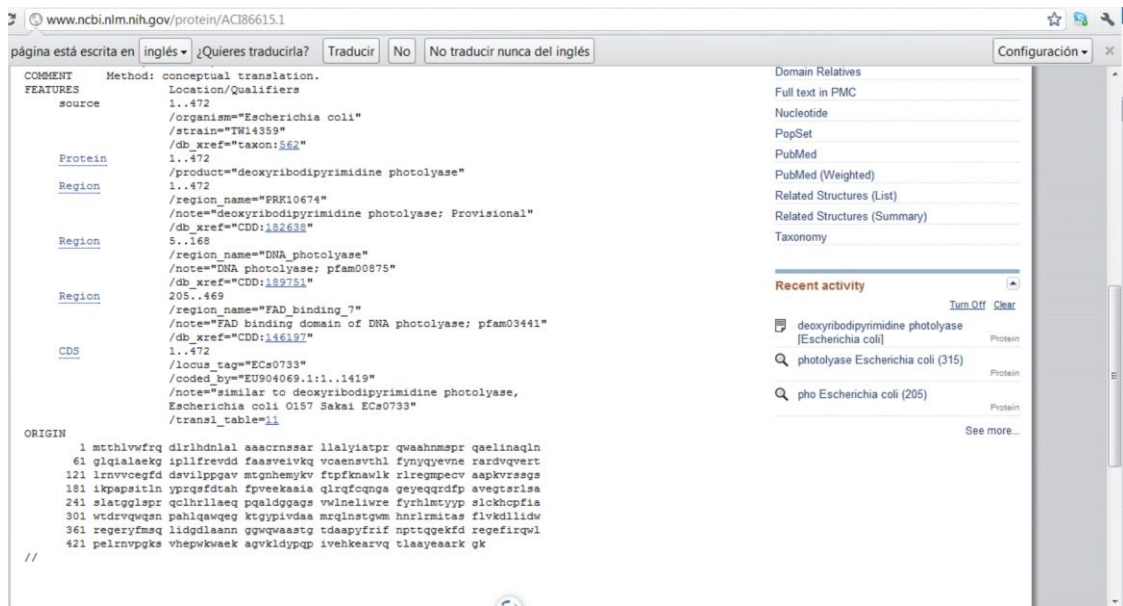


Figura 7. Secuencia proteica PhrB de *E. coli* disponible en NCBI.

2. Ir a la Herramienta BLAST Genome y comparar las secuencias proteicas (PhrB de *E. coli*) con todo los genomas de cepas de *Acinetobacter*.

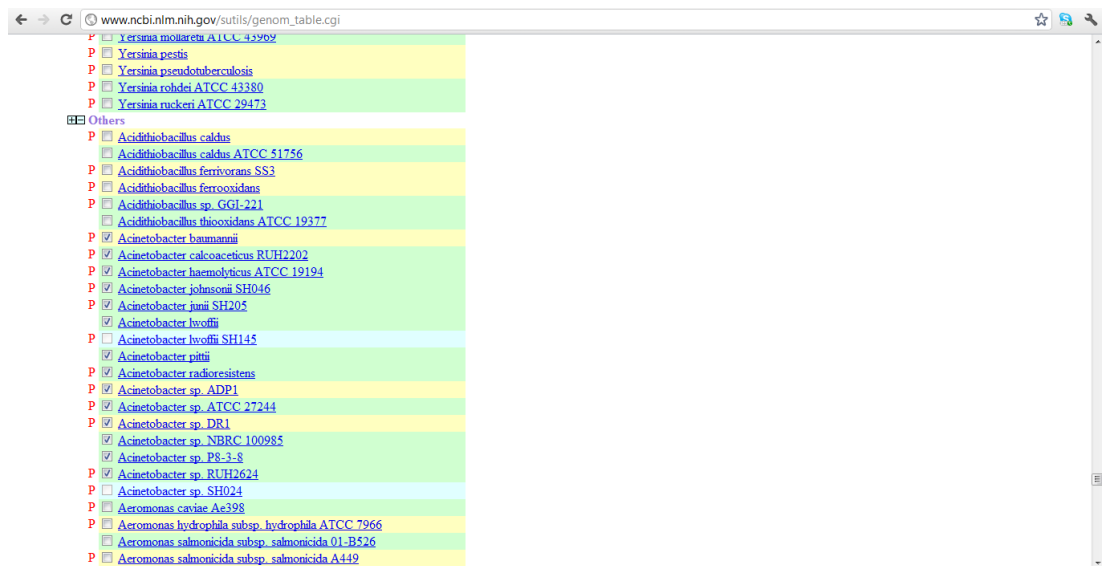


Figura 8. Página de todos los genomas disponibles para comparación o BLAST en la base de datos NCBI.

3. Recuperar al menos 20 secuencias que den identidad significativa (uno por genoma). Para este propósito, marcar cada secuencia deseada y luego recuperar las secuencias:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
ADMT01000132.1	Acinetobacter haemolyticus ATCC 19194 contig00193, whole genome shotgun sequence	400	400	97%	3e-124	44%	
ACPL01000065.1	Acinetobacter johnsonii SH046 cont1.65, whole genome shotgun sequence	395	395	98%	2e-122	43%	
AFQY01000001.1	Acinetobacter lwoffii WJ10621 contig001, whole genome shotgun sequence	394	394	98%	3e-122	42%	
ACOF01000011.1	Acinetobacter sp. RUH2624 cont1.11, whole genome shotgun sequence	394	394	97%	3e-122	43%	
ABYN01000079.1	Acinetobacter sp. ATCC 27244 contig00079, whole genome shotgun sequence	392	392	97%	1e-121	44%	
AFCZ01000019.1	Acinetobacter baumannii OIFC032 ctg1126921148084, whole genome shotgun sequence	388	388	98%	3e-120	43%	
AECZ01000168.1	Acinetobacter baumannii 3909 seq0168, whole genome shotgun sequence	385	385	97%	5e-119	43%	
AECB01000047.1	Acinetobacter baumannii ATCC 19606 cont1.47, whole genome shotgun sequence	383	383	97%	2e-118	43%	
BAEB01000023.1	Acinetobacter sp. NBRC 100985 DNA, contig: ACT4023, whole genome shotgun sequence	383	383	98%	2e-118	41%	
ABXK01000020.1	Acinetobacter baumannii AB900 contig00569, whole genome shotgun sequence	383	383	97%	2e-118	43%	
NC_009085.1	Acinetobacter baumannii ATCC 17978, complete genome	382	415	97%	4e-118	43%	
AFDA01000035.1	Acinetobacter baumannii Naval-18 ctg1127182502510, whole genome shotgun sequence	382	382	97%	4e-118	43%	
AERM01000010.1	Acinetobacter baumannii UMB003 UMB003_c10, whole genome shotgun sequence	382	382	97%	5e-118	43%	
AEPD01000027.1	Acinetobacter baumannii 4190 seq0027, whole genome shotgun sequence	382	382	97%	5e-118	43%	
NC_014259.1	Acinetobacter sp. DR1 chromosome, complete genome	380	380	98%	2e-117	42%	
AELP01000013.1	Acinetobacter baumannii UMB002 UMB002_c13, whole genome shotgun sequence	380	380	97%	3e-117	43%	
AGFH01000019.1	Acinetobacter pittii D499 Contig21, whole genome shotgun sequence	380	380	98%	3e-117	42%	
ADCH01000037.1	Acinetobacter sp. SH024 cont1.37, whole genome shotgun sequence	380	380	98%	3e-117	42%	
AEBZ01000065.1	Acinetobacter baumannii D1279779 contig00072, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	6e-117	42%	
AEBD01000043.1	Acinetobacter baumannii Naval-81 ctg1127184433065, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	8e-117	42%	
NC_010611.1	Acinetobacter baumannii ACICU chromosome, complete genome	379	412	97%	9e-117	42%	
AEDG01000001.1	Acinetobacter baumannii MDR-TJ, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	9e-117	42%	
AEDY01000001.1	Acinetobacter baumannii AB210 seq0001, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	9e-117	42%	
AFTA01000053.1	Acinetobacter baumannii ABNH2 contig00053, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	9e-117	42%	
AERY01000021.1	Acinetobacter baumannii WM99c contig00022, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	9e-117	42%	
ACYG02000104.1	Acinetobacter baumannii 6014059_A_sp6014059-2_0_Cont195.3, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	9e-117	42%	
AECY01000035.1	Acinetobacter baumannii 3990 seq0036, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	9e-117	42%	
AFTB01000091.1	Acinetobacter baumannii ABNH3 contig00101, whole genome shotgun sequence	379	379	97%	1e-116	42%	
AFIE01000007.1	Acinetobacter sp. P8-3-R contig00007, whole genome shotgun sequence	377	377	98%	2e-116	42%	

Figura 9. Página que muestra todas las proteínas significativas dentro del genoma de varias cepas de *Acinetobacter* mostrando la identidad parcial con respecto a la proteína PhrB de *E. coli*.

Results: 10

- 17,341 bp linear DNA
Accession: ADMT01000132.1 GI: 292824323
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 118,514 bp linear DNA
Accession: ACPL01000065.1 GI: 261853861
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 1,142,324 bp linear DNA
Accession: AFQY01000001.1 GI: 337752635
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 150,041 bp linear DNA
Accession: ACOF01000011.1 GI: 260159367
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 19,868 bp linear DNA
Accession: ABYN01000079.1 GI: 209946583
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- 157,206 bp linear DNA
Accession: AFCZ01000019.1 GI: 333830631
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Figura 10. Página que muestra la lista de proteínas seleccionadas (10) que se elegirán para el siguiente paso.

4. Usar ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para alinear las secuencias recuperadas y observar los dominios conservados:

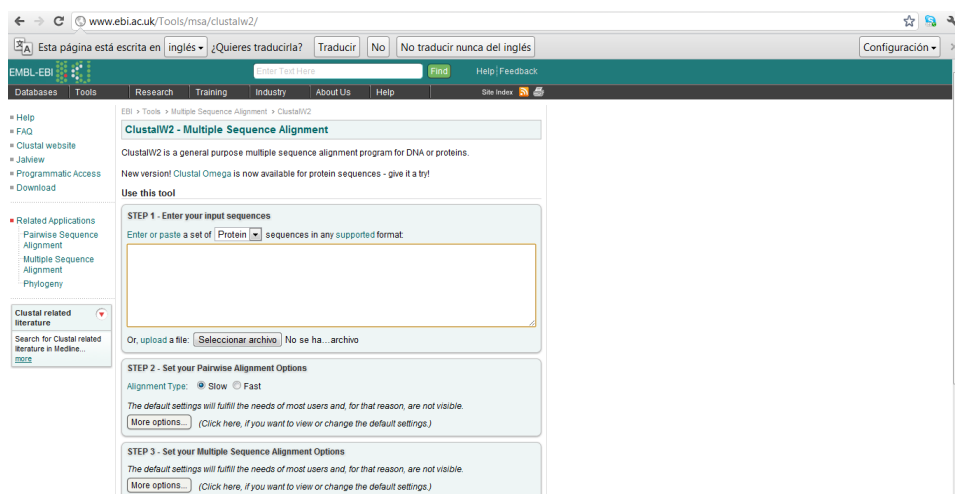


Figura 11. Página que muestra la interfase de ClustalW2 donde hay que pegar las secuencias alineadas.

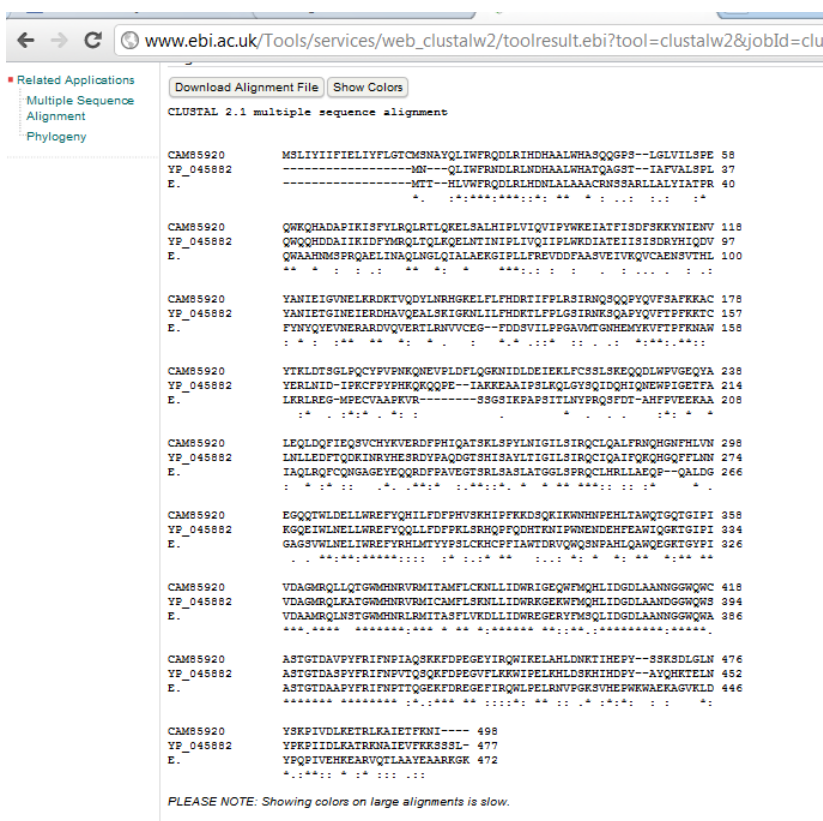


Figura 12. Página que muestra un ejemplo de alineamiento con tres secuencias, producido por ClustalW2.

5. Detectar los aminoácidos conservados y utilizar la herramienta de uso de codones (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) de *Acinetobacter* sp. para el diseño de oligonucleótidos.

6. Probar los nuevos primers diseñados por PCR *in silico* : <http://insilico.ehu.es/>.

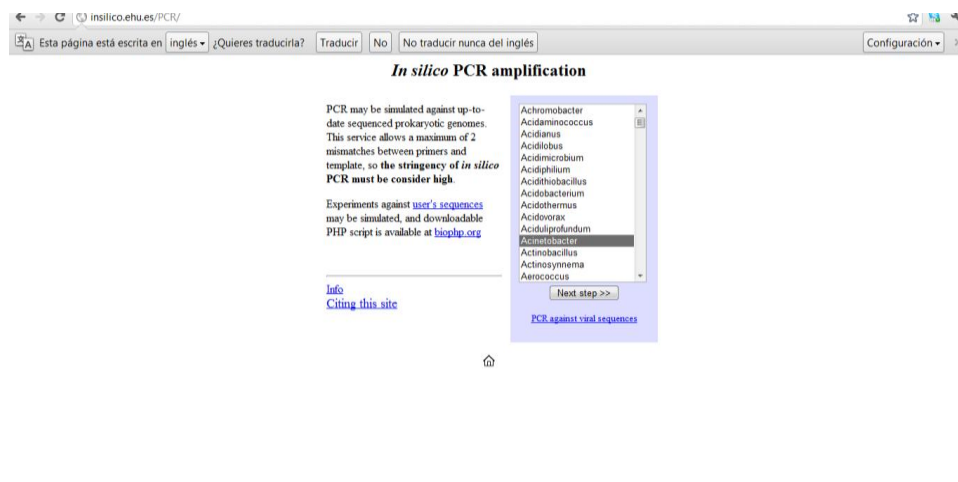


Figura 13. Pagina que muestra la interfase de PCR *in silico*.

BIBLIOGRAFIA DE CONSULTA

- Albarracín, V. H.; Pathak, G.; Douki, T.; Cadet, J.; Borsarelli, C.; Gärtner, W. y Farias, M. E. 2012. Extremophilic Acinetobacter strains from High-Altitude Lakes in Argentinean Puna: Remarkable UV-B Resistance and Efficient DNA Damage Repair. *Origin of Life and Evolution of Biospheres*, 42(2-3):201-221.
- Albarracín, V. H.; Dib, J. R.; Ordoñez, O. F. y Farías, M. E. 2011. A Harsh Life to Indigenous Proteobacteria at the Andean Mountains: Microbial Diversity and Resistance Mechanisms Towards Extreme Conditions. En: Sezenna, M. L. (Ed.). *Proteobacteria: Phylogeny, Metabolic Diversity and Ecological Effects*. Book Series: Microbiology Research Advances. Nova Science Publishers, pp 99-131.
- Albarracín, V. H. y Farías, M. E. 2012. Biotecnología Turquesa. *Revista Hipótesis*, Apuntes Científicos Uniandinos, Universidad de Los Andes, 13: 32-39.
- Bequer Urbano, S.; Albarracín, V. H.; Ordoñez, O. F.; Farias, M. E. y Alvarez, H. A. 2013. Lipid storage in High-Altitude Andean Lakes extremophiles and its mobilization under stress conditions in Rhodococcus sp. A5, a UV-resistant actinobacterium. *Extremophiles*, DOI 10.1007/s00792-012-0508-2.
- Farias, M. E.; Rascovan, N.; Toneatti, D. M.; Albarracín, V. H.; Flores, M. R.; Poiré, D.; Collavino, M.; Aguilar, M.; Vazquez, M. y Polerecky, L. 2013. The discovery of stromatolites developing in a high-altitude volcanic lake Socompa, Argentinean Andes. *PLOSOne*, Aceptado. *PLOS One* 8: e353497.

- Farías, M. E.; Poire, D. G.; Arroiu, J. y Albarracín, V. H. 2011. Modern stromatolite ecosystems at alkaline and hypersaline high-altitude lakes at the Argentinean Puna. In Tewari, V. & Seckbach, J (Eds) *Stromatolites: interaction of microbes with sediments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Book Series, Springer. 18: 427-441.
- Flores, M. R.; Ordoñez, O. F. y Farías, M. E. 2009. Isolation of UV-B resistant bacteria from two Andean wetlands (4,400 m asl) with saline and non-saline conditions. *J Gen Appl Microbiol.*, 55: 447-58.
- Moreno, J. R., Gorriti, M. F., Flores, M. R. y Albarracín, V. H. 2012. Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. *Reduca(Biología) Serie Microbiología*, 5(5): 94-109.
- 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: 461-73.

RECURSOS ELECTRONICOS

Bioinformatics Resource Portal, ExpASY.

<http://expasy.ch>

Bioinformatics Tools for Sequence translation at the EBI.

<http://www.ebi.ac.uk/translate/>

Blast 2 Sequences, NCBI-NIH.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>

Broad Institute of MIT and Harvard.

<http://www.genome.wi.mit.edu>

Codon Usage Database.

<http://www.kazusa.or.jp/codon/>

EBI Multiple Sequence Alignment program, Clustal W2.

<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>

European Bioinformatics Institute, EBI.

<http://www.ebi.ac.uk>

EzTaxon Server.

<http://147.47.212.35:8080/index.jsp>

In Silico Simulation of Molecular Biology Experiments.
<http://insilico.ehu.es/>

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas, LIMLA-CONICET.
<http://www.limla.com.ar>

Multiple Sequence Alignment, MultAlin.
<http://www.toulouse.intra.fr/multalin.html>

National Center for Biotechnology Information, NCBI.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Search for Conserved Domains CD at the NCBI.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>

Sequence Similarity Search, FASTA.
<http://www.genome.jp/tools/fasta/>

Sequence Tool at the Biology Workbench.
<http://seqtool.sdsc.edu>

Simple Modular Architecture Research Tool, SMART.
<http://www.smart-embl.heidelberg.de>

The EMBL Nucleotide Sequence Database at the EBI.
<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

Translate tool at the Bioinformatics Resource Portal, ExPASy.
<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/dna.html>

Recibido: 3 agosto 2013.

Aceptado: 21 diciembre 2014.