


# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

**Bacterias halófilas como una  
fuente de recursos bióticos: una  
visión de lo evolutivo a lo  
biotecnológico**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA  
**LUIS RUIZ RÍOS**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Febrero 2020



# **UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

## **T E S I S**

**Bacterias halófilas como una fuente  
de recursos bióticos: una visión de lo  
evolutivo a lo biotecnológico**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**LUIS RUIZ RÍOS**

Director

**DR. REINER RINCÓN ROSALES**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

Asesores

**DRA. LORENA MERCEDES LUNA CAZÁRES**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNICACH**

**M. EN C. CLARA IVETTE RINCÓN MOLINA**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Febrero 2020



**Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas**  
**Dirección de Servicios Escolares**  
**Departamento de Certificación Escolar**  
Autorización de impresión



Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Fecha: 04 de diciembre de 2019

C. Luis Ruiz Ríos

Pasante del Programa Educativo de: Licenciado en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:  
Bacterias halófilas como una fuente de recursos bióticos: una visión de lo evolutivo a lo  
biotecnológico

En la modalidad de Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres

Dra. Christian Anabí Riley Saldaña

Mtro. José Ignacio Sánchez Vázquez

**Firmas:**


Ccp. Expediente.

## DEDICATORIAS

A mi mamá Lili con amor y cariño, espero sea el primero de muchos logros académicos donde pueda colocar tu nombre. El recurrir a tu nombre, a tu persona en cada evento me impulsa a no desanimarme. Gracias por tu inagotable manera de darme amor.

A mi papá Luis E. por el esfuerzo permanente de invertir en mi de manera tangible e intangible, por tu autentica forma de darme amor, aun desde la distancia, en todo momento siento tu cercanía. Tus consejos han sido en todo momento genuinos.

A mi hermana Liliette, me haces mantener en todo momento una admiración por ti. Aun continúo buscando la forma de parecerme a ti, seguiré haciendo mi mejor esfuerzo. Gracias por el amor que me brindas desde la distancia, nunca lo he dejado de sentir.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por la bondad con la que decora las promesas.

Al Dr. Reiner por contribuir a reafirmar y consolidar mi gusto por el mundo microbiano, por dejarme proponer y además esmerarse en el desarrollo de la creatividad e innovación en el campo de la ciencia. Mi admiración por la destreza con la que hace ciencia.

A la Mtra. Clara por darles un genuino orden a todas las ideas compartidas, con la finalidad de mejorar el entendimiento en la ciencia. Gracias por defender el talento de cada persona e introducirme al mundo bioquímico y de los extremófilos. Su gran habilidad de planear y dar identidad a cada proyecto hizo posible el narrar y documentar una parte de la historia microbiana de Chiapas.

A la Dra. Lorena por la paciencia y apoyo inagotable que invirtió en la redacción de este documento. El poco tiempo de cercanía que mantuve de asesoría con la Dra. me despertó un gran deseo por formar parte de sus alumnos.

A la Dra. Riley por mantenerse dispuesta a resolver dudas y la indiscutible hospitalidad con la que me recibió en todo momento.

Al Mtro. Ignacio por estar al pendiente y apoyando en el proceso para la validación de este documento.

Al equipo de laboratorio de ecología genómica por la generosidad con la que me recibieron y me hicieron formar parte de su equipo, por estar dispuestos a apoyar, colaborar y enseñarme a plantear y resolver dudas desde varias opiniones, en especial a la Mtra. Claribel, el Mtro. Héctor y el Mtro. Adal que aportaron mucho en mi formación profesional en estos años.

A mis tias: Ani, Juani, Judith y Magda. A mis primas: Gaby, Ivonne, Jenny y Kim, por los grandes momentos, por la generosidad y el sostén que me han brindado en toda mi vida, cada una ha contribuido en que yo consolide confianza y seguridad hacia mí.

A Julio, el tiempo de conocernos ha sido el suficiente para compartir variadas vivencias, agradezco la incansable manera en que te preocupas por mi bienestar y

sin dudar tú has contribuido a fortalecer la unidad familiar. Te tengo un cariño especial.

A Ivón, por mantenerte cerca en una época emocional crítica, por esa firmeza con la que me das cariño. En cada una de las modalidades que me das afecto contribuyes a mi plenitud.

A Eladio y Tania, su amistad inicio en momentos donde estaban surgiendo eventos complicados, la relación que tengo con cada uno involucra una profunda e incalculable alegría por tenerlos como amigos. Agradezco por permanecer hasta el día de hoy.

”no es sólo belleza a esta dimensión, también hay belleza a dimensiones más  
pequeñas”

.- Entrevista a Richard Feynman por la BBC:  
Oda a una flor (1981).

Lo importante es que la juventud crezca consciente de su responsabilidad social  
hacia la comunidad que ha hecho posible  
su educación como ciudadanos.

.- Entrevista a Humberto Maturana  
por la revista Capital (2016).

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1.	Ambientes extremos.....	4
2.1.1.	Ambientes extremos salinos.....	6
2.1.2.	Formación de ambientes extremos salinos .....	8
2.1.3.	Ambientes hipersalinos acuáticos en México .....	10
2.1.3.1.	Ambientes Salinos en Chiapas.....	11
2.2.	Microrganismos extremófilos.....	14
2.2.1.	Bacterias en ambientes extremos salinos .....	17
2.2.2.	Fisiología: osmorregulación de bacterias en ambientes extremos salinos.....	17
2.2.3.	Extremoenzimas en halófilos.....	21
2.3.	Ecología de bacterias en ambientes extremos salinos.....	25
2.3.1.	Factores responsables del declive .....	26
2.3.2.	Biogeografía .....	27
2.3.3.	Ciclos biogeoquímicos.....	28
2.4.	Criterios para la clasificación taxonómico de bacterias halófilas .....	39
III.	ANTECEDENTES .....	46
IV.	OBJETIVOS.....	53
4.1.	General.....	53
4.2.	Específicos .....	53
V.	ÁREA DE ESTUDIO .....	54
VI.	MÉTODO .....	56
6.1.	Recolecta y análisis fisicoquímico de muestras .....	56
6.2.	Aislamiento y cultivo de halobacterias.....	56
6.3.	Estudio fenotípico en bacterias extremófilas .....	57
6.4.	Conservación de cepas puras de extremófilas.....	57
6.5.	Estudio genómico de las bacterias extremófilas.....	57
6.5.1.	Extracción de ADN genómico.....	57

6.5.2. Estudio de huellas genómicas.....	58
6.5.3. Amplificación del gen 16s ADNr bacteriano y estudio filogenético.....	59
6.5.4. Amplificación del gen plasmídico <i>nifH</i> .....	60
6.5.5. Índices para medir la biodiversidad de la comunidad de halobacterias.....	62
6.6. Evaluación del potencial biotecnológico de las bacterias halófilas aisladas de un ambiente natural salino.....	63
VII. RESULTADOS.....	67
7.1. Composición físico-química del manantial Las Salinas.....	67
7.2. Características fenotípicas.....	70
7.3. Características genotípicas.....	72
7.3.1. Huellas genómicas de bacterias halófilas.....	72
7.3.2. Amplificación del gen cromosomal 16s ADNr.....	74
7.3.3. Perfiles genómicos ARDRA.....	74
7.4. Análisis filogenético y construcción de árboles.....	76
7.5. Índices ecológicos para medir la biodiversidad de bacterias en el manantial Las Salinas.....	82
7.6. Capacidad multifuncional de bacterias aisladas del manantial Las Salinas.....	84
7.7. Distribución geográfica actual y recorrido paleogeográfico.....	87
VIII. DISCUSIÓN.....	94
IX. CONCLUSIONES.....	107
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
XI. ANEXOS.....	141

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Escenarios en donde se crean nuevos ambientes por la aplicación que ejercen las fuerzas geomecánicas. ....	4
Figura 2.	Interacciones globales en el flujo atmosférico del viento.....	5
Figura 3.	Evolución de las evaporitas a través del tiempo .....	9
Figura 4.	Principales ambientes salinos explotados por la industria salinera mexicana.....	11
Figura 5.	Modelo hipotético del transporte de agua salina en el manantial Las Salinas, Ixtapa.....	13
Figura 6.	Perfil Geológico esquemático de Chiapas, de suroeste a noreste .....	14
Figura 7.	Representación esquemática de los diferentes comportamientos en las bacterias dentro de ambientes hipersalinos.....	21
Figura 8.	Acción mensajera de glutamato en el reconocimiento de cambio de salinidades para activar autoinductores involucrados en el sistema QS de <i>H. halophilus</i> .....	26
Figura 9.	Metabolismos utilizados por halobacterias.....	29
Figura 10.	Eficiencia de los distintos procesos metabólicos a diferentes niveles de salinidad .....	29
Figura 11.	Número de especies de halobacterias pigmentadas que se han reportado por cada grupo. Reconstrucción filogenética usando la distancia de Jukes-Cantor y los métodos Neighbor Joining .....	30
Figura 12.	La cantidad de luz absorbida es en relación al tipo de compuestos que tenga integrado en su sistema de la bomba bacteriorodopsina para reflejar un tipo de pigmento.....	31
Figura 13.	Ciclo del carbono en donde participan bacterias aerobias y anaeróbias Anaerobias a su vez se dividen en dos grupos, hidrolíticas que fermentan los polímeros y heterótrofas secundarias que toman los monómeros finales para convertir al carbono en inorgánico .....	31
Figura 14.	Ciclo del nitrógeno en bacterias haloalcalofilas del Lago de Soda, California.....	34

Figura 15. Clico del azufre que llevan a cabo las bacterias halófilas. ....	37
Figura 16. Árbol filogenético de bacterias y archeas basado en la comparación de secuencias de 16 S rRNA .....	41
Figura 17. Representación esquemática general del operón de ARN ribosómico que muestra la localización aproximada en los sitios de unión del cebador para la amplificación en PCR .....	42
Figura 18. El modelo estructural repetitivo intercalado de BOX en <i>S. pneumoniae</i> .....	44
Figura 19. Estructura del gen 16 S rRNA en <i>E. coli</i> .....	45
Figura 20. Mapa de relieve de Ixtapa, Chiapas .....	55
Figura 21. Programación de Box-PCR en termociclador .....	58
Figura 22. Programación para amplificación de nifH-PCR en termociclador .....	61
Figura 23. ADN genómico de cepas bacterianas halófilas .....	72
Figura 24. Perfil genómico BOX-PCR de cepas bacterianas halófilas aisladas del manantial Las Salinas usando el medio TSA .....	73
Figura 25. Perfil genómico BOX-PCR de las cepas bacterianas aisladas del manantial Las Salinas usando el medio Winogradsky .....	73
Figura 26. Amplificación del gen 16S ADNr de algunas cepas bacterianas halófilas aisladas del manantial Las Salinas .....	74
Figura 27. ARDRA de muestras de cepas del medio TSA .....	75
Figura 28. ARDRA de muestras de cepas del medio Winogradsky .....	76
Figura 29. Gen <i>nifH</i> (356 bp) amplificado por las cepas bacterianas halófilas del manantial Las Salinas. ....	78
Figura 30. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa <i>Kocuria</i> TSS-1 .....	78
Figura 31. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa <i>Agromyces</i> SSW-15 ..	79
Figura 32. Árbol filogenético Neighbour-Joining de las Cepas <i>Pseudomonas</i> ASW-1 y SSW-14.....	79
Figura 33. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa <i>Oceanobacillus</i> TSA-35 .....	80
Figura 34. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa <i>Salinicola</i> TSA-31 .....	80

Figura 35. Árbol filogenético Neighbour-Joining Cepas <i>Bacillus</i> SAL-1 y TSS-4 .....	81
Figura 36. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Ceba <i>Exigobacterium</i> TSS-3.....	81
Figura 37. Árbol filogenético Neighbour-Joining de las cepas <i>Halomonas</i> SAL-3, SSW-4- ASW-18, ASW-12, ASW-19, ASW-22, ASW-8, SSW-3 y ASW-11 .....	82
Figura 38. Perfiles enzimáticos-multifuncionales de halófilas de Las Salinas .....	86
Figura 39. Ambientes de donde se han reportado las especies de halófilas que comparten alta similitud genética con las cepas de Las Salinas en Ixtapa, Chiapas .....	89
Figura 40. Distribución de los paleoambientes y corrientes marinas en el Mesozoico .....	90
Figura 41. Distribución de los paleoambientes y corrientes marinas en el Cretácico .....	91
Figura 42. Distribución actual y el recorrido de los ambientes donde se han reportado halófilas tipo del Genbank.....	93
Figura 43. Configuración tectónica del moderno arco volcánico chiapaneco (CVA) .....	97

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Registro de hidrolasas producidas por múltiples bacterias halófilas y su aplicación industrial .....	22
Cuadro 2.	Mezcla para carga de huellas genómicas Box. ....	58
Cuadro 3.	Mezcla para carga de huellas genómicas ARDRA .....	59
Cuadro 4.	Mezcla para carga de PCR-16 S rRNA .....	60
Cuadro 5.	Mezcla para carga de amplificación del gen <i>nifH</i> .....	61
Cuadro 6.	Elementos químicos (iones) determinados en muestras de agua y sedimento del manantial Las Salinas. ....	69
Cuadro 7.	Características fisicoquímicas de las muestras de agua y sedimento del manantial Las Salinas.....	70
Cuadro 8.	Características fenotípicas de las bacterias aisladas del manantial Las Salinas .....	71
Cuadro 9.	Identificación molecular de bacterias del manantial Las Salinas. ....	77
Cuadro 10.	Valores de índices ecológicos de bacterias halófilas de Las Salinas .....	83

## RESUMEN

Los ambientes salinos extremos albergan una diversidad de bacterias con cualidades biológicas multifuncionales y con alto potencial biotecnológico. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad de halóbacterias del manantial “Las Salinas”, ubicada en el municipio de Ixtapa, Chiapas (México). Un total de 88 cepas bacterianas halófilas fueron aisladas de este manantial usando medios de cultivo adicionados con NaCl. El análisis filogenético basado en el gen cromosomal 16S rADN permitió agrupar las cepas dentro de los géneros: *Agromyces*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Oceanobacillus*, *Pseudomonas* y *Salinicola*. La morfología celular predominante de las cepas fue bacilos, Gram negativos que en el medio de cultivo formaron colonias con varias tonalidades y formas, con capacidad para producir pigmentos y exopolisacáridos. El índice de Shannon-Weaver mostro que existe una alta diversidad de especies halófilas en el manantial “Las Salinas” principalmente en el sedimento. Las especies aisladas en su perfil genómico, están estrechamente relacionadas genéticamente con especies halófilas encontradas en nichos alejados territorialmente, en su mayoría éstas corresponden a sitios marinos o de ambientes acuáticos. El manantial es un ambiente natural altamente salinoalcalino, de tipo talohosalino, que en su historia geológica guarda evidencia que estuvo conectado con el mar. En este entorno se alojan cepas haloalcalófilas que representan un recurso biotecnológico, para procesos en diversos campos. La información obtenida además permite hacer aproximaciones de estas bacterias con su entorno geológico.

# I. INTRODUCCIÓN

El planeta Tierra alberga una diversidad importante de ambientes naturales, en donde coexisten una gama de especies biológicas que contribuyen en la sustentabilidad y funcionalidad de los ecosistemas. En 1979, Brock introdujo la definición de los ambientes extremos, desde un punto de vista biológico, como ambientes en los que existe una escasa diversidad de especies y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos (Oueriaghli, 2013).

La biodiversidad en los ambientes extremos está determinada por el fuerte estrés al que son sometidos los organismos, la mayoría de los seres vivos son incapaces de vivir en estos ecosistemas, sin embargo, la vida microbiana es la forma de vida más prolifera que ha podido adaptarse a sobrevivir bajo estas condiciones extremas (Kerker, 2004).

Un sitio salino para ser considerado extremo principalmente debe de mantener una concentración de salinidad superior al 3.5% (Ventosa *et al.*, 2008), o en donde la sal se cristalice por saturación (Litchfield, 1998). Las entidades biológicas que son capaces de sobrevivir en estos lugares además de soportar la hipersalinidad deben enfrentar bajas concentraciones de oxígeno, bajas cantidades de nutrientes, altas presiones, alcalinidad, exposición a la radiación solar, la presencia de metales pesados con contenidos tóxicos, y bajas o altas temperaturas de acuerdo a su ubicación geográfica (Rodríguez-Valera, 1988; Oueriaghli, 2013). Estos lugares extremos se distribuyen ampliamente en la naturaleza y están representados principalmente por hábitats acuáticos y suelos hipersalinos (Ventosa *et al.*, 2008; Oueriaghli, 2013).

En México, se ha reportado una extensión de 10 000 km<sup>2</sup> en litoral y zonas áridas y semiáridas en donde existen hábitats salinos y yesosos (Cervantes *et al.*, 2001). Las zonas que han mantenido la suficiente sal para ser explotadas por la industria salinera, han favorecido a que el país ocupe el séptimo lugar a nivel mundial en la producción de sal y el primero en Latinoamérica, pero a pesar de esta conformación territorial y del registro de muchos acuíferos en el país con suelos salinos y agua salobre (Comisión Nacional del Agua, 2011) los estudios en México rara vez se centran en conocer qué organismos están poblando estos sitios, aún y cuando en años recientes

el estudio de los microorganismos halófilos ha cobrado mucha relevancia por el potencial biotecnológico que estos representan como fuente de recursos bióticos.

En cambio, los análisis realizados en estos ambientes están dirigidos en su mayoría a resolver problemas de salinidad en suelos (Mata-Fernández, *et al.*, 2014), pasando por alto que, al entender la adaptación de los microorganismos halófilos en estas áreas, se aportarían medidas para minimizar y controlar los efectos nocivos que la salinidad ambiental causa en los suelos y terrenos de interés agronómico y ecológico.

Alcocer y Williams en 1993, señalan que prácticamente en todos los Estados de la República Mexicana se encuentran lagos, ríos, manantiales o pozos con un alto contenido de sal, así como las salinas, que están en los estados costeros y que en su mayoría son antiguas lagunas litorales cuya comunicación con el mar se perdió.

Estudios geológicos realizados en el Estado Chiapas revelan que durante la etapa Calloviense, hace 166,1 millones de años, el desplazamiento de aguas marinas del Océano Pacífico cubrieron una extensa zona con poca circulación, poco tirante de agua y alta evaporación, condiciones que permitieron la formación de salinas y el depósito de grandes volúmenes de sal, principalmente en la Sierra Madre de Chiapas (Padilla, 2007).

En el municipio de Ixtapa, Chiapas las evidencias palinológicas con registros abundantes en especies de mangles como *Rhizophora* spp. y *Pelliceria* spp sustentan que durante la formación de Ixtapa esta zona formaba parte de una región costera estuarina con pastizales salinos, considerando así, que el paleoambiente del Mioceno medio y tardío (Martínez-Hernández, 1992) contribuyó a que el manantial “Las Salinas” conserve esta propiedad de salinidad y que actualmente se mantenga activa, alojando microbiota extremófila que persiste en un ambiente que parece imposible de encontrarse a 1140 msnm.

Hasta el momento, los datos que se conocen del manantial salino en Ixtapa es información anecdótica. Actualmente no existen trabajos que expliquen el origen de la formación del manantial y mucho menos hay estudios que describan y mencionen la composición microbiana que alberga este ambiente extremo. De los datos recopilados,

solamente se estima que su profundidad supera los 8 metros y el aspecto árido y pedregoso del suelo de la zona demuestra una acumulación de sales y minerales.

Por todo lo anterior y tomando en cuenta el uso biotecnológico que pueden tener los microorganismos aislados de este ambiente salino extremo, en este trabajo, se planteó como objetivo principal conocer la biodiversidad de bacterias halófilas presentes en el manantial “Las Salinas” utilizando herramientas genómicas para su identificación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Ambientes extremos

Los ambientes extremos se han originado en la tierra a una escala temporal geológica amplia, y muchos aún están en transcurso de formación. Estos entornos han surgido por los procesos geoquímicos que ocurren mientras una nueva zona se forma como una manifestación de la actividad tectónica, en donde se produce de manera variada calor extremo, pH, gases disueltos y metales (Figura 1), estas interacciones causan que las concentraciones de los nutrientes suelen ser reducidas y lleguen a ser áreas oligotróficas. Estos ambientes cuentan con diferentes sistemas de ventilación energética que forjan las características de estos sitios (Horikoshi y Bull, 2011).

La evolución de muchos de estos entornos se produce: A) por cinturones montañosos que se pliegan por las fuerzas de tensión que actúan sobre las rocas. B) escisión por deslizamiento hacia una dirección horizontal por la aplicación de una fuerza desigual en un solo punto. C) La formación de montañas por la separación de bloques que generan fallas. En estas formaciones se libera energía que es aprovechada por diversos organismos para colonizar el lugar (Figura 1).

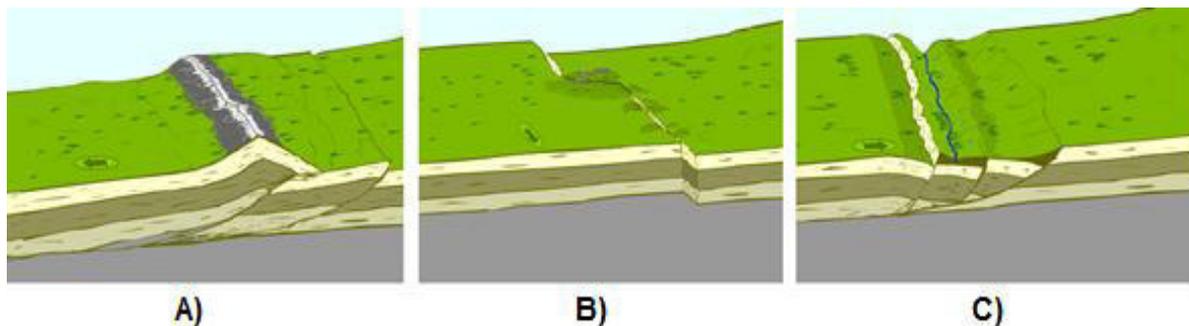


Figura 1. Escenarios en donde se crean nuevos ambientes por la aplicación que ejercen las fuerzas geomecánicas. Fuente: Asociación de Geógrafos Ingleses s/f.

La formación a través de millones de años de la criósfera ha estado acompañada del clima. En este dinamismo criósfera-clima se modulan las circulaciones oceánicas y las circulaciones que forman las cuencas endorreicas, además de la hidrología y la precipitación que adquiere un sitio (Horikoshi y Bull, 2011). Por lo tanto, en cada región por el dinamismo de criósfera-clima los vientos toman diferentes direcciones en la circulación atmosférica, asociándose a los flujos polares y celdas de Hadley (Figura 2)

que desembocan en factores extremos que rigen a muchas zonas (Easterling *et al.*, 2000).

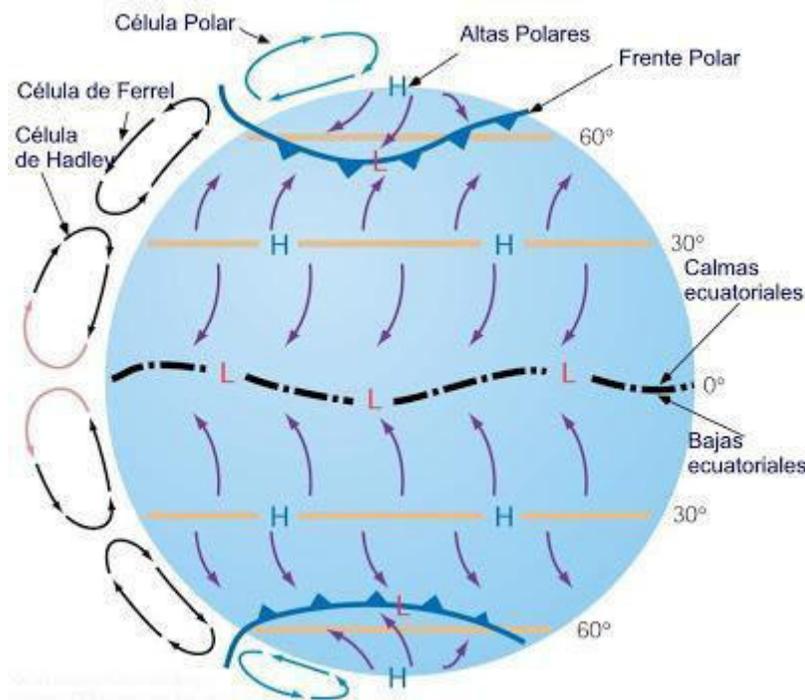


Figura 2. Interacciones globales en el flujo atmosférico del viento. Fuente: s/a y s/f.

Dentro de la extremóbiosfera, los ambientes extremos se identifican de acuerdo al factor físico-químico que sobresale del área, o bien por el factor que es responsable de modificar la escala y la concentración del resto de los factores, de esta forma es que existen entornos con acidez por debajo de 3 y sitios muy alcalinos superiores a 10 en pH, lugares hipertérmicos con temperaturas por encima de 80 °C, terrenos congelados y fríos menores a 5 °C, ambientes que almacenan metales pesados como cobre, cadmio, arsénico y zinc, hábitats oligotróficos con escasez de nutrientes, espacios que se han vuelto radioactivos por la energía nuclear que se emite naturalmente, por la inestabilidad de muchos elementos o por la causa antropogénica en la manipulación isotópica. Las áreas tóxicas con agentes dañinos como disolventes son sitios también considerados extremos, los lugares xerófilos ausentes o deficientes de agua, las zonas en donde la fuerza de presión es superior a 40 MPa y suelos salinos o cuerpos de agua con saturación de sal mayor a 3.5% son reconocidos como ambientes extremos (Horikoshi y Bull, 2011).

### **2.1.1. Ambientes extremos salinos**

Cuando se habla de ambientes naturales extremos salinos, se hace referencia a sitios con saturación de cloruro de sodio (NaCl), y no a entornos con precipitados de otras sales o a las zonas contaminadas con desechos industriales que producen sales ácidas, oxisales, sales mixtas y el resto de productos que están categorizados como sales en la nomenclatura química.

Las investigaciones realizadas en diversos hábitats hipersalinos han descrito las características que estos entornos presentan, con esta información se ha logrado establecer una clasificación de estos ambientes extremos de acuerdo a la naturaleza de formación y los valores fisicoquímicos que acompañan la salinidad, es así que los lagos y cuerpos de agua hipersalinos se han catalogado en ambientes talasohalinos y ambientes atalasohalinos (Oren, 2002).

Los entornos talasohalinos se derivan de la evaporación de agua de mar, produciendo salmueras que contienen la misma composición iónica que hay en el mar en su etapa inicial de establecimiento, con pH que permanece entre 7-8. Cuando el agua de mar se deja evaporar en lagunas cerradas o en salmueras artificiales, hay una precipitación secuencial de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ), hasta que finalmente se alcanza la saturación de NaCl a concentraciones en donde la sal rebasa los 300 g /L y se precipita como halita (Horikoshi y Bull, 2011).

En México la Laguna ojo de liebre en Baja California Sur y la Laguna Cuyutlán en Colima, corresponden a lugares talasohalinos (CGM, 2013). Otro sitio que ha sido muy bien documentado es el Gran Lago Salado de Utah, originado a partir del remanente que actualmente quedo del lago prehistórico desaparecido Bonneville, que, aunque no existe conexión entre el Gran Lago Salado de Utah con el mar, el contenido iónico y mineral en sus aguas es similar al agua marina (Post, 1977; Stephens y Gillespie, 1976).

Los ambientes atalasohalinos destacan por presentar una composición iónica que puede variar significativamente con respecto al agua de mar. Podemos citar al Mar Muerto como un buen ejemplo de este tipo de hábitats, en donde la concentración iónica de sus salmueras está dominada por cationes divalentes, con cantidades de

Magnesio ( $Mg^{2+}$ ) casi 2 M y Calcio ( $Ca^{2+}$ ) 0.47 M que exceden las proporciones de Sodio ( $Na^+$ ) y Potasio ( $K^+$ ). En estos sitios el cloruro y el bromuro son los principales aniones, el sulfato es escaso, y el pH se mantiene cercano a 6 (Orieghi, 2013); estas condiciones lo vuelven un ambiente muy hostil, incluso para los mejores microorganismos mejor adaptados (Oren y Gurevich, 1995; Oren *et al.*, 1995).

En la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila en muchos manantiales las aguas son duras y contienen gran cantidad de sales de calcio y magnesio; la elevada dureza de las aguas se incrementa a partir de los manantiales (1100-1300 mg/L) hasta los ríos (1500-1700 mg/L). Los cationes dominantes, en orden de abundancia descendente son calcio, magnesio, sodio y potasio, mientras que los aniones son fuertemente dominados por los sulfatos, carbonatos y cloruros (La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2008). Aunque no se ha dicho abiertamente que existen entornos ataloshalinos en Cuatro Ciénegas, sus características se asemejan a las condiciones que existen en este tipo ambientes atalosalinos.

Los estanques salinos solares construidos artificialmente por las salineras en los litorales, mantienen sus valores fisicoquímicos constantes, y por lo tanto han representado ecosistemas de donde más información se ha recabado de los microorganismos halófilos, porque en estos entornos las comunidades microbianas proliferan con mejor gradiente, y a su vez se promueve una densidad poblacional estable que permite fortalecer la comprensión de la microbiología halófila. Por otra parte, existen ambientes inusuales a los que pocos se les ha prestado atención en su ecología, se puede nombrar a los suelos salinos a los productos de salmuera y salazón, a las plantas que crecen en áreas áridas y excretan sales en las glándulas de sus hojas que les sirve de refugio a los microorganismos para proliferar (Simon *et al.*, 1994; Qvit-Raz *et al.*, 2008), en fosas nasales de algunos animales que logran albergar interesantes comunidades de halófilos (Brito-Echeverría *et al.*, 2009).

Al existir variedad de ambientes salinos a distintas escalas, se deben invertir esfuerzos para entender el desempeño que realizan las comunidades de microorganismos halófilos y halotolerantes en su ambiente, para generar información que ayude a comprender el funcionamiento de los ecosistemas en México.

### **2.1.2. Formación de ambientes extremos salinos**

Los entornos salinos surgen mayormente por evaporación de agua marina, que involucran choques de moléculas de agua que precipitan las sales. Estos ambientes como cualquier otro ambiente son cambiantes, y para ser comprendidos se debe prestar suma atención a sus factores fisicoquímicos, mineralógicos, edafológicos y geológicos, y será en función a estos elementos que se podrá explicar la ubicación geográfica en la que actualmente se encuentra un ambiente extremo determinado, y avanzar en la reconstrucción de la historia geológica del lugar, lo que permitirá hacer aproximaciones de su edad para conocer los eventos que contribuyeron a la formación de este lugar hasta la fecha más actual.

Lo que necesita un ambiente para que adquiera un carácter evaporítico y se conserve es poseer los siguientes requisitos básicos, (1) un cuerpo de agua poco profundo y cerrado, de lo contrario la sal que se precipita no se concentrará en un mismo punto, y podría moverse o escaparse a otros afluentes, por lo tanto, la concentración de sal disminuirá. Por otra parte, se ha documentado que las zonas salinas están dentro de factores climáticos áridos y semiáridos. (2) El espacio de alojamiento de entorno salino debe estar sobre una depresión sedimentaria que no esté completamente llena o cubierta por otros sedimentos, (3) el suelo debe mantenerse compacto para que la sal que se precipita no pase al subsuelo, y solo por los pequeños poros disponibles el agua se escurra, lo que permitirá una mayor concentración salina (Warren, 2016).

El dinamismo geológico influye en la evolución de las evaporitas, en la etapa inicial, los manantiales salinos se mantienen activos en las penínsulas, pero al sufrir cambios de la etapa eogénica a la fase mesogénica la composición de sales cambia, y el agua donde se mantenían diluidas las sales se evaporan por completo y atraviesan más procesos termodinámicos hasta que esa sal se sedimenta en los estratos geológicos y por el surgimiento de nuevos terrenos (telogenético), los antiguos lugares que se encontraban en las penínsulas se elevan en sitios montañosos (Figura 3).

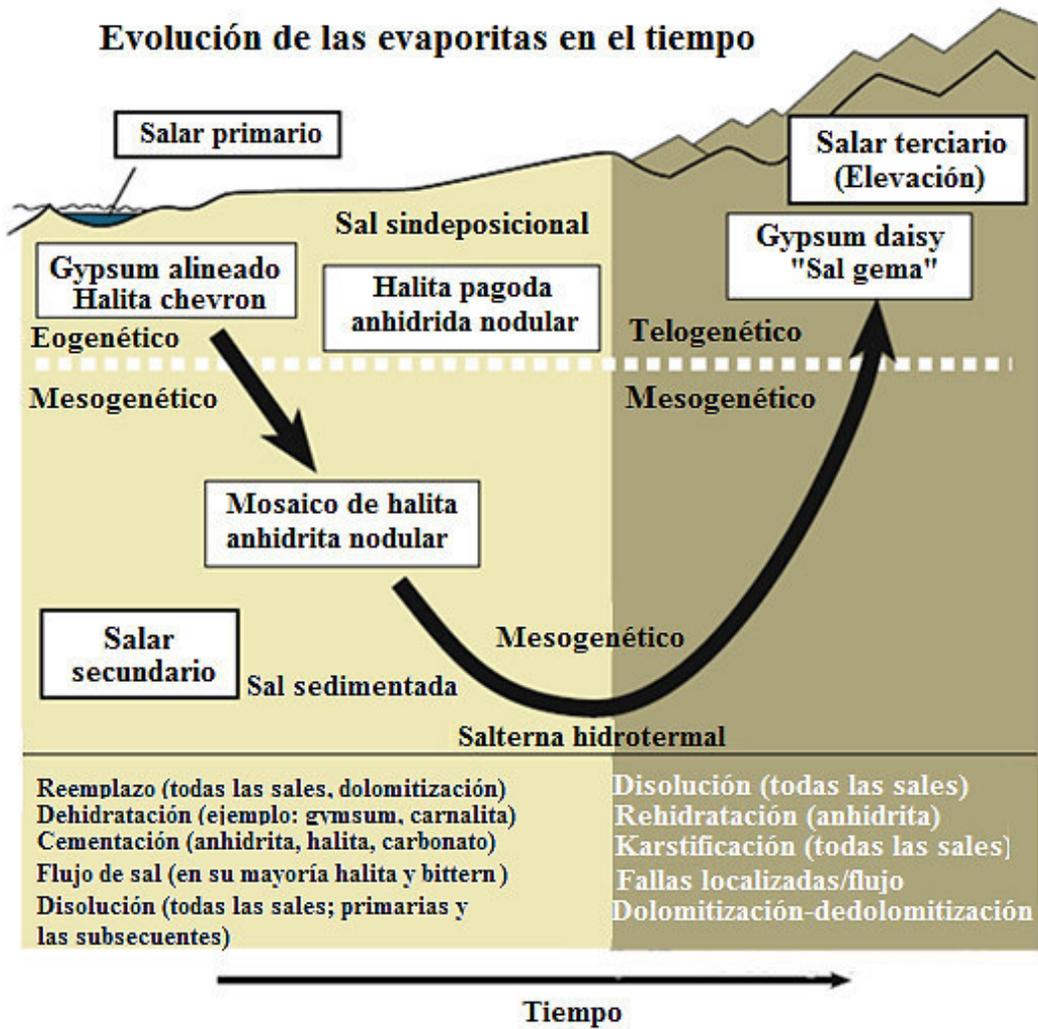


Figura 3. Evolución de las evaporitas a través del tiempo. Fuente: Warren, 2016.

### **2.1.3. Ambientes hipersalinos acuáticos en México**

En México existen grandes áreas salinas ubicadas en el interior del país, esto ha favorecido a que México ocupe el séptimo lugar en producción de sal y el primero en América latina (AMISAC, 2015), pero no todas estas áreas son aprovechadas en la industria salinera, solo se explotan las zonas en donde se generan grandes volúmenes de sal, y en las salineras que se extraen cantidades bajas de este mineral están limitadas a solo distribuir su producto en el mercado local, mientras que a otras áreas simplemente no se les presta atención. El desinterés a los lugares que no ofrecen volúmenes de sal para ser industrializada y su baja calidad para ser exportada, ha propiciado a que los sectores salineros nacionales no se preocupen en generar investigaciones que registren las características fisicoquímicas de este mineral en estos sitios, desconociendo con precisión si los ambientes que se han formado dentro del país poseen salinidad suficiente para ser considerados hipersalinos.

La coordinación general de minería (CGM) mexicana en su informe de perfil de mercado de la sal (2013), menciona los sitios principales de extracción de sal en el país y su localización geográfica (Figura 4). La mayor parte de la sal que se produce en México es por evaporación solar (sal marina), este tipo de sal se cosecha a lo largo de los litorales del Golfo de México y del Océano Pacífico. También se produce sal gema utilizando salmueras subterráneas que son evaporadas al alto vacío en regiones de Veracruz y Nuevo León. De igual forma se obtiene sal de lagunas solares como la Laguna del Rey en Coahuila, Laguna del Jaco en Chihuahua y Laguna de Santa María en San Luis Potosí (AMISAC, 2015).

A partir de los datos proporcionados por La Coordinación General de Minería Mexicana (2013), en la formación geológica y la naturaleza de depósito de sal de algunas salineras, se proponen ambientes hipersalinos en México, lugares que se mencionan más adelante en este capítulo.

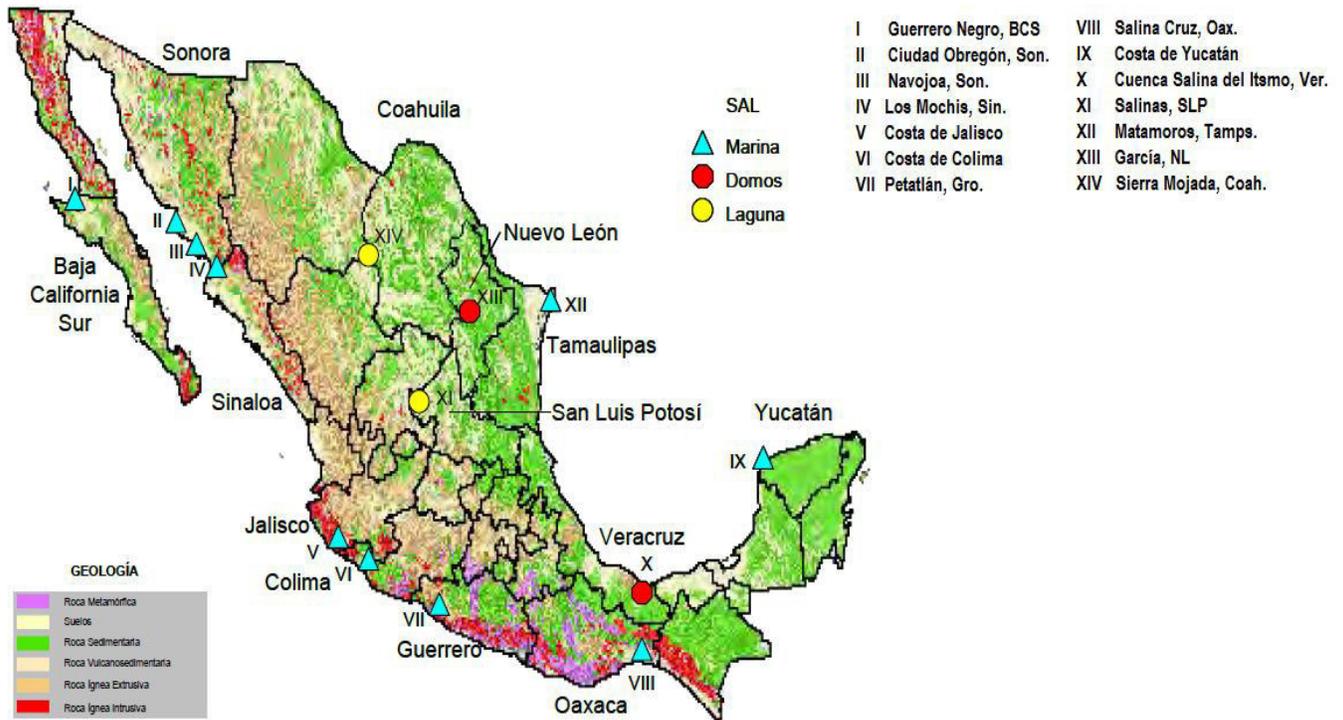


Figura 4. Principales ambientes salinos explotados por la industria salinera mexicana. Fuente: Coordinación General de Minería Mexicana (CGM), 2013.

### 2.1.3.1. Ambientes Salinos en Chiapas

Aunque Chiapas no figura como un productor potencial de sal, han existido áreas salinas de donde se ha practicado la extracción sal como actividad económica. En los Altos de Chiapas surgieron varios manantiales de salmuera procedentes de domos salinos subterráneos, pero en su mayoría han ido desapareciendo. En la Concordia la zona salinera se extendía de sureste a noroeste al pie de las montañas compuestas de los estratos continentales del Mesozoico inferior, desde Portatengo hasta Santa Lucía, y la extracción de sal en esta zona se conseguía por evaporación solar, pero éstas salinas quedaron inactivas por la invasión de aguas que causo la construcción de la presa la Angostura. También se ha sugerido que existen rezagos de otras salinas en el llamado Valle de los Custepeques en la Sierra Madre (Müllerried, 1957).

Recientemente en la comunidad de Ignacio Ramírez en Tonalá (Periódico Eje Central, 2017) se está comenzando a producir sal por evaporación solar, la única

salmuera aprovechada actualmente en el estado con técnicas artesanales vigente es en Ixtapa, aún mantienen esta tradición salinera en la localidad “Las Salinas”, a pesar de que en Chenalhó lo practicaron, pero ya no constituye parte de su actividad productiva. Esta técnica artesanal de sal consiste en evaporar el agua por cocimiento en hornos de barro hasta que la sal queda en los recipientes (Hernández, 2013).

El manantial de Ixtapa está constituido por lecho profundo, que mantiene una saturación de sal, que es aprovechada por las familias de esta localidad para trabajar la sal. El origen del manantial y los factores que le permiten almacenar una saturación de sal a 1140 msnm aún no han sido estudiados, pero el que esté ubicado a un costado del cauce de un arroyo de agua salobre, nos proporciona una clave para plantear un modelo especulativo de como ocurre el acarreo de agua y sal que provee al manantial esta solución salina.

En la Figura 5, se propone que el manantial se surte de agua subterránea que se filtra del Río La Salina y otras fuentes acuíferas (cuencas endorreicas) que disuelven la sal de los depósitos estuarinos. Custodio y Llamas (1996), señalan que el agua salina de los manantiales debe provenir de sitios cercanos de donde se tiene el registro de estos manantiales, debido que, al desplazarse el agua por la corriente, el agua se va lavando y va perdiendo la sal. Los depósitos estuarinos de donde se ubica el manantial, en un pasado geológico se sedimentaron en los estratos del Mioceno medio y tardío por la invasión de agua marina en la región de las montañas del norte (Figura 6).

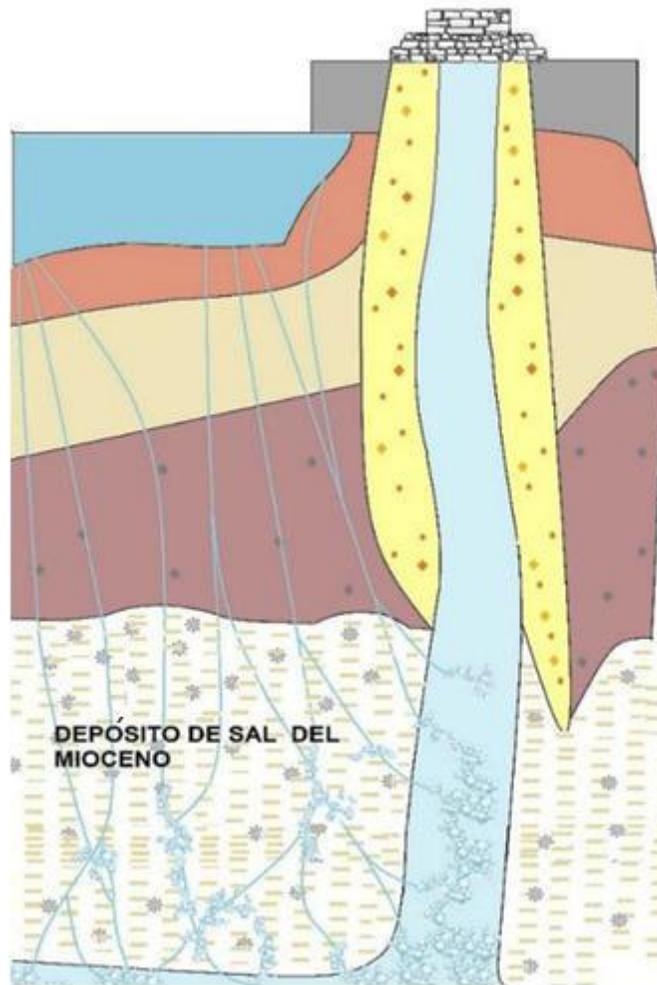


Figura 5. Modelo hipotético del transporte de agua salina en el manantial Las Salinas, Ixtapa.  
Fuente: Ruiz-Ríos, 2019.

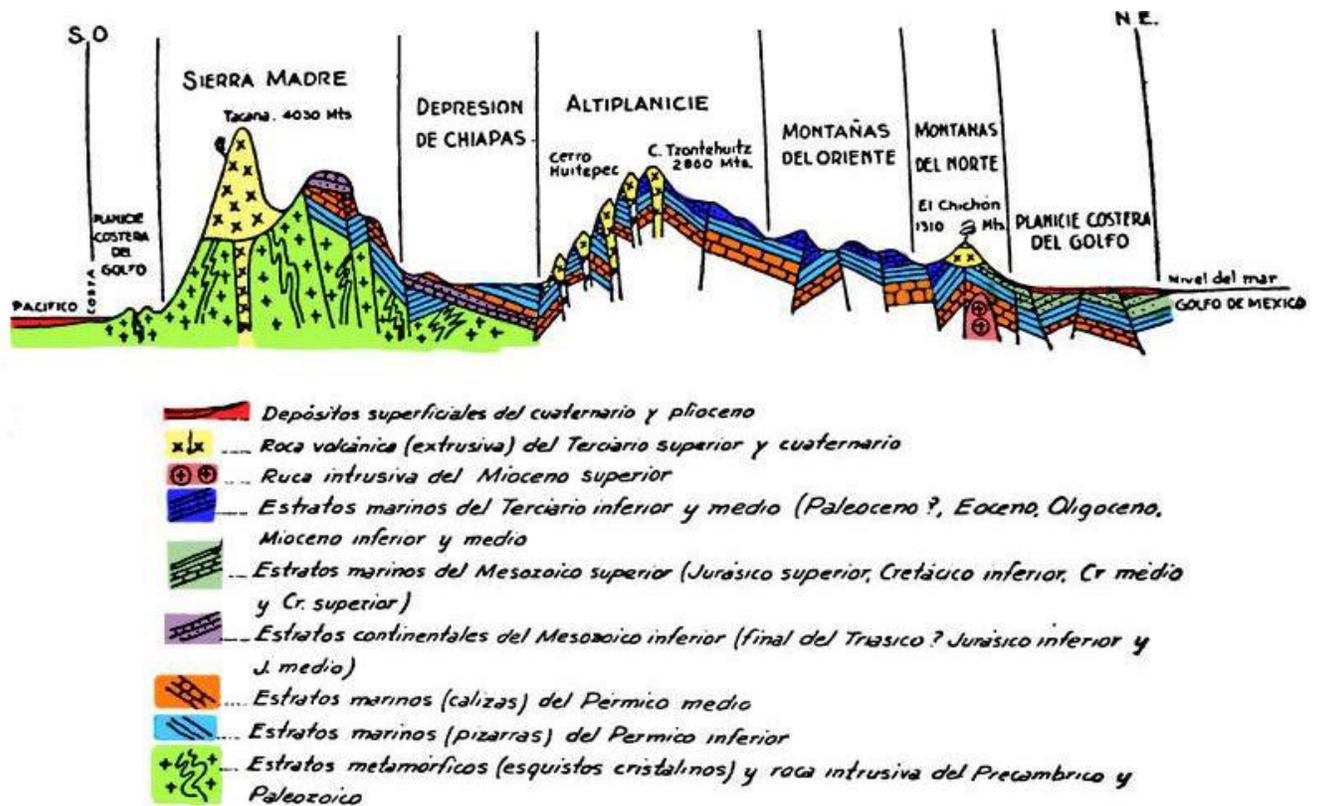


Figura 6. Perfil Geológico esquemático de Chiapas de suroeste a noreste. Fuente: Müllerried, 1957.

## 2. 2. Microorganismos extremófilos

La diversidad de ambientes extremos aloja organismos extremófilos que no sólo sobreviven bajo estas condiciones extremas y hostiles, sino que además prosperan en estos ambientes (Cavicchioli, 2002). “Ambiente extremo” es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otros (Ramírez *et al.*, 2006).

Los microorganismos extremófilos han desarrollado adaptaciones para crecer eficazmente dentro de escalas y concentraciones ambientales extremas. El término “extremófilo” fue propuesto por primera vez en 1974 por MacElroy, para referirse a los organismos que prosperan bajo condiciones dentro de zonas que desde una visión antropocéntrica son áreas hostiles e inhabitables. Existe una amplia diversidad de microorganismos que habitan áreas extremas, con capacidad de tolerar y crecer en

esas condiciones, y por este hecho se piensa que son auténticos extremófilos, pero el desarrollo de estos microorganismos es sobre una tensión ambiental que les limita sus funciones biológicas, estos microorganismos no son propiamente extremófilos, sino más bien han sido definidos como extremótrofos (Muller *et al.*, 2005).

Los microorganismos que son extremófilos y extremótrofos se han clasificados bajo el factor principal al que se enfrentan y con el que lidian para sobrevivir. Dependiendo en la medida en que los microorganismos se vean obligados a ejercer al límite sus facultades para resistir ante un factor, serán denominados moderados, extremófilos, hiperextremófilos, o extremófilos obligados si un factor extremo es esencial para su subsistencia.

A continuación, se enlistan los tipos de extremofilia que han sido descritas en el libro Extremófilos de Hirokoshi *et al.* (2011).

- Acidófilo: organismo que crece óptimamente en un pH con valores de 3 a 4.
- Alcalófilo: organismo que crece óptimamente con valores de pH por encima de 10.
- Endólito: organismo que habita dentro de las rocas.
- Halófilo: organismo que requiere de al menos de 1 M de sal para crecer.
- Hipertermófilo: organismo que crece a una temperatura ideal de 80 °C o más.
- Hipófilo: organismo que vive dentro de las rocas de los desiertos fríos.
- Metalotolerante: organismo capaz de tolerar altos niveles de metales pesados, tales como el cobre, cadmio, arsénico y zinc.
- Oligótrofo: organismo capaz de crecer en sitios en donde los nutrientes son escasos.
- Barófilo: organismo que vive óptimamente a una presión hidrostática de 40 MPa o más.
- Sicrófilo: organismo que crece bajo una temperatura de 10 °C o menor y la máxima temperatura que tolera es de 20 °C.
- Radioresistente: organismo que resiste los altos niveles de radiación ionizante.
- Termófilo: organismo que crece entre los 60 °C y 85 °C.
- Toxicotolerante: organismo capaz de soportar altos niveles de agentes dañinos, tales como disolventes orgánicos.

- Xerófilo: organismo capaz de crecer con poca agua y resistente ante altas desecaciones.
- Muchos extremófilos pueden estar incluidos en más de una categoría.

Muchas veces se tiene la idea simplista de considerar que los extremófilos solo son capaces de sobrevivir a una condición extrema de un ambiente extremo (Harrison *et al.*, 2013), pero se han descrito un número considerable de especies de los tres dominios de vida que han sido aisladas de estos entornos, con capacidad para tolerar múltiples condiciones extremas, permaneciendo en donde el pH, la presión, la temperatura, la radiación, la salinidad son muy elevadas o de carácter muy variable, estos microorganismos resisten ante una poliextremofilia (Seckbach *et al.*, 2013).

La poliextremofilia y poliextremotrofia consiste en la adaptación a la combinación de condiciones extremas, y en la mayoría de los ambientes hipersalinos se pone en marcha esta múltiple resistencia, debido a que la concentración elevada de sal no es el única responsable de causar estrés para desencadenar adaptación en los microorganismos, existe alcalinidad, acidez y temperaturas frías o calientes en los lagos y suelos hipersalinos, encargados de seleccionar la microbiota de estos sitios (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Aunque las influencias que causa un factor predominante de un ambiente extremo en los extremófilos han sido mejor descritas, se ha comentado que en la poliextremofilia los microorganismos participan en eventos claves dentro de los ciclos biogeoquímicos, pero si bien, los intentos por definir lo que sucede en las influencias colectivas han sido escasas, se están comenzando a entender los mecanismos de la evolución y adaptación que subyacen en los extremófilos ante múltiples factores extremos (Bakermans, 2015).

### **2.2.1. Bacterias en ambientes extremos salinos**

Los seres vivos responden de distinta manera a las fuerzas que el medio salino ejerce sobre ellos, los organismos que sobreviven a diferentes concentraciones de sal son llamados halotolerantes, y los que requieren de cloruro de sodio (NaCl) para su crecimiento y desarrollo se conocen como halófilos. Los organismos halófilos y halotolerantes son encontrados en los tres dominios de la vida: Archea, Bacteria y Eukarya.

De acuerdo a Kushner (1993), los halófilos pueden dividirse en cinco grupos basándonos en la sal que requieren para su crecimiento: el primer grupo incluye a organismos que no sobreviven a más del 1% de NaCl, otro grupo tolera el NaCl de 1-3%, otros organismos conocidos como halófilos moderados requieren NaCl en cantidades del 3-15%. Los extremófilos halófilos necesitan del 9-23% de NaCl para crecer, y los extremófilos hiperhalófilos requieren de 15-32% de NaCl (Ali *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos microorganismos no halófilos son competentes de tolerar altas concentraciones de NaCl y se definen como organismos halótolerantes o tolerantes extremos (Kushner y Kamekura, 1988).

### **2.2.2. Fisiología: osmoregulación de bacterias en ambientes extremos salinos**

Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos.

Con respecto a los fosfolípidos, a medida que aumenta la salinidad, la membrana se enriquece en fosfatidilglicerol y/o en di-fosfatidilglicerol (cardiolipina), fosfolípidos cargados negativamente, a costa de una disminución en la fosfatidiletanolamina (PE), un fosfolípido neutro. Estas modificaciones en la composición de lípidos polares aportan consistencia a la membrana, a la vez que son necesarios para mantener la estructura de doble capa lipídica (Russel, 1993), ya que

la PE, en respuesta a la salinidad, tiende a formar fases en una única capa (Ramírez *et al.*, 2004).

Una característica de las proteínas de las bacterias halófilas es que para poder acumular KCl en el equilibrio osmótico su naturaleza es altamente ácida, con exceso de aminoácidos ácidos (glutamato, aspartato) sobre aminoácidos básicos (lisina, arginina). Tales proteínas están altamente cargadas negativamente en comparación con sus equivalentes no halófilos. Además, las proteínas halófilas generalmente tienen un bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Lanyi, 1974).

El resultado de estas modificaciones de proteínas es que la presencia constante de concentraciones molares de sales es necesaria para mantener las proteínas en su forma nativa y activa; la dilución de la sal conduce al desdoblamiento y desnaturalización. Por lo tanto, Los microorganismos que usan la estrategia de "*salt-in*" son generalmente halófilos obligados con poca flexibilidad con respecto al rango de concentración de sal que permite el crecimiento (Figura 7B) y se han adaptado a que las altas concentraciones de salinidad sean constantes (Horikoshi y Bull, 2011).

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana también experimenta modificaciones con respecto a la temperatura y la salinidad, siendo estos diferentes en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Así, en bacterias halófilas moderadas Gram-negativas, el cambio más destacable es un aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos, a costa de los insaturados, de los cuales derivan. Este efecto se ha descrito en *Pseudomonas halosaccarolytica* (Monteoliva *et al.*, 1993), *H. halmophila* (Monteoliva *et al.* 1988), *H. canadiensis* (Adams, 1988), *H. salina* (Valderrama, 1998) y *Chromohalobacter salexigens*. La transformación de ácidos grasos insaturados en ciclopropánicos proporcionaría a la célula una disminución en la fluidez de la membrana, contribuyendo así a mantener la integridad de la misma (Russel, 1993).

Para lidiar con el estrés osmótico que las elevadas concentraciones de sal provocan, las bacterias halófilas y halótolerantes expulsan el cloruro de sodio constantemente del citoplasma y producen osmolitos en su interior celular (Roberts, 2004). Todos los halófilos producen antiportes de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  que remueven a  $\text{Na}^+$  iones alojado en la zona intracelular (Obis *et al.*, 1999).

Para lograr compensar la presión osmótica en el citoplasma sus células ejercen mecanismos que contrarresten la alta presión osmótica del medio externo, con compuestos acumulados iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación. El primero de ellos, denominado mecanismo "*salt-in*" es típico de Archeas y Haloanaerobiales (bacterias halófilas moderadas y anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Figura 7B).

El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas (Dennis y Shimmin, 1997). Esto determina que los organismos que utilizan este mecanismo tengan una limitada capacidad para adaptarse a los cambios en la osmolaridad del medio, por lo que su crecimiento se restringe a ambientes con concentraciones salinas muy elevadas (Oren, 1999).

La ventaja de usar la estrategia de "*salt-out*" para la adaptación osmótica es que es energéticamente más barato que biosíntesis de concentraciones molares de solutos osmóticos orgánicos, observando que microorganismos que utilizan esta última estrategia también bombean los iones de sodio (Oren, 1999).

El segundo mecanismo, conocido como "*salt out*", lo utilizan las bacterias halófilas como no halófilas y las arqueas metanógenas halófilas moderadas (Figura 7C). Este mecanismo es más flexible pero su uso es más costoso energéticamente, debido a que deben sintetizar solutos orgánicos de pesos moleculares bajos. Estos solutos les proveen equilibrio osmótico que las macromoléculas no ofrecen en estos ambientes. Los solutos compatibles más destacados para que estas bacterias toleren permanecer en estos entornos son glicerol, glicina betaína y ectoína.

Así, estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles (Brown, 1976). Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones a la presión osmótica del medio.

Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede por ejemplo cuando las

bacterias se cultivan en un medio mínimo (Galinski, 1995). Dado el ahorro de energía que supone para la célula, el transporte es preferido a la síntesis “de novo” (Oren, 1999).

Los osmoprotectores incorporados desde el medio externo son acumulados junto con los producidos por la célula, o bien pueden reemplazarlos totalmente. A su vez, existen canales proteicos que responden frente a un choque hipo-osmótico, diferentes a los sistemas de transporte, que funcionan como válvulas de seguridad, permitiendo la expulsión de los solutos compatibles acumulados (Wood *et al.*, 2001). La mayor flexibilidad y versatilidad de este mecanismo explica el hecho de que se encuentre mucho más extendido en la naturaleza, habiéndose observado también en hongos, plantas y animales, incluso en células humanas (Ventosa *et al.*, 1998).

Los solutos compatibles son moléculas polares sencillas, altamente solubles y sin carga, o bien con carga neta neutra a pH fisiológico, con capacidad estabilizadora de proteínas frente al calor, la desecación o la congelación (Galinski y Louis, 1998). Estos efectos beneficiosos se basan en el modelo de “exclusión preferencial”. Según dicho modelo, los solutos compatibles quedarían excluidos de la primera capa de hidratación de las proteínas, lo que daría lugar a una hidratación preferencial de la superficie de las mismas, disminuyendo así el volumen que ocupan y estabilizando su estructura.

Las bacterias que no han desarrollado estos mecanismos para tolerar altas concentraciones de sal, sufren daño en sus estructuras celulares. En la figura 7A los microorganismos no adaptados a la saturación de sal, el agua se mueve hacia fuera de la célula, lo que provoca que en el citoplasma se concentre más y se pierda la estructura y función biológica de las macromoléculas (graficado por la línea irregular de la imagen)

A) Macromoléculas de Bacterias no-halófilas comprometidas. Plasmólisis

B) Halófilas extremas utilizando estrategia de *salt-in*

C) Síntesis de productos orgánicos compatibles con los solutos del medio externo en halófilas moderadas

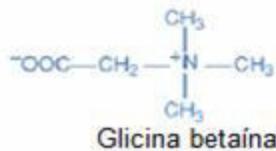
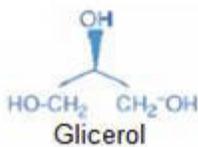
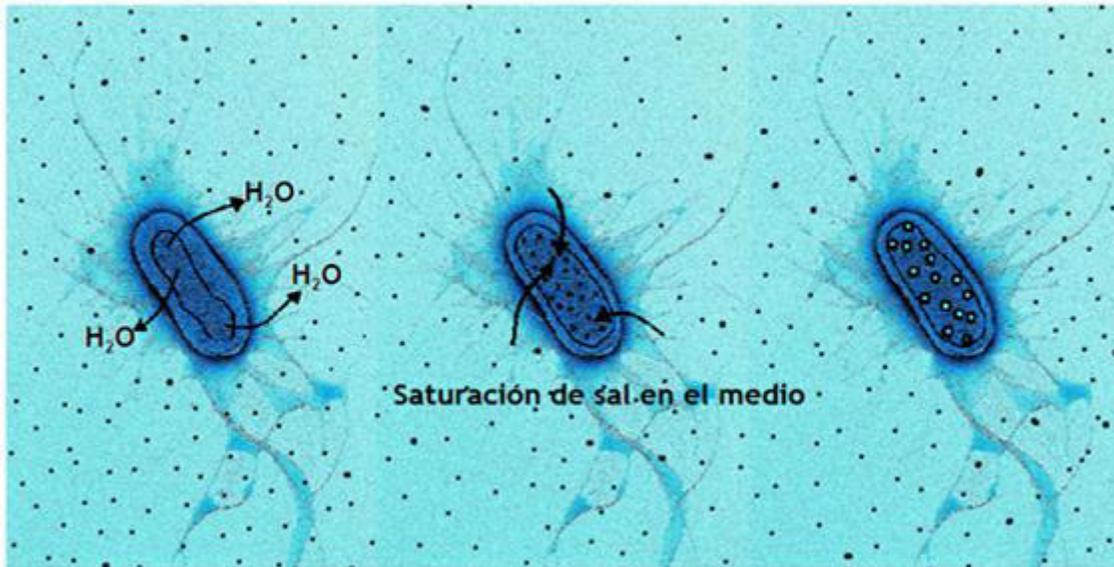


Figura 7. Representación esquemática de los diferentes comportamientos en las bacterias dentro de ambientes hipersalinos. Fuente: Belle, 2008. Adaptación de la figura original.

### 2.2.3. Extremoenzimas en halófilos

A pesar de que la producción industrial enzimática de microorganismos halófilos es poco explotada, estas extremoenzimas tienen la ventaja de catalizar reacciones bajo condiciones extremas, principalmente en procesos que requieren altas concentraciones de sal, pero también son capaces de ser estables a pH alcalino y en procesos termoestables (Enache y Kamekura, 2010).

Estas propiedades permiten su uso en procesos industriales que son realizados bajo condiciones fisicoquímicas limitantes, por ellos estas enzimas son muy atractivas por su capacidad para catalizar reacciones en disolventes orgánicos (Setati 2009; Oren, 2010).

Las hidrolasas agrupadas en amilasas, pectinasas, pululanasa, ADNasas, xilanasas, lipasas, celulasas, inulinasas, son el principal grupo de enzimas producidas por los microorganismos halófilos (Cuadro 1) (Cojoc *et al.*, 2009; Rohban *et al.*, 2009; Enache y Kamekura, 2010).

Por otra parte, estas enzimas también tienen el potencial para ser aplicadas como agentes saborizantes, en la industria de la pulpa, en la del papel, la formulación de detergentes, aceite de pescado entre una gama de aplicaciones (Kamekura y Onishi, 1974, Karan *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Registro de hidrolasas producidas por múltiples bacterias halófilas y su aplicación industrial. Fuente: Delgado-García, 2011 y Karan *et al.*, 2012.

<b>Enzima</b>	<b>Ejemplos de microorganismos</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Amilasas</b>	<i>Haloferax mediterranei</i> , <i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Nesterenkinia halobia</i> , <i>Halomonas meridiana</i> , <i>Halobacillus</i> sp.	Sacarificación marina de microalgas, hidrólisis de almidón y textiles, alimentos, elaboración de cerveza y destilación.
<b>Proteasas</b>	<i>Bacillus</i> sp, <i>Halobacillus</i> sp, <i>Virgibacillus</i> sp, <i>Natrialba magadii</i> ,	Síntesis de péptidos, preparación de salsa de pescado, formulaciones de detergentes.
<b>Lipasas</b>	<i>Salinivibrio</i> sp, <i>Natrococcus</i> sp.	Detergentes, aditivos en la comida y en la industria del papel, biocatálisis selectiva.
<b>Xilanasas</b>	<i>Halobacillus</i> sp, <i>Bacillus pumilus</i>	Industria de la pulpa y el papel, en la alimenticia industria para aumentar el volumen de horneados.

<b>DNasa</b>	<i>Micrococcus varians</i> , <i>Bacillus sp.</i>	Ácido 5'-guanílico y ácido 5'-inosínico como agentes de sabor.
<b>Celulasas y pulanasas</b>	<i>Bacillus sp.</i>	Biocatálisis en solventes orgánicos y fluidos supercríticos.
<b>Quitinasas</b>	<i>Halobacterium salinaru</i> , <i>Planococcus riftoensis</i> .	Síntesis de oligosacáridos, bioconversión para el tratamiento de basura quitinosa de los peces, cangrejos y camarones.

Ahora bien, como ya se comentó con anterioridad, las bacterias halófilas han desarrollado dos mecanismos básicos diferentes para lograr un equilibrio osmótico, por lo tanto, la adaptación halófila incluye diferentes mecanismos a nivel estructural y funcional para superar el efecto que la saturación de sal provoca en los microorganismos no halófilos (Madern *et al.*, 2000; Joo y Kim, 2005), y de ahí el comportamiento de sus proteínas y el interés por el potencial de sus enzimas.

Diferentes estudios cristalográficos de purificación de proteínas halófilas han llevado a comprender su capacidad de osmorregulación y otras características únicas (Detkova y Boltyanskaya, 2007).

En cuanto a la superficie de las enzimas halófilas, dos diferencias importantes han sido descritas en los estudios cristalográficos. Por un lado, el exceso de aminoácidos ácidos en la superficie de la enzima, contribuye a la formación de una capa hidratada, responsable de la estabilidad (Sinha y Khare, 2014; Graziano y Merlino 2014) y, por otro lado, el bajo número de residuos hidrofóbicos encontrados en la superficie (Sigliocco *et al.*, 2011).

Los residuos ácidos establecen puentes de sal con los residuos básicos que se distribuyen entre las enzimas (Lanyi 1974, Eisenberg *et al.*, 1992; Danson y Hough,

1997; Madern *et al.* 2000; Detkova y Boltyanskaya, 2007; Bonete y Martínez-Espinosa, 2011; Sinha y Khare, 2013).

Oren (2013) revisó los proteomas de halófilos con el fin de aclarar las diferentes estrategias de adaptación que han desarrollado este grupo de microorganismos.

El mecanismo de halófilos extremos requiere de altas concentraciones de sal para mantener su actividad; estas concentraciones alcanzan valores altos de 2-4 M de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>, aunque existen excepciones.

Estas proteínas no solo requieren altas concentraciones de sal para estar activas, sino que también necesitan estas concentraciones elevadas de NaCl para mantener su estabilidad, para evitar que la mayoría de estas proteínas se desnaturalicen en soluciones con un menor contenido de 1.2 M de NaCl. Además, estas proteínas presentan una alta cantidad de ácido glutámico, debido a que este aminoácido tiene una alta capacidad para hidratarse.

*Salinibacter ruber* a pesar de ser clasificado como un halófilo extremo, no en todas sus enzimas tienen el desempeño es el mismo, y ese comportamiento distintivo de cada proteína explica la funcionalidad y comportamiento que tiene la proteína a diferentes concentraciones de sal.

En un estudio enfocado a la actividad enzimática de *S. ruber* la isocitrato deshidrogenasa, la sintetasa de ácidos grasos y la glucosa-6-P-deshidrogenasa mostraron un comportamiento similar siempre y cuando se mantuvieran en concentraciones elevadas de sal, para permanecer activas (Oren y Mana 2002; Oren *et al.*, 2003), sin embargo, otras enzimas caracterizadas de *S. ruber* se mantienen activas tanto en ausencia como en presencia de sal como la isocitrato dehidrogenasa (Oren y Mana, 2002) y glicerol quinasa (Sher *et al.*, 2004).

En conclusión, los mecanismos de adaptación a la saturación de sal por las enzimas de halófilos extremos son diferentes a los de las enzimas de halófilos moderados. Mientras las enzimas de halófilos extremos tienen que resistir altas concentraciones de sal tanto dentro (citoplasma) y en el medio extracelular, las enzimas de halófilos moderados están en contacto con bajas concentraciones de sal en el citoplasma y el NaCl va en aumento en el medio extracelular, por lo que deben adaptarse a estos cambios de salinidad.

### 2.3. Ecología de bacterias en ambientes extremos salinos

Las bacterias suelen evolucionar en consorcios, los grupos heterogéneos microbianos constituyen las unidades responsables de la selección del hábitat, y posiblemente representen las verdaderas unidades de evolución a nivel microbiano (Sheng *et al.*, 2014). Para entender los mecanismos que ocurren en la adaptación de los taxones específicos se debe estudiar a las bacterias a nivel comunitario. Dentro de las competencias y cooperaciones comunitarias en la percepción quorum (SQ) se regula la colonización microbiana de un nicho. La autoinducción quorum es responsable de expresar genes necesarios en las bacterias halófilas que las hacen capaces de prosperar en condiciones de hipersalinidad (Abbamondi *et al.*, 2014).

El sistema AHL-QS parece ser uno de los principales involucrados en la selección de halobacterias colonizadoras, este sistema ha sido reportado en la mayoría de las especies de la Familia Halomonadaceae (Tahrioui *et al.*, 2013). La producción de AHL fue descrita por primera vez en la fase de crecimiento de *Halomonas* productoras N-acil homoserina lactona (*H. maura*, *H. eurihalina*, *H. ventosae* y *H. anticariensis*). Estos resultados han servido para plantear que el sistema AHL-SQ está implicado en la síntesis de exopolisacáridos (EPS) que sirven para formar biofilms en las comunidades (Llamas *et al.*, 2005).

Este sistema AHL-QS en *H. anticariensis* funciona con los genes *hanI* y *hanR* con un comportamiento homólogo a los genes *luxR*/*luxI* en la producción de luciferasa. El gen encargado de regular es *hanR*, mientras que el gen *hanI* sintetiza el AHL (Tahrioui *et al.*, 2011).

Los autoinductores involucrados en el sistema QS en halobacterias han sido investigados utilizando a la bacteria halófila moderada *Halobacillus halophilus* como modelo de estudio para evaluar su comportamiento frente a distintas concentraciones de sal. *Halobacillus halophilus* posee un gen regulón homólogo a LuxS que se ajusta de acuerdo a la salinidad del medio externo (Sewald *et al.*, 2007). En parámetros moderados de salinidad *H. halophilus* acumula principalmente glutamina y glutamato para ajustar la turgencia. Al someterse a salinidades mayores se transcribe el gen *glnA2* para codificar glutamina sintetasa, y a partir de ese momento deja la estrategia

osmolita y comienza a producir prolina, este aminoácido es el principal soluto compatible y funcional en altas concentraciones de sal.

La participación del glutamato como “segundo mensajero” es indispensable en la producción de prolina. (Figura 8). Conforme la fase exponencial avanza hacia la fase estacionaria *H. halophilus* modifica su estrategia osmolita y se genera un cambio, se deja de producir prolina y se comienza a elaborar ectoína.

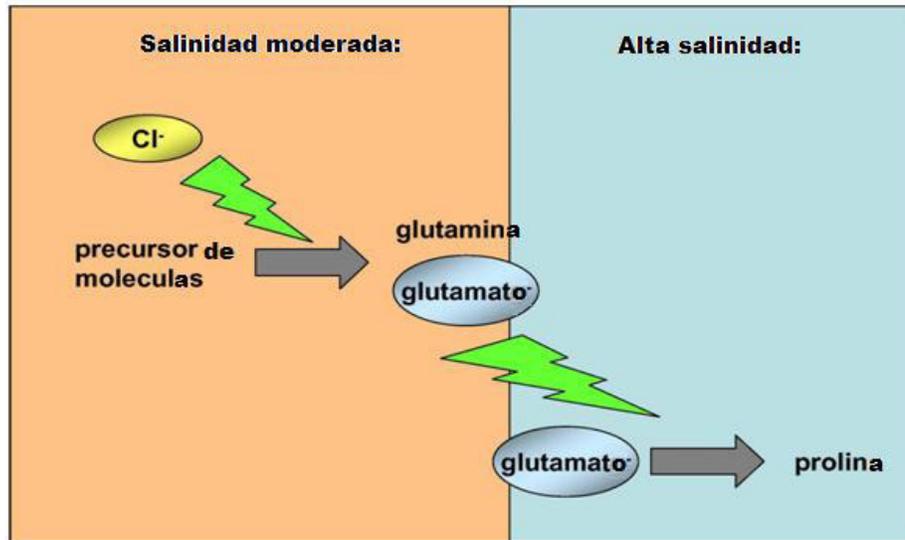


Figura 8. Acción mensajera de glutamato en el reconocimiento de cambio de salinidades para activar autoinductores involucrados en el sistema QS de *H. halophilus*. Fuente: Saum y Müller, 2008.

### 2.3.1. Factores responsables del declive

Datos experimentales atribuyen que entre los factores que conducen al declive de bacterias halófilas se encuentran el pastoreo por protistas, la lisis que provoca la invasión de bacteriófagos y la producción de halocinas que utilizan los procariontes para competir por espacio y alimento.

De acuerdo a un análisis realizado en evaporitas españolas con diferentes gradientes de sal, se describió que la red trófica microbiana en los estanques estaba compuesta por depredadores eucariotas, las poblaciones de bacterias eran atacadas por protozoos flagelados, ciliados y ameboides. Conforme iba en aumento la saturación de sal los depredadores eucariotas comenzaron a mermar (Pedro's-Alio' *et al.*, 2000a, 2000b; Gasol *et al.*, 2004).

En salinidades elevadas la lisis vírica probablemente provoque la pérdida de comunidades procariotas, sin embargo, en algunos salares se ha estimado que la pérdida procariótica diaria por virus no supera el 5%. Los virus no siempre ejercen un fuerte control en las poblaciones procarióticas, esta causa ira variando en cada ambiente hipersalino (Guixa-Boixareu *et al.*, 1996).

La producción de halocinas, un tipo de bacteriocinas de la familia Halobacteriaceae (Rodriguez-Valera *et al.*, 1982) logra inhibir a otros miembros procariotas que intenten colonizar y aprovechar recursos de estos ambientes extremos. Las halocinas podrían ser un factor principal, ya que se unen a la membrana celular alterando su permeabilidad y su equilibrio iónico, produciendo finalmente la muerte celular

### **2.3.2. Biogeografía**

En salmueras españolas Papke *et al.* (2007) monitorearon cepas de *Halorubrum* y encontraron que su tasa de mutación supera la de migración, sin embargo, cada especie halófila tiene sus propios mecanismos de dispersión, estas tasas están sujetas a variar en la frecuencia en que sucedan los mecanismos de dispersión. A continuación, se mencionan métodos que contribuyen a la dispersión.

Dentro de los medios que utilizan los halófilos se ha visto que las corrientes marinas transportan halófilos en varios litorales, pero en áreas cerradas esto no es posible. Generalmente en los ambientes en donde sucede esto la sobresaturación de sal propicia alojar halófilos extremos, que bajo esta condición de hipersalinidad se forma halita mientras se cristaliza la cobertura de la superficie de los ambientes acuáticos, en esta cristalización varias procariotas pueden permanecer viables dentro de estos cristales, de forma azarosa estos cristales pueden ser dispersados por aves, mosquitos o por el viento, lo que permite que estas bacterias puedan colonizar nuevos nichos hipersalinos. Los reportes que se tienen a nivel global en la distribución de *Salinibacter ruber* y *Haloquadratum walsbyi* apoyan la dispersión por estos medios (McGenity y Oren, 2012).

Hay que tomar en cuenta que cada año millones de toneladas de sal de roca se remueven por movimientos geotérmicos y por actividades antropogénicas en la extracción de este mineral. Estas actividades y el flujo de salmueras derivadas de evaporitas remueven halófilos que se encontraban aislados en depósitos subterráneos que habían permanecido almacenados en estratos de distintas edades geológicas, el funcionamiento en el comercio de sal en las redes mundiales contribuye a que estas halobacterias dentro de los cristales lleguen a ocupar nuevas áreas geográficas, que de no ser por este manejo antropogénico, probablemente no llegarían a establecerse por medios convencionales en nuevas áreas tan distantes de su centro de origen.

### 2.3.3. Ciclos biogeoquímicos

La mayor parte de los grupos fisiológicos incluyendo quimioheterótrofos anaeróbicos, fotoautótrofos, fotoheterótrofos y quimiolitótrofos se pueden encontrar dentro de las bacterias halófilas. Sin embargo, existen procesos en ambientes que se desarrollan con éxito en bajas salinidades, pero no logran funcionar de igual manera en entornos hipersalinos (McGenety y Oren, 2012) (Figura 9).

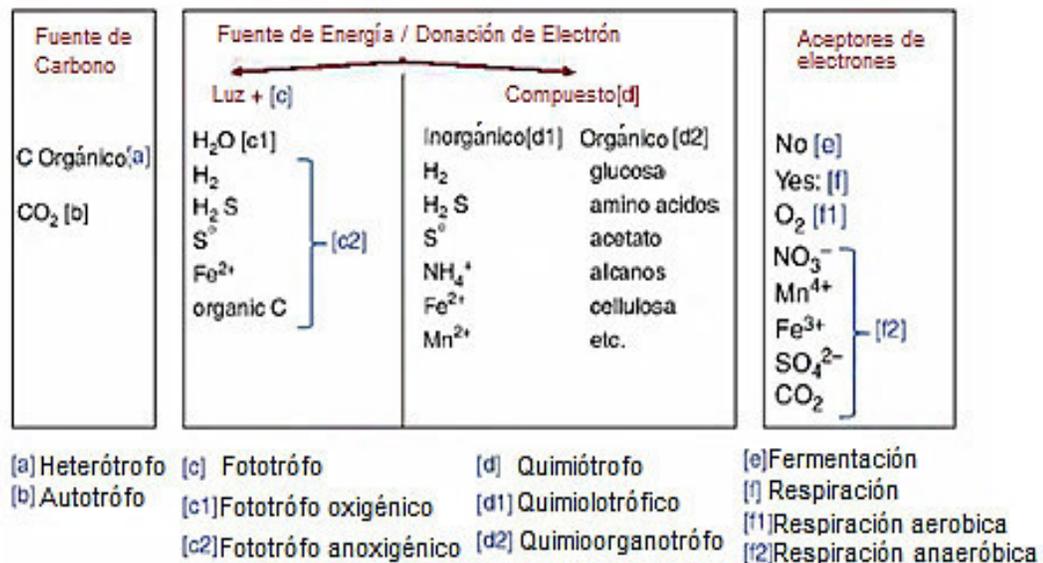


Figura 9. Metabolismos utilizados por halobacterias. Fuente: McGenety y Oren, 2012.

La adaptación osmótica y la vida dentro de altas concentraciones de sal son energéticamente costosas, por ello la elección del modelo bioenergético

oxidación/reducción en la compatibilidad de solutos en estos ambientes se ve limitado a la concentración de cloruro de sodio (Figura 11), bajo la cual las halobacterias estén llevando a cabo sus funciones metabólicas (Oren, 1999b., 2011).

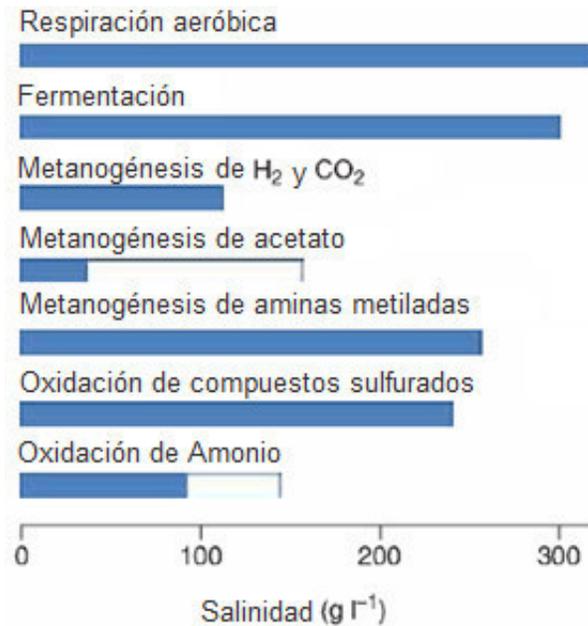


Figura 10. Eficiencia de los distintos procesos metabólicos a diferentes niveles de salinidad. Se ha documentado que algunos miembros de Halanaerobiaceae crecen mejor en altas salinidades por la estrategia *salt-in*. Fuente: McGenety y Oren, 2012.

La energía que se obtienen en la oxidación de sustratos con amoníaco y nitrito es muy baja, en cambio, la reducción de sulfuro, azufre y arsenito provee mayor rendimiento energético por mol de electrones que se transfieren a las moléculas de oxígeno, manteniendo constante la energía libre (AG) que se necesitan para invertir en el inicio de las reacciones siguientes, por lo que esta estrategia metabólica es de gran ventaja (Oren, 1999b, 2011).

#### ▪ **Propiedades cromáticas**

Hasta hace poco se desconocía si las bacterias halófilas podían resistir ante mucha hipersalinidad como las Archaeas han sido capaces de tolerar, pero el descubrimiento de pigmentos en *Salinibacter ruber* ha cambiado la perspectiva que se tenía de las halobacterias (Pagaling *et. al.*, 2009; Oren, 2009).



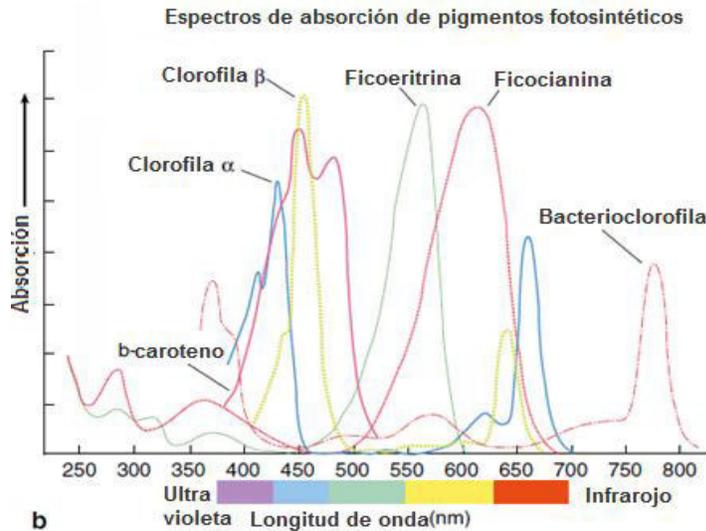


Figura 12. La cantidad de luz absorbida es en relación al tipo de compuestos que tenga integrado en su sistema de la bomba bacteriorodopsina para reflejar un tipo de pigmento. Fuente: Warren, 2016.

▪ **Ciclo del carbono**

Para balancear el carbono en áreas hipersalinas las bacterias autotróficas se integran en sistemas aerobios y anaerobios fermentativos. Este último sistema se clasifica en dos subgrupos: los hidrolíticos (Figura 13A), que degradan los polímeros y los heterótrofos secundarios ("Disipótrofos") (Figura 13B) que utilizan los monómeros resultantes (Sorokin *et al.*, 2014).

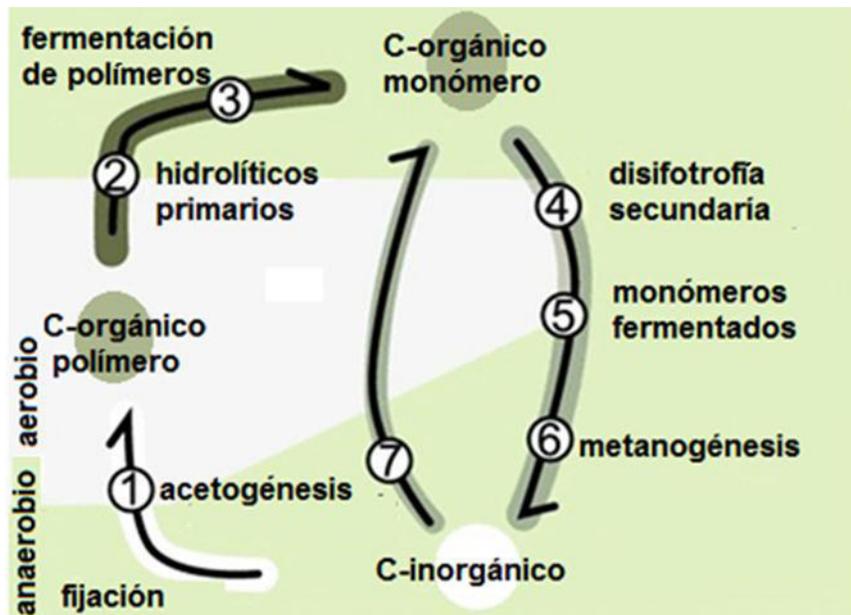


Figura 13. Ciclo del carbono en donde participan bacterias aerobias y anaerobias. Anaerobias a su vez se dividen en dos grupos, hidrolíticas que fermentan los polímeros y heterótrofas secundarias que toman los monómeros finales para convertir al carbono en inorgánico. Fuente: Sorokin *et al.*, 2014.

Los hidrolíticos aeróbicos producen hidrolasas alcalinas que son estables. Estas enzimas en la industria son altamente utilizadas por su amplitud biotecnológica (Horikoshi, 2006). Las especies descritas con este sistema enzimático incluyen Firmicutes aeróbicos, algunos *Bacillus* con actividad glicosidasa, Actinobacterias de los géneros *Cellulomonas* y *Dietzia*, así como *Alkalimonas amilolíticas* del grupo de Gammaproteobacterias. Todas estas especies forman parte de la microbiota del lago Soda en California (Grant y Sorokin, 2011).

*Halanaerobiaceae* y *Halobacteroidaceae* son familias del filo Firmicutes, estas familias de bacterias anaeróbicas obtienen su energía fermentando azúcares simples a productos finales como etanol, acetato, hidrógeno y/o dióxido de carbono (Antunes *et al.*, 2009).

Por otra parte, existen bacterias haloalcalófilas fermentativas especializadas, que exclusivamente utilizan la quitina como sustrato de crecimiento. Esta estrategia es con la que la Gammaproteobacteria aerobia *Marinimicrobium* se sostiene energéticamente (Sorokin *et al.*, 2012a).

Otro tipo de sustrato usado por fermentadoras anaerobias haloalcalófilas, es la pectina que captan y metabolizan las especies *Natronoflexus pectinovorans* del phylum Bacteroidetes y *Natronovirga* de Clostridiales (Sorokin *et al.*, 2012) (Figura 13, fase 3).

Los heterótrofos secundarios (disipotróficos) destacan por ser los encargados de tomar compuestos orgánicos monoméricos (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y alcoholes) para obtener energía. Los miembros más abundantes con este metabolismo son *Halomonas*, *Bacillus*, Firmicutes, *Anaerobranca*, *Spirochaeta* y *Anaerobacillus* (Zavarzin *et al.*, 1999., Zavarzin y Zhilina, 2000., Bowers *et al.*, 2009., Grant y Sorokin 2011., Mesbah y Wiegel 2012) (Figura 13, fase 5).

En la fase final de la degradación del carbono orgánico los anaerobios secundarios que participan en esta etapa son los homoacetógenos (Figura 13, fase 7) y los metanógenos (Figura 13, fase 6) que sintetizan solutos orgánicos compatibles, esto implica que en la metanogénesis en saturación salina se basa en reacciones que producen relativamente más energía por encima de la homoacetogénesis, por la

desproporción de aminas metiladas. Los géneros que han sido reportados con estas actividades metabólicas incluyen especies de *Tindallia*, *Natronincola* (Clostridiales) y *Natroniella acetogena* (Halanaerobiales) (Kevbrin *et al.*, 1998., Zhilina *et al.*, 1995., 1998).

#### ▪ **Ciclo del nitrógeno**

El gen *nifH* no solo se ha detectado en aerobios, las bacterias fototróficas anoxigénicas también se encargan de fijar nitrógeno (Tourova *et al.*, 2007). El cómo intervienen las bacterias en la fijación de nitrógeno en lagos salados en condiciones anoxicas aún no está claro, sin embargo, se piensa que las cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis* y *Nodularia* son de los principales grupos documentados con actividad de fijación de nitrógeno dentro de entornos con contenido bajos en sal, y forman agregados no filamentosos similares a *Phormidio* (Oremland, 1990). Sin embargo, aún no está claro si las bacterias fototróficas o heterotróficas son responsables de la diazotrofia observada en el Lago de Soda en California (Sorokin *et al.*, 2014).

Durante la fijación de nitrógeno en el Lago de Soda, se deduce que el amonio que se produce es oxidado a nitrato por nitrificadores haloalcalófilicos a través de la ruta del nitrito (Figura 14, fase 4). Esta oxidación de amonio a nitritos la realiza una subpoblación de *Nitrobacter* extremadamente tolerante a los álcalis que produce *Nitrosomonas halophila* en la etapa intermedia de la reacción (Sorokin y Kuenen, 2005).

Dado que la concentración máxima de sal para la nitrificación en el Lago de Soda es de 1 M de Na (Sorokin, 1998), se ha observado que el ciclo del nitrógeno se llega a inhibir en los lagos con mucha hipersalinidad, además, el equilibrio de  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$  a pH alto favorece la formación de  $\text{NH}_3$  tóxico, y por lo tanto se produce la pérdida potencial de  $\text{N}_2$  del ecosistema (Tindall 1988; Sorokin y Kuenen, 2005). Por lo tanto, el ciclo del nitrógeno en los lagos hipersalinos, puede depender de una fuente externa de nitrógeno (Sorokin *et al.*, 2014).

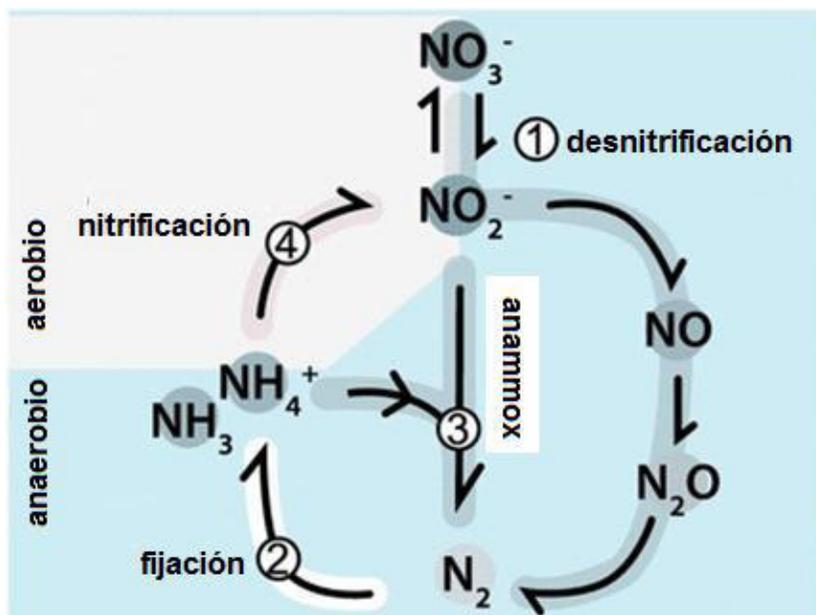


Figura 14. Ciclo del nitrógeno en bacterias haloalcalófilas del Lago de Soda, California. Fuente: Sorokin *et al.*, 2014.

#### ▪ Ciclo del azufre

La reducción disimilatoria de los compuestos azufrados oxidados como el sulfato, el sulfito, el tiosulfato y el azufre, que dan lugar a la producción de sulfuros (sulfidogénesis), son importantes procesos biogeoquímicos en lagos los hipersalinos, Fig.15, fase1 (Sorokin *et al.*, 2010a, 2011b).

Las bacterias reductoras de sulfatos se clasifican en dos grupos: los “oxidadores parciales” que oxidan sustratos con lactato y el acetato es su producto de desecho. Este grupo de oxidadores crecen hasta salinidades bastante altas, y se piensa que *Desulfohalobium retbaense* del lago Retba, Senegal es una de las especies más halótolerantes (Ollivier *et al.*, 1991, 1994).

Los haloalcalófilos *Desulfonatronospira thiodismutans* y *Desulfonatronospira delicata* aislados de la estepa de Kulunda, Altai, Rusia, son *oxidadoresparciales* que oxidan el lactato y etanol a concentraciones totales de sal entre 1 y 4 mol L<sup>-1</sup>, y también pueden crecer como quimiolitautótrofos cuando hay una descompensación (Figura 15, fase 7) de sulfito o tiosulfato (Sorokin *et al.*, 2008a).

El segundo grupo, el de los oxidadores completos utilizan principalmente el acetato como donador de electrones, oxidándolo a CO<sub>2</sub>. Esta actividad oxidadora

parece estar ausente en salinidades altas. *Desulfobacter halotolerans*, recuperada del gran Lago Salado de Utah, es un ejemplo de un halótolerante que crece óptimamente en los rangos de 10-20 g L<sup>-1</sup> de sal, y sobre los 130 g L<sup>-1</sup> su crecimiento es muy bajo y lento. Una explicación contemplada es que la pequeña cantidad de energía durante la oxidación del acetato con sulfato como aceptor de electrones es insuficiente para compensar el alto costo de la producción de solutos compatibles (Oren, 1999b, 2011).

Los análisis en genes *dsrAB* secuenciados en la familia *Desulfohalobiaceae* revelan que sus miembros son los más activos en la reducción de sulfatos en sitios salinos (Por ejemplo, Kjeldsen *et al.*, 2007).

Varias bacterias haloalcalofílicas anaeróbicas estrictas pueden también realizar reacciones en la reducción de sulfato. Los miembros Deltaproteobacterianos de los géneros *Desulfonatronum*, *Desulfonatronovibrio* y *Desulfonatronospira* representan bacterias litotróficas reductoras de sulfato (SRB) en el Lago de Soda, California (Sorokin *et al.*, 2011c).

Las bacterias SRB pueden crecer oxidando hidrógeno, formando compuestos orgánicos de cadena corta como donadores de electrones y sulfato, tiosulfato o sulfito como aceptor de electrones, o pueden obtener energía por desproporción de tiosulfato o sulfito (Sorokin *et al.*, 2008a., 2011b).

Las SRB heterotróficos pertenecen al grupo de oxidantes incompletas, debido a que utilizan propionato (*Desulfobulbus alkaliphilus*) o butirato (*Desulfobotulus alkaliphilus*) ya sea para donarlo o como fuente de carbono con sulfato o tiosulfato como aceptor electrónico, formando acetato como producto final (Sorokin *et al.*, 2010b., Sorokin *et al.*, 2012d).

Hasta el momento, sólo se ha encontrado un SRB haloalcalófilico, descrito como *Desulfonatronobacter acidivorans*, en el Lago de Soda que pertenece a los oxidadores completos (Sorokin *et al.*, 2012c) capaz de oxidar varios ácidos grasos volátiles (VFA) por completo a CO<sub>2</sub> con sulfato o tiosulfato como aceptor de electrones, pero no puede utilizar acetato proporcionado del exterior (Sorokin *et al.*, 2014).

Las asociaciones sintroficas haloalcalófilicas de especies de clostridiales acetogénicos inversos y de SRB litotróficos impulsan la oxidación del acetato en el Lago de Soda en condiciones de reducción de sulfato. A concentraciones bajas de sal,

se asocian *Contubernalis alkalaceticum* y *Desulfonatronum cooperativum* (Zhilina *et al.*, 2005b), para llevar a cabo esta reducción, mientras que a concentraciones de sal extremadamente altas la asociación es por miembros de *Syntrophonatronum acetioxidans* y *Desulfonatronospira* sp. (Sorokin *et al.*, 2014b).

La reducción elemental del azufre en este lago de Soda probablemente no se realiza por SRB, ya que ninguno de los cultivos puros de SRB haloalcalófilos puede crecer con azufre como aceptor electrónico. En cambio, tres linajes diferentes de haloalcalófilos anaeróbicos obligatorios están implicados en la reducción de azufre. En los tres, el aceptor de electrones real no es el azufre propiamente dicho, sino el polisulfuro ( $S_n^{2-}$ ) que forma abióticamente un pH alto a partir de azufre y sulfuro.

La primera, *Desulfurispira natronophila*, pertenece al filo Chrysiogenetes (Sorokin y Muyzer, 2010). El segundo grupo de haloalcalófilos que contienen sulfuro y/o polisulfuro es una especie del filo de Firmicutes y se aisló de los lagos de soda con formiato como donador electrónico. Un representante moderadamente tolerante a la sal se describe como *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* (Sorokin *et al.*, 2012d), además del azufre, también son capaces de utilizar arseniato y tiosulfato como aceptores. En tercer lugar, en las concentraciones de sal saturada, la reducción de azufre mediada por microbios también puede ser realizada por *Natroniella sulfidigena*, que pertenece a los Halanaerobiales, que puede utilizar acetato,  $H_2$  y posicionarse como donadores electrónicos para la respiración dependiente de azufre / polisulfuro (Sorokin *et al.*, 2011d).

#### ▪ **Desproporción de azufre elemental**

Dos anaerobios alcalinos tolerantes de sal en los lagos de soda, *Dethiobacter alkaliphilus* y *Desulfurivibrio alkaliphilus*, originalmente descritos como reductores de azufre y tiosulfato (Sorokin *et al.*, 2008b), tienen la capacidad de crecer quimiolitotroficamente por desproporción de azufre o polisulfuro (Figura 15, fase 3). Sorprendentemente, son los primeros alcalófilos con tal fisiología, y en contraste con desproporcionadores de azufre neutrofilos, no requieren la presencia de hierro férrico para precipitar compuestos tóxicos de sulfuro (Poser *et al.*, 2013).

### ▪ Oxidantes de azufre

El sulfuro producido por sulfudógenos puede ser oxidado a azufre o sulfato elemental por bacterias oxidantes de azufre fototróficas y quimiotróficas (SOB) (Figura 15, fase 2). En el Lago de Soda, las fototróficas que resisten a alta salinidad están dominados por las bacterias púrpuras con oxidasas de azufre de los géneros *Ectothiorhodospira* y *Halorhodospira*, mientras que las que se encuentran a salinidades moderadas son bacterias de los géneros *Thiorhodospira* y *Thioalkalicoccus* (Imhoff y Trueper, 1981).

*Thioalkalivibrio* y *Thioalkalibacter* son autotróficos obligados y utilizan compuestos de azufre reducidos, incluyendo sulfuro, polisulfuro, tiosulfato, politionatos y azufre elemental como donador electrónico (Sorokin *et al.*, 2001, 2002b, 2003). *Thioalkalivibrio* es el grupo metabólicamente más flexible que tolera una amplia gama de porcentajes de salinidad. Varias especies de *Thioalkalivibrio* tienen la capacidad de crecer anaeróbicamente con nitrógeno como aceptores de electrones (Figura 15, fase 1), tales como *T. denitrificans* (Sorokin *et al.*, 2001b), *T. nitratireducens* (Sorokin *et al.*, 2003), y *T. thiocyanodenitrificans* (Sorokin *et al.*, 2004b).

Otras especies de *Thioalkalivibrio* como *T. tiocianoxidans*, *T. paradoxus* y *T. tiocyanodenitrificans*, son capaces de crecer utilizando tiocianato como única fuente de energía, azufre y nitrógeno (Sorokin *et al.*, 2001c, 2002b, 2004b). Las primeras dos especies degradan el tiocianato principalmente a cianato.

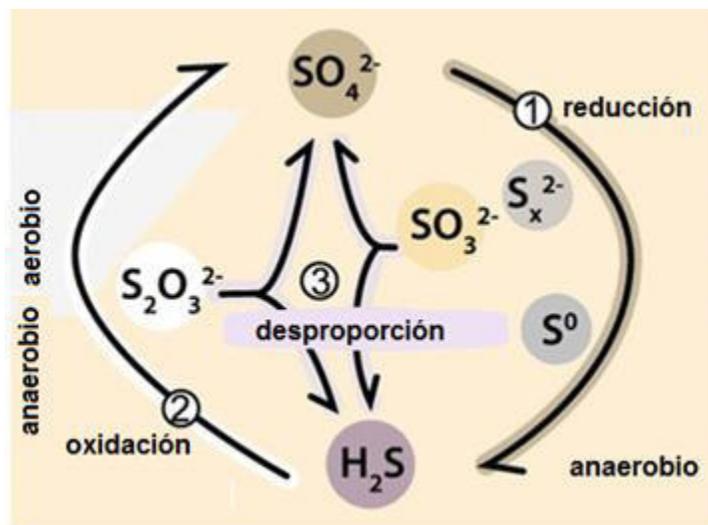


Figura 15. Ciclo del azufre que llevan a cabo las bacterias halófilas. Fuente: Sorokin *et al.*, 2014.

Varias cepas de bacterias halófilas moderadas pueden estar involucradas en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  y  $\text{CaSO}_4$  (calcita y aragonita) y otros minerales. Aunque aún no existen pruebas sólidas *in situ* que vinculen la participación de estas bacterias en la formación de depósitos minerales, bajo medidas experimentales se han realizado pruebas con *Halomonas halophila* como organismo modelo, y los minerales formados que se han identificado por difracción de rayos X.

En un estudio con 27 cepas de halófilas se observó la formación de cristales de  $\text{CaCO}_3$ , siempre y cuando las condiciones permitieran el crecimiento de estas bacterias. La mayoría de los cristales eran esféricos y consistían en calcita y calcita de magnesio, en la que  $\text{MgCO}_3$  constituía una parte del cristal (75 a 85% de Ca y 25 a 15% de Mg); el radio de los minerales dependió de la salinidad y de la composición del medio, y si las temperaturas eran bajas y con un alto contenido de magnesio se limitaba el crecimiento de *H. halophila* en la formación de cristales y se inhibía la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ .

La calcificación comienza con un núcleo que se forma por la agregación de unas pocas células bacterianas calcificadas, y una constante acumulación de estas células calcificadas y el carbonato hacen que las bacterias se mantengan unidas dando lugar a la formación de biólitos esféricos.

Los halófilos moderados que se han reportado como productores de calcita son especies de los géneros *Flavobacterium* y *Acinetobacter*, además *Acinetobacter* es capaz de también producir aragonita. Se ha observado que las altas temperaturas favorecen a la formación de cristales por fuerza iónica.

*Flavobacterium* produce calcita de magnesio desde 0.04 a 0.32% en moles de magnesio; *Acinetobacter* produce calcita de magnesio con hasta un 14% de aragonita en las salinidades más elevadas. Del mismo modo, 63 cepas de *Salinivibrio* aisladas de una salterna en el interior de España se encontraron involucradas en la formación de cristales.

Un enfoque que se le ha aplicado a los estudios realizados a los halófilos, ha sido al aprovechamiento de enzimas para biopolímeros, también los sectores de biorremediación de aguas residuales y la industria alimenticia en la preservación de alimentos han incluido el uso de estos halófilos (Ali, 2015).

## 2.4. Criterios para la clasificación taxonómica de bacterias halófilas

El concepto de especies en bacterias ha sido ampliamente formulado por bacteriólogos y taxónomos a lo largo de la historia.

El consenso al que se ha llegado define a una especie bacteriana como la categoría que circunscribe un grupo (preferentemente) genómicamente cohesible de aislados individuales que comparten un alto grado de similitud en (varias) características independientes, probadas bajo condiciones altamente estandarizadas. La similitud ADN: ADN se mantiene como el parámetro reconocido para delimitar especies. Se ha adoptado un nivel de 70% de similitud como el estándar reconocido (*gold standard*) para determinar si dos cepas pertenecen a la misma especie y se ha utilizado el 3% de divergencia en secuencia del gen *rrs* como punto de corte para separar especies (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt *et al.*, 2002., Silva y Vinuesa, 2007).

Así en bacteriología se ha usado un concepto de especie arbitrario (Maynard Smith, 1995., Ward, 1998). Es un concepto generado ad hoc para bacterias y no es aplicable a todos los seres vivos, si se aplicara este concepto de especie a otros seres vivos encontraríamos que, por ejemplo, todos los primates pertenecemos a la misma especie (Maynard Smith, 1995; Ward, 1998., Silva y Vinuesa, 2007).

Para mejorar la comprensión del funcionamiento de los ecosistemas en condiciones extremas se debe recurrir a la identificación microbiana (Lizama *et al.*, 2001) que permitirá hacer aproximaciones del comportamiento de los primeros microorganismos establecidos en la Tierra, ya que la vida microbiana más temprana en la Tierra podría haber surgido en forma halófila, debido a las altas concentraciones de sales y compuestos orgánicos en ambientes evaporíticos de la Tierra primitiva, por lo tanto la investigación sobre la supervivencia microbiana y su adaptación a ambientes salinos es de relevancia para la comprensión de la evolución temprana de la vida y de la biosfera (Kunte, 2002).

### ▪ **Clasificaciones fenotípicas: morfología**

Las principales morfologías de las halófilas son formas bacilares, cocoides y pleomorfas-planas irregulares. Se han reportado células que exhiben formas

cuadradas (Walsby, 1980, 2005) y estas células cuadráticas pueden estar unidas unas a otras conformando grandes hojas delgadas (Kessel y Cohen, 1982).

Se ha propuesto que este comportamiento de agregados celulares en hojas se debe a que la difusión de oxígeno se facilita de este modo, en donde el oxígeno de los medios con salmueras es pobre (Grant *et al.*, 2001); también se sugiere que estas células cuadradas pueden ser fotótrofas que utilizan la bacteriorodopsina para alcanzar la superficie del agua en forma pasiva, sin el gasto de energía como se requiere para el movimiento flagelar (Walsby, 2005).

La morfología de las halófilas no cocoides puede cambiar, dependiendo de la concentración de sal del medio. Con el aumento de sal diluido en el ambiente, las halófilas adoptan formas tubulares o de esferas infladas y dobladas con masas deformadas (Mohr y Larsen, 1963; Kushner y Bayley, 1963).

La inflación y deformación en las células ocurre porque en la envoltura celular se necesita la presencia de altas concentraciones de cationes para mantenerse estable. Las halófilas tubulares y pleomórficas poseen una capa superficial (capa S), que se compone de una red hexagonal que consiste en un tipo de glicoproteína (Lechner y Sumper, 1987) y esta glicoproteína se mantiene firmemente anclada a la membrana plasmática por un dominio de transmembrana; O<sup>-</sup> y N<sup>-</sup> de glicosilación están ubicados en sitios diferentes de una especie a otra (Eichler, 2003). La capa S se cree que tiene una función para mantener la forma celular, en la reducción de la concentración de cationes (Boring *et al.*, 1963).

La pared celular de los cocoides es rígida debido a su composición de heteropolisacáridos (Schleifer *et al.*, 1982; Niemetz *et al.*, 1997). Las colocaciones de estas células en soluciones hipotónicas no sufren lisis y las células mantienen su viabilidad (Leuco *et al.*, 2004., 2005).

#### ▪ **Herramientas moleculares**

Un criterio taxonómico para la identificación y reconocimiento de las bacterias halófilas es la secuenciación del gen 16S del rRNA (de 1500 nucleótidos de extensión), con secuencias específicas que permite realizar comparaciones entre las cepas y establecer reconstrucciones y relaciones filogénicas que ayudan a comprender las

historias evolutivas (Figura 16), debido a que los fragmentos presentan diferentes niveles de variabilidad (Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.* 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998; Dojka *et al.*, 2000).

▪ **Huellas genómicas**

Sin embargo, esta técnica, acoplado con otras técnicas, permite codificar genes con alguna una actividad específica dentro de los ambientes hipersalinos, como el mapeo de genes de importancia ecológica, como el gen para la fijación biológica de nitrógeno (*nifH*), o los genes involucrados en la síntesis de la reductasa de sulfito en su asimilación, y la transcripción del gen *mcrA* para la subunidad de la coenzima-M de metilo reductasa en los metanogenos (Hal Isworth *et al.*, 2007).

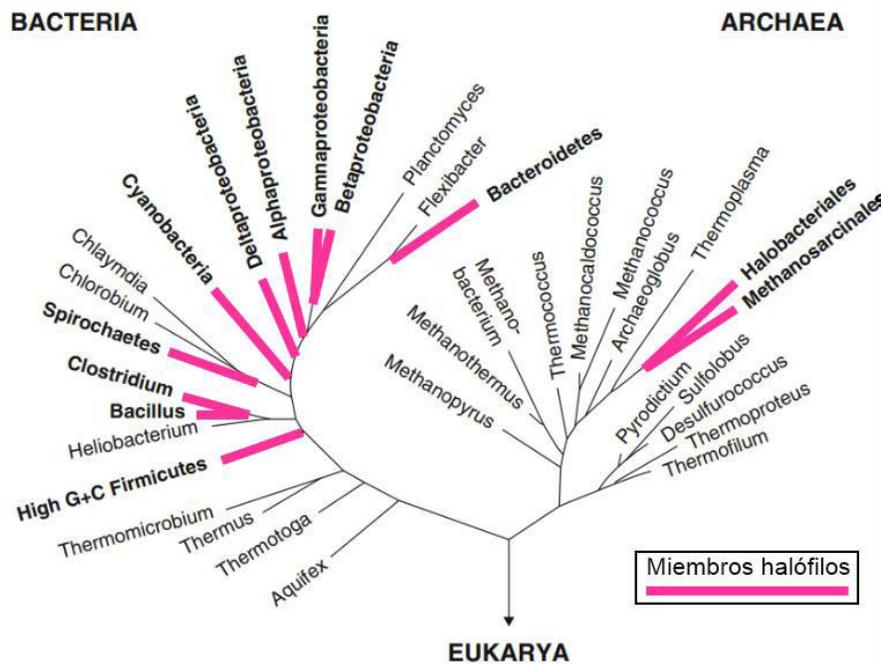


Figura 16. Árbol filogenético de bacterias y archeas basado en la comparación de secuencias de 16S rRNA. Los clados que tengan la línea rosa poseen miembros halófilos. Fuente: Ventosa *et al.*, 1998.

Una vez que el gen 16S rRNA se ha amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un método simple para reconocer polimorfismos entre cepas de poblaciones bacterianas, es mediante la digestión por endonucleasas, con el Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado ARDRA (Muyzer *et al.*, 1993).

ARDRA constituye una técnica que evalúa de manera rápida y eficiente cambios genotípicos a lo largo del tiempo o entre diferentes lugares que reflejan diferentes condiciones ambientales que han moldeado la constitución genética de las cepas.

Este método se basa, en el principio en donde los sitios de restricción del operón de ARN se conservan de acuerdo con patrones filogenéticos. La reacción implica el uso de un par de secuencias de cebadores universales para la amplificación por PCR de los loci genéticos de 16S rRNA o regiones intergénicas de los genes rRNA 16S y 23S (Massol-Deya *et al.*, 1993).

Las últimas regiones de este fragmento, exhiben un gran grado de variación en la secuencia, longitud y frecuencia porque la región espaciadora no está bien conservada, el producto de PCR intragénico (- 1500 bp) se usa luego como sustrato para la digestión por endonucleasas de restricción (enzimas de restricción tipo II, HaeIII, MseI, HinfI, Sau3A, HpaII; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) (Hook *et al.*, 1991), en esta región actúan como cebadores un par de secuencias flanqueantes altamente conservadas en la amplificación de los sitios ribosomales 16S de en los sistemas microbianos (Figura 17), observado las bandas una vez que se realiza el corrimiento de gel en electroforesis (Massol-Deya *et al.*, 1993).



Figura 17. Representación esquemática general del operón de ARN ribosómico que muestra la localización aproximada en los sitios de unión del cebador para la amplificación en PCR. La región espaciadora puede variar en longitud (por ejemplo, número de tRNA) y secuencia entre los diferentes operones dentro de un solo organismo. Fuente: Massol-Deya *et al.*, 1993.

Dentro de las huellas genómicas, existen secuencias repetidas que se basan en PCR (rep-PCR) para ver perfiles a nivel de especies, subespecies y cepas. Estas secuencias repetidas son reconocidas a partir de primers de DNA en las regiones en

las que se ubican estas repeticiones para acoplarse. Las secuencias que se repiten, están distribuidas a lo largo de los genomas bacterianos.

Los amplicones de rep-PCR son examinados en geles de agarosa, para registrar las huellas de alta especificidad; tres familias de estas secuencias repetidas han sido identificadas. Estas incluyen secuencias de 30 a 40 pb palíndromicas extragenicas repetitivas (REP), secuencias de consenso intergenicas repetitivas enterobacteriana de 124-127 pb, y los elementos de secuencias intercaladas de BOX de 154 pb identificadas en *Streptococcus pneumoniae* (Rademaker *et al.*, 2005) consta de tres regiones discriminadas: boxA, boxB y boxC, que son 59, 45 y 50 pares de bases de longitud, respectivamente (Figura 18) (Van Belkum y Hermans, 2001).

En las tres regiones de BOX las combinaciones se ubican en diferentes loci, con una heterogeneidad de secuencia limitada entre diferentes elementos de la misma cepa o elementos secuenciados de diferentes cepas.

Las subsecuencias tipo A son efectivamente independientes de las subunidades similares a boxB o boxC en bacterias distintas de *S. pneumoniae*. Además, los dendrogramas derivados de las huellas dactilares repetitivas basadas en secuencias (rep-PCR) de aislados de *S. pneumoniae* usando el cebador BOXA1R produjeron patrones de agrupamiento similares a los obtenidos anteriormente por otros métodos, lo que sugiere que estas huellas genéticas de ADN repetitivas basadas en secuencias representan intrínsecas propiedades del genoma de una cepa de *S. pneumoniae*. Los resultados indican la conservación generalizada de subsecuencias tipo boxA en el reino bacteriano, que apoyan la naturaleza mosaica de BOX en *S. pneumoniae* (Kouth *et al.*, 1995).

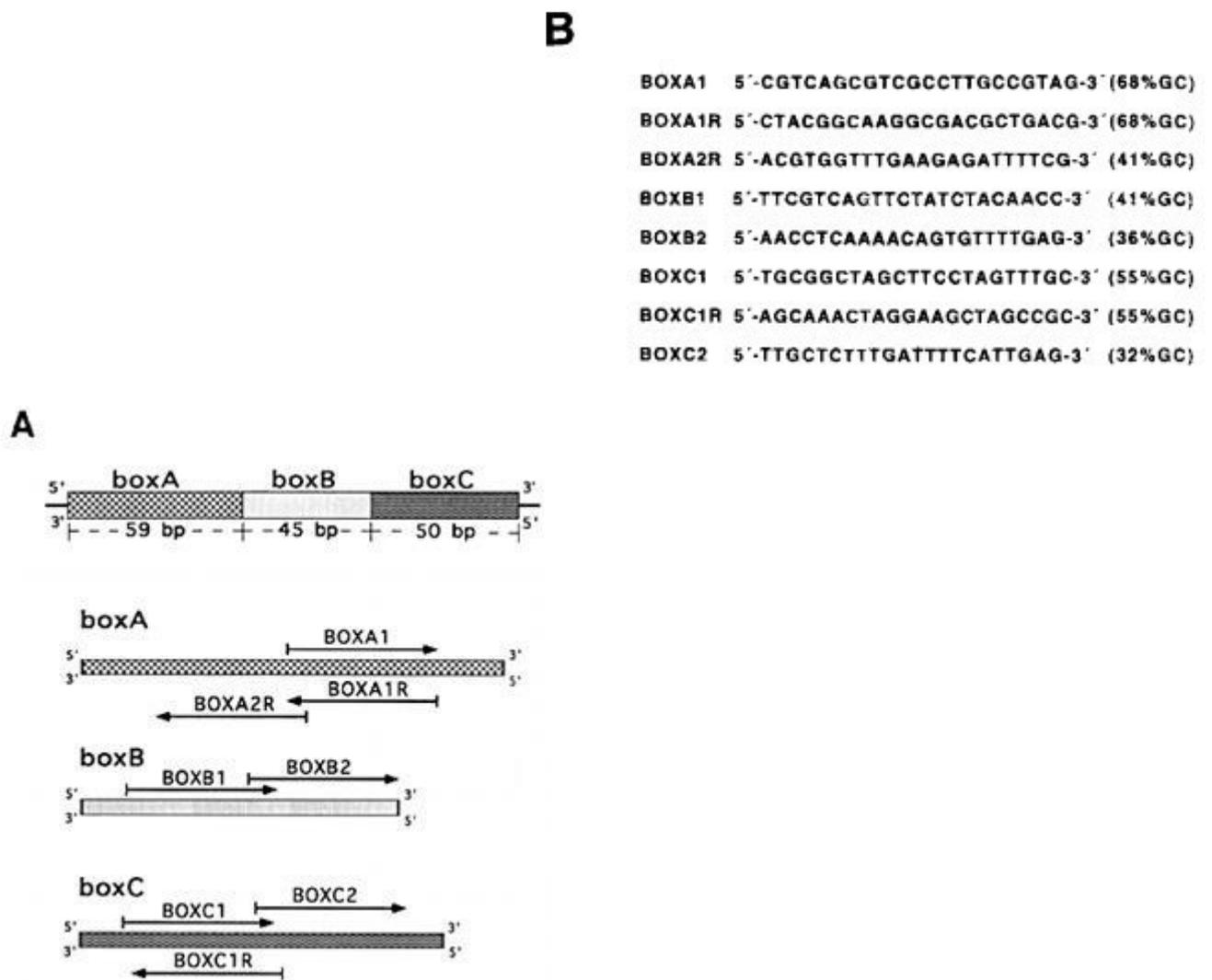


Figura 18. El modelo estructural repetitivo intercalado de BOX en *S. pneumoniae*. A) El elemento BOX consiste de tres subunidades, boxA, boxB y boxC, y puede consistir en varias combinaciones de estas subunidades. El tamaño de cada sub unidad de BOX es se muestra debajo. Posiciones de la BOX adelante y cebadores inversos dentro de la caja A, las subsecuencias boxB y boxC se muestran por flechas con las puntas de flecha que representan el 3' final de cada cartilla BOX. B) Las secuencias reales de primers fueron diseñados para ser complementarios a las secuencias de consenso de Subunidades boxA, boxB y boxC, respectivamente / 7 ~ El porcentaje de contenido de GC está indicado al lado de cada secuencia de cebador (Kouth *et al.*, 1995).

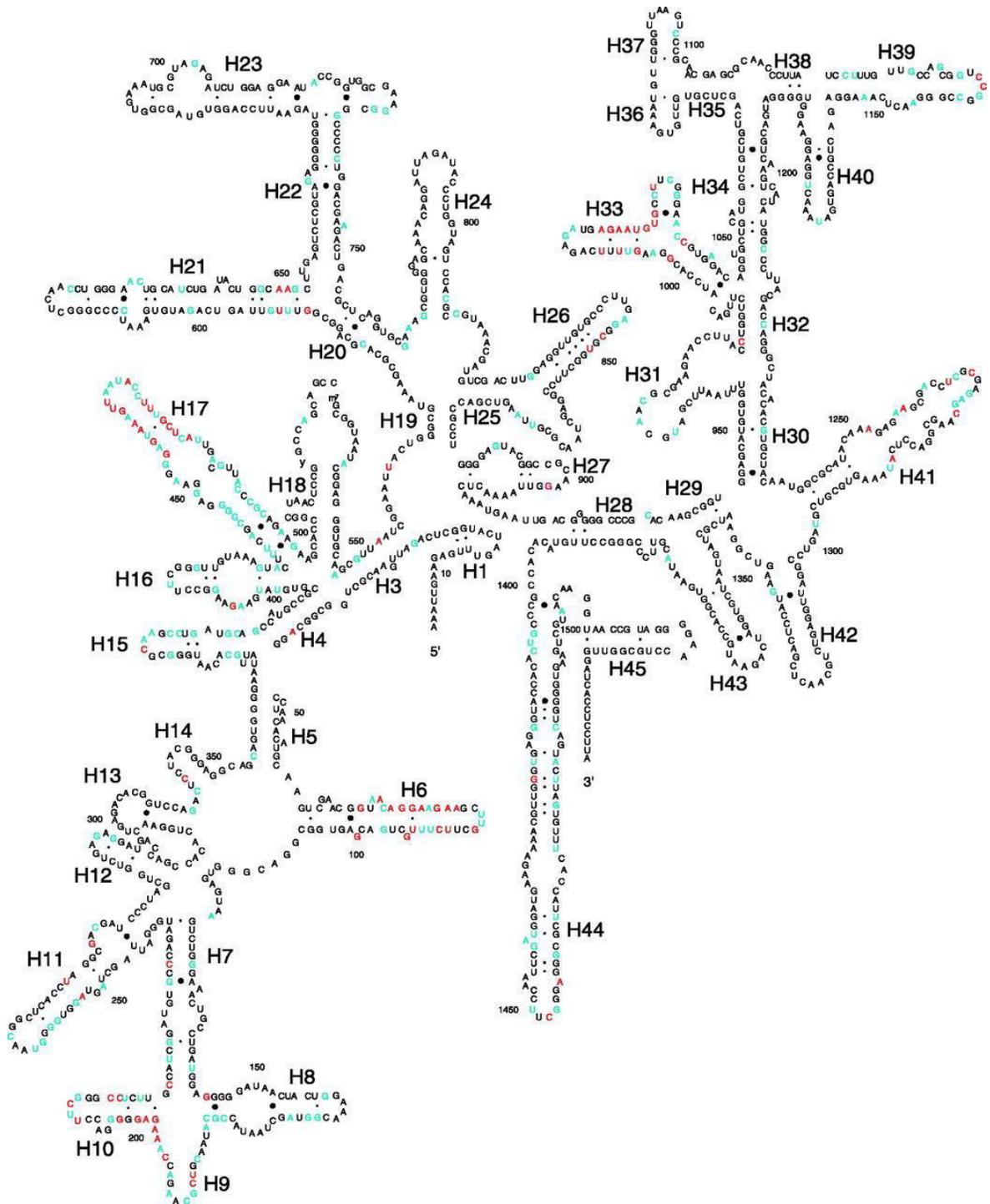


Figura 19. Estructura del gen 16S rRNA en *E. coli*. Fuente: Case *et al.*, 2007.

### III. ANTECEDENTES

En el 2004, Jan-Roblero *et al.* utilizaron técnicas moleculares para comparar las composiciones de las comunidades bacterianas de dos lagunas del antiguo lago Texcoco, México: la laguna Facultativa restaurada y la laguna Nabor Carrillo. El análisis de espaciadores intergénicos ribosómicos (RISA) reveló que las comunidades bacterianas de las dos lagunas eran diferentes y presentaban una diversidad relativamente baja. Construyeron bibliotecas de clones de genes de rDNA 16S, e identificaron filotipos significativos por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Un clon representativo de cada filotipo fue parcialmente secuenciado. La identificación molecular y los análisis filogenéticos basados en secuencias ribosómicas revelaron que la laguna Facultativa albergaba principalmente proteobacterias  $\gamma$  y  $\beta$ , bacterias Gram positivas bajas en G + C y varios miembros de la familia de las arqueas de Halobacteriaceae. La laguna de Nabor Carrillo incluyó principalmente bacterias Gram-positivas bajas en G + C halófilas y alcalofílicas,  $\gamma$ -Proteobacteria y  $\beta$ -Proteobacteria similares a las encontradas en otros lagos de soda. Detectaron varias nuevas especies bacterianas probablemente no cultivadas.

Aislaron tres cepas de la laguna Nabor Carrillo, y obtuvieron sus secuencias de ADNr 16S parciales. Sobre esta base, identificaron como *Halomonas magadiensis* (H1), *Halomonas eurihalina* (H2) y *Staphylococcus sciuri* (H3). Este fue el primer estudio que utilizó técnicas moleculares para investigar la diversidad genética potencial en los lagos de Texcoco. En esta evaluación preliminar, los autores infieren que la presencia de bacterias alcalófilas, halófilas o haloalcalófilas son potencialmente útiles para la biotecnología.

Argandoña *et al.* (2005) cultivaron la cepa *Halomonas maura* S-31<sup>T</sup> en un medio libre de nitrógeno, creciendo bajo condiciones de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>); redujo acetileno bajo condiciones específicas. En pruebas moleculares, amplificó el gen *nifH* en esta cepa mediante el uso de oligonucleótidos degenerados, que se diseñaron a partir de un gran número de alineamiento de secuencias de este gen en diferentes microorganismos que amplificaron este gen. El equipo de trabajo concluyó que *H. maura* es capaz de fijar nitrógeno en condiciones microaeróbicas.

En un estudio ecológico realizado en el lago salado El-Djerid, en Túnez por Hedi *et al.*, (2009) aislaron comunidades aeróbicas de procariotas en el sedimento, y de acuerdo al gradiente de salinidad se estableció la distribución de cada cepa. Todas las muestras de agua estudiadas se consideraron hipersalinas con una concentración de NaCl de 150 a 260 g/L. Por cada punto de colecta recuperaron una comunidad microbiana halófila específica, y la caracterización de microorganismos fue a través de enfoques fenotípicos y filogenéticos. Un organismo del dominio arquea, del género *Halorubrum* fue la única cepa que esta categorizada como halófilo extremo. Los miembros del dominio Bacteria fueron identificados dentro de los géneros *Salicola*, *Pontibacillus*, *Halomonas*, *Marinococcus* y *Halobacillus*. Los resultados de este estudio discuten la descomposición de la materia orgánica en el lago El-Djerid y su potencial para aplicaciones industriales y en biorremediación.

Los elementos incluidos en el grupo de lantánidos son conocidos, en algunos casos, por ser sensibles a los cambios en la columna de agua o la química de los sedimentos, un hecho que les permite ser utilizados como huellas ambientales. Choumiline *et al.* (2013) se dieron a la tarea de describir el comportamiento de estos elementos en ambientes hipersalinos de Guerrero Negro, México, especialmente en aquellos que son colonizados por halófilos de los tres dominios: Bacteria, Archea y Eucarya. Colectaron sedimento de varios estanques, permitiendo diferenciar el comportamiento de los lantánidos y elementos traza bajo un gradiente de salinidad de columna de agua a lo largo del proceso de evaporación de los estanques. Lograron distinguir dos grupos de elementos con tendencias similares: grupo A: La, Ce, Pr y Nd y el grupo B: Sm, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y Lu.

Los análisis microscópicos de células procarióticas de una estera estratificada en el estanque 5 (recolectada en 2004) mostraron abundantes bacterias filamentosas y cianobacterias con riqueza de morfotipos de células procariotas en una quimioclina de 3 mm a 7 mm de profundidad, que coexiste con nueve morfotipos de procariotas aerobios y anaeróbicos: *Microcoleus chthonoplastes*, *Leptolyngbya*, *Cyanothece*, *Geitlerinema*, *Spirulina*, *Chloroflexus*, *Beggiatoa*, *Chromatium* y *Thioploca*. Por debajo de los 7 mm de profundidad, la fotosíntesis oxigénica se agota y los compuestos reductores de azufre aumentan.

Los valores máximos de los contenidos de lantánidos normalizados de pizarra del 'grupo A' (a 15 mm de profundidad) probablemente están correlacionadas con los morfotipos de bacterias fototróficas anoxigénicas *Cloroflexus* y *Chromatium* y pocos de *Microcoleus chthonoplastes*, mientras que los mínimos (a 22 mm de profundidad) asociado a bajas abundancias de células y riqueza de morfotipos de estos grupos de procariotas, donde persistieron *M. chthonoplastes*, *Chloroflexus* y *Chromatium*. Y *Europium* mostró tendencias independientes de ambos grupos, estando más cerca del "grupo B".

Como un hecho adicional, el oligoelemento uranio, comúnmente asociado a sedimentos ricos en materia orgánica y en algunos casos representativos de condiciones reductoras, parece enriquecerse de manera similar al "grupo A lantánido ligero". Los resultados preliminares podrían sugerir una adsorción preferencial de lantánidos ligeros versus pesados a las paredes celulares de algunos tipos específicos de bacterias. Esto podría ser un efecto físico-químico puro o un mecanismo biológico.

Bouljen *et al.*, (2014) publicaron un estudio de la diversidad de arqueas y bacterias halófilas en la salina de Sfax, Túnez. Sesenta y cuatro cepas se registraron, mediante la técnica ARDRA con las enzimas de restricción *Hinf I* y *Mbol*. Las secuencias se agruparon en un árbol filogenético utilizando el modelo neighbor-joining. Las especies identificadas de arquea correspondieron a *Halorubrum chaoviator* como la especie predominante, y *Halovenus aranensis*. En el dominio bacteria, las especies aisladas correspondieron a las cepas *Salinicola marasensis* y *Salinicola* sp.

Sorokin *et al.* (2014) hacen una revisión informativa sobre la vida en este entorno extremo, y como los haloalcalófilos han desarrollado diversas adaptaciones bioenergéticas y estructurales para mantener la homeostasis del pH y la presión osmótica intracelular. El cultivo de un puñado de cepas ha llevado al aislamiento de una cantidad de extremoenzimas, que permiten a la célula realizar reacciones enzimáticas en estas condiciones extremas. Estas enzimas contribuyen potencialmente a aplicaciones biotecnológicas. Además, las especies microbianas activas en el ciclo de azufre se pueden utilizar para fines de remediación de azufre.

La investigación futura debería combinar métodos de cultivo innovadores y técnicas metagenómicas de vanguardia para obtener una comprensión integral de los

microbios que florecen en estos entornos extremos y en los procesos que median. La combinación de los ciclos biogeoquímicos C, N y S e identificar dónde se lleva a cabo cada proceso en una escala espacial y temporal podría desentrañar las relaciones interespecies y así revelar más acerca de la dinámica del ecosistema de estos entornos extremos.

Una investigación reportada por Li y Hui (2015) aislaron un total de 152 bacterias halófilas de del lago salado Yuncheng, en China. El análisis filogenético basado en las comparaciones de la secuencia del gen 16S rRNA reveló que treinta y cuatro cepas estaban relacionadas con el filo Firmicutes y pertenecían a tres familias: Bacillaceae, Clostridiaceae y Staphylococcaceae. Las otras cepas fueron identificaron como miembros de Halomonadaceae e Idiomarinaceae, miembros del filo  $\gamma$ -Proteobacteria.

Solo nueve cepas mostraron <97% de similitud en sus secuencias del gen 16S rRNA en comparación con otras especies publicadas, por lo tanto, podrían representar nuevas especies. Por otra parte, los aislados halófilos exhibieron diversas actividades hidrolíticas. Un total de 74 cepas produjeron amilasa extracelular, 15 sintetizaron proteasas, 70 demostraron tener lipasas, 18 cepas dieron positivo para celulasas, 23 aislados produjeron pectinasa y 3 cepas con actividad ADNasa. La mayoría de las cepas con hidrolasa formaron parte del género *Halomonas*. Algunas cepas mostraron actividades hidrolíticas combinadas.

El examen de la actividad antimicrobiana indicó que los aislados 3, 6, 15, 12, 15 y 16 aislados halófilos podrían inhibir *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Los resultados de este estudio indicaron que las bacterias halófilas pueden desarrollarse como fuentes prometedoras para nuevos biocatalizadores o sustancias bioactivas en el campo de la biotecnología.

Los lagos de Soda, contienen altas concentraciones de carbonatos de sodio que dan como resultado un pH alcalino, que proporciona un hábitat único y una rica diversidad de bacterias y arqueas haloalcalófilas. Tanto los métodos dependientes como los independientes del cultivo que han permitido a la identificación de procesos y de genes clave en los ciclos biogeoquímicos de carbono, nitrógeno y azufre mediados por microbios en los lagos de soda.

De los sedimentos del lago salado Lunsu en Himachal Pradesh en India, Gupta *et al.* (2015) aislaron cinco cepas bacterianas halófilas: SS1, SS2, SS3, SS5 y SS8. Los aislamientos bacterianos crecieron en medio Luria Bertani (LB) con un porcentaje de NaCl de hasta 8,7%, en un pH de 7 a 8, a un rango de temperatura de 30-37 ° C. Las cepas SS1 y SS3 requirieron de al menos un 3.8% de NaCl para lograr crecer, lo que indica que son auténticos halófilos. Los aislados bacterianos SS2, SS5 y SS8, pero crecimiento en medio suplementado con KCl. El análisis fisicoquímico del agua del lago contenía, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> iones en 1.39 y 0.0035%, respectivamente. Todos los aislados bacterianos se analizaron por amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) usando cuatro cebadores aleatorios diferentes y fragmentos de PCR producidos, con una variación de 0,1 a 5 kb de tamaño.

El árbol filogenético basado en huellas genómicas RAPD mostró que SS1 y SS3 se agrupan en un mismo cluster, mientras que SS2 y SS5 formaron el segundo grupo, y SS8 no estaba emparentada con el resto de las cepas. A partir de las secuencias del gen 16S rDNA se identificó a SS1 y SS3 en la especie *Halobacillus trueperi*, SS2 perteneció al género *Shewanella*, SS5 a una *Halomonas venusta* y la cepa SS8 fue *Marinomonas* sp. Este es el primer informe sobre la presencia de diversas bacterias halófilas en las colinas del Himalaya.

En el 2016 Shubhangi *et al.*, reportaron veinte cepas de bacterias halotolerantes de vida libre y fijadoras de nitrógeno que aislaron del lago Lonar en Maharashtra, India. Estas cepas fueron inoculadas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl. De las 20 cepas, solo cuatro aislamientos: DL2, DL3 y DL6 mostraron un crecimiento óptimo al 4% de NaCl y la cepa DL11 tuvo un crecimiento óptimo a una concentración de NaCl del 6%.

El margen de tolerancia de NaCl de estas cuatro cepas fue del 10%. La secuenciación del gen ARNr 16S identificó a la cepa DL2 como *Pseudomonas mendocina*, DL3 como *Acinetobacter beijerinckii*, DL6 como *Pseudomonas stutzeri* y DL11 como *Bacillus subtilis*. Se evaluaron sus propiedades funcionales como promotoras de crecimiento vegetal, y todas dieron positivo en la producción de ácido indolacético y amoníaco, con capacidad de solubilizar fosfato bajo una concentración de 4% de NaCl.

La tolerancia a la sal en estas bacterias aumentó de 10 a 14% cuando se les aplicó luz UV como mutágeno físico, y las cepas mutantes permanecieron como PGPB. Para determinar la eficacia de estos aislamientos, se preparó un bioinóculo y se probó en la planta *Catharanthus roseus* a una concentración de NaCl al 4%, se registró un aumento de 12.61 y 82.35% en la longitud del tallo y la raíz, respectivamente, además el número de flores aumentó un 71.42% en comparación con las plantas de control en condiciones salinas. Estos resultados indican que las bacterias halotolerantes aisladas de ambientes salinos, tienen el potencial de mejorar el crecimiento vegetal bajo estrés salino a través de mecanismos indirectos.

En el lago hipersalino endorreico Chott El Jerid, en Túnez, Abdallah *et al.* (2016) analizaron dos muestras diferentes S1-10 y S2-10 tomadas debajo de un tapete de sal en la estación seca. El análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) basado en el gen 16S reveló que las secuencias genómicas de bacterias formaban parte de los filos Firmicutes, Proteobacteria, *Deinococcus thermus* y otras bacterias no registradas hasta ese momento. La actividad de bacterias anaerobias fermentativas y reductoras de sulfato fue reportada en este ecosistema. Dentro del dominio arqueas, todas las secuencias estaban afiliadas al filo Euryarchaeota. La PCR cuantitativa de tiempo real mostró que el número de copias del gen 16S rRNA en bacterias fue  $5 \times 10^6$  copias de ADN  $g^{-1}$ , mientras que las arqueas variaron entre  $5 \times 10^5$  y  $10^6$  ADN copias  $g^{-1}$  en estas muestras. Las ocho cepas de halófilas anaeróbicas con capacidades fermentativas aisladas están emparentadas con las especies *Halanaerobium alcaliphilum*, *Halanaerobium saccharolyticum*, y *Sporohalobacter salinus*. La presencia de estas especies indica que existe una comunidad microbiana abundante y diversa en este entorno hipersalino de tipo thalassohalino.

Orhan (2016) presentó un estudio sobre 18 bacterias halotolerantes y halófilas con capacidades de promover el crecimiento vegetal bajo condiciones *in vitro* y en hidroponía. Las cepas bacterianas dieron positivo en producción de amoníaco, ácido indol-3-acético y 1-aminociclo propano-1-carboxilato-desaminasa, solubilizaron fosfato y realizaron fijación de nitrógeno. De las bacterias probadas, ocho fueron inoculadas por primera vez en *Triticum aestivum* en un cultivo hidropónico. Bajo estrés salino

(NaCl 200 mM), las cepas bacterianas investigadas aumentaron significativamente la longitud de la raíz y el tallo y el peso fresco total de las plantas.

Las tasas de crecimiento de las plantas inoculadas con cepas bacterianas oscilaron entre 62.2% y 78.1%. El uso de bacterias halófilas y halotolerantes que promuevan el crecimiento de las plantas puede ser una alternativa para las plantas que son sensibles a los entornos salinos.

## IV. OBJETIVOS

### General

Estudiar la diversidad de bacterias halófilas aisladas de un ambiente salino extremo natural.

### Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el agua y sedimento del manantial “Las Salinas”.
- Caracterizar fenotípica y genotípicamente las bacterias halófilas aisladas del manantial “Las Salinas”.
- Describir la interacción ecológica de estas bacterias con su medio ambiente.
- Analizar la habilidad multifuncional bioquímica y capacidad enzimática de las bacterias aisladas.
- Reconstruir una síntesis del desarrollo geológico de Ixtapa a través un modelo comparativo general entre la distribución geográfica actual y su recorrido paleogeográfico.

## V. ÁREA DE ESTUDIO

El manantial “Las Salinas” se ubica a 1140 m.s.n.m. en el municipio de Ixtapa, Chiapas (Nuestro-México, 2019). Ixtapa, cuenta con una extensión territorial de 313 km<sup>2</sup>, colinda con los municipios de Soyaló, Bochil, Larráinzar, Zinacantán, Chamula y Chiapa de Corzo (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2007). Asentado en la Altiplanicie Central y las Montañas del Norte, Ixtapa cuenta con 58 comunidades y pertenece a la región I Centro. La orografía del lugar está constituida en un 60% por zonas accidentadas y el restante 40% por zonas semiplanas en la parte occidental y planas en el centro.

Su hidrografía se conforma de los ríos Escopetazo, Salina, Hondo y Lajas y los arroyos intermitentes Limón y Pitahaya. El territorio del municipio está constituido geológicamente por terrenos terciario mioceno, terciario ligoceno y cretácico inferior, los tipos de suelo predominantes son: livosol, regosol, litosol, redzina y andosol, su principal uso es agrícola con bosque correspondiendo el 98% del territorio a terrenos ejidales y el restante a propiedad privada.

El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, convirtiéndose en semi cálido en altitudes mayores, en la cabecera municipal la temperatura media anual es de 21.5 °C y una precipitación pluvial de 1273 mm anuales. Está poblado por integrantes de la etnia tzotzil conocida por la elaboración de sal, comercializada principalmente en la zona de los Altos de Chiapas, por lo que la hace poco conocida en las demás regiones del estado.



## VI. MÉTODO

### 6.1. Recolecta y análisis fisicoquímico de muestras

Se utilizó una botella Van Dorn para recolectar agua salina y sedimento del manantial. El agua y sedimento recolectados se almacenaron en frascos de vidrio estériles. La colecta se realizó siguiendo las instrucciones del proyecto NMX-AA-121/2-SCFI-2008, de “Análisis de agua - aguas naturales epicontinentales, costeras y marinas – muestreo”.

Se determinó la temperatura, pH y conductividad eléctrica (CE) en las muestras de agua y sedimento usando un medidor multiparamétrico portátil HS9814 HANNA.

El contenido de carbono orgánico y nitrógeno total fue determinado por medio del equipo TOC-analyzer. En el caso del contenido de cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio en las muestras sedimento y el agua, fue determinado por Espectroscopia de Absorción Atómica de acuerdo a lo recomendado por Dorador *et al.* (2008) en el estudio de ambientes extremos salinos.

### 6.2. Aislamiento y cultivo de halobacterias

El aislamiento de bacterias en medio Soya-Trypticaseína (TSA Difco®) consistió en macerar 10 g de sedimento en 100 mL de agua estéril (Bashan, 1993). Para la dilución de la muestra de agua salina se tomó 1 mililitro que se vació en 100 mL de agua estéril. A partir de cada suspensión se tomó una alícuota de 100 µL y se depositó directamente en cada placa por triplicado. Para una difusión que permitiera aislar el mayor número de colonias posibles, se llevó a cabo el método de Copacabana (Worthington *et al.*, 2001).

Preparación de medio Soya-Trypticaseína (TSA Difco®) adicionado con sal al 5%

30 g/L ..... Caldo Soya-Trypticaseína

20 g/L ..... Agar bacteriológico

50 g/L ..... NaCl

Para el aislamiento de bacterias halófilas diazotróficas, de las mismas suspensiones de agua y sedimento en agua estéril, se tomó una asada de cada suspensión para inocular la superficie de un tubo con medio semisólido Winogradsky modificado. Una vez crecida una capa de biomasa blanquecina sobre la superficie del medio virado a color azul, se estrió esta biomasa en medio sólido Winogradsky modificado para conseguir aislar colonias bacterianas, las resiembras fueron continuas hasta obtener cepas con morfotipos distintos y puras (Baldini *et al.*, 2014).

Preparación de medio sólido y semisólido de Winogradsky (Baldini *et al.*, 2014) adicionado con sal al 5%.

5 g/L .....	Ácido málico
2 ml/L.....	Azul de bromotimol
1 pizca.....	CaCO <sub>3</sub>
10 g/L .....	Agar bacteriológico semisólido
50 g/L .....	NaCl
El pH se ajustó a 6.5	

El stock de micronutrientes del medio Winogradsky se elaboró de la siguiente manera (g/L): 0.04 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.12 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.40 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.0 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, y 1.175 MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.

### **6.3. Estudio fenotípico en bacterias extremófilas**

Con base en la nomenclatura bacteriana (Manual Bergey's) se determinó la morfología de la colonia, elevación, margen, color, textura, opacidad y brillo. Se registró morfología celular y la clasificación Gram de cada cepa usando un microscopio óptico marca ZEISS.

### **6.4. Conservación de cepas puras de extremófilas**

Una vez que las cepas fueran puras, se conservaron en una mezcla lipoprotectora y nutritiva constituida por glicerol en un 40% y de caldo de Soya-Trypticaseína (TSA Difco®) en un 60%. Cada vial contenía un volumen de 1 ml de la mezcla, con biomasa bacteriana.

### **6.5. Estudio genómico de las bacterias extremófilas**

#### **6.5.1. Extracción de ADN genómico**

El ADN de cada cepa pura se extrajo usando el kit Fungal/Bacterial (Zymo Research®) siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad del ADN extraído se verificó con una electroforesis en gel en agarosa al 1.5% y TAE al 1X. Los fragmentos de ADN se observaron bajo UV-transiluminador (UPV-3000).

### 6.5.2. Estudio de huellas genómicas

Se siguió el método descrito por Versalovic *et al.* (1991) para generar huellas genómicas usando el oligo BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') a partir del ADN extraído de las cepas bacterianas en estudio. La PCR se realizó usando un termociclador Applied Biosystem 2720 con la programación de la figura 21:

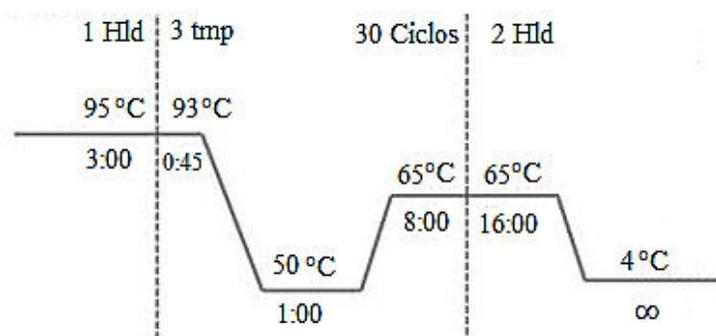


Figura 21. Programación de Box-PCR en termociclador.

Las cepas que comparten huellas (patrones genómicos) se agruparon después de realizar la lectura de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Fuente: Rincón-Rosales *et al.*, 2013.

La mezcla de la carga para PCR-BOX se realizó con las siguientes concentraciones:

Cuadro 2. Mezcla para carga de huellas genómicas Box.

Reactivo	1 tubo (10 µL)
dNTP's	1.24 µL
Box-Air	0.40 µL
MgCl <sup>++</sup>	1.52 µL
Buffer 10X	1.00 µL
Taq polimerasa	0.08 µL
DMSO	1.00 µL
DNA	0.40 µL
<u>H<sub>2</sub>O MQ</u>	<u>4.37 µL</u>
Volumen final	10.01 µL

Para realizar la lectura interespecífica se utilizó la enzima de restricción HinfI, para cortar el producto en sitios palíndromicos de PCR del gen 16S rRNA, en incubación a 37 °C durante 3 horas. Una vez que la enzima actuó, se inyectó el producto en un gel de agarosa al 1.5% y se corrió en una cámara electroforética, por 45 minutos a 90 Volts y 400 miliamperios.

La mezcla de la carga para PCR-ARDRA se realizó con las siguientes concentraciones.

Cuadro 3. Mezcla para carga de huellas genómicas ARDRA

<u>Reactivo</u>	<u>1 tubo (20 µL)</u>
Producto de PCR 16S rRNA	3.00 µL
Buffer 10X	2.00 µL
Enzima HinfI	0.80 µL
<u>H<sub>2</sub>O MQ</u>	<u>14.20 µL</u>
Volumen final	20.00 µL

### 6.5.3. Amplificación del gen 16S ADNr bacteriano y estudio filogenético

A partir del ADN genómico total se realizó la PCR con dos juegos de primers: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') con 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), y fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') con rD1(5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') para 16S ADNr, que amplifican productos de 1500 bases aproximadamente de acuerdo a Weisburg *et al.* (1991).

La mezcla de la carga para PCR-16S rRNA se realizó con las siguientes concentraciones:

Cuadro 4. Mezcla para carga de PCR-16S rRNA.

<u>Reactivo</u>	<u>1 tubo (100 <math>\mu</math>L)</u>
dNTP's	0.80 $\mu$ L
fD1	1.00 $\mu$ L
Rd1	1.00 $\mu$ L
MgCl <sup>++</sup>	3.00 $\mu$ L
Buffer 10X	10.00 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.08 $\mu$ L
DNA	1.50 $\mu$ L
<u>H<sub>2</sub>O MQ</u>	<u>83.70 <math>\mu</math>L</u>
Volumen final	100.00 $\mu$ L

Después, los productos de PCR se purificaron usando el Kit de Sistema de Purificación de Productos de PCR de Roche® y luego se enviaron a la Unidad de Secuenciación de la empresa Macrogen en Corea. Las secuencias obtenidas se compararon con otras secuencias de referencia obtenidas mediante la búsqueda de BLAST en GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Posteriormente, las secuencias se editaron con el software BIOEDIT v 7.2.5, y se alinearon usando el software CLUSTAL X (2.0). Utilizando el programa MEGA v 5.2 se construyeron árboles filogenéticos basados en las secuencias del gen rRNA 16S usando el algoritmo "Neighbour-Joining" (Saitou y Nei, 1987) con 1000 réplicas y utilizando el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993).

#### **6.5.4. Amplificación del gen plasmídico *nifH***

Para la amplificación del gen *nifH* mediante PCR se utilizó un termociclador de punto final Eppendorf Mastercycler 5333, con los cebadores IGK3 (GCI WTH TAY GGI AAR GGI GGI ATH GGI AA) y DVV (ATI GCR AAI CCI CCR CAI ACI ACR TC) (Gaby y Buckley, 2012). La programación fue la que se esquematiza en la figura 22:

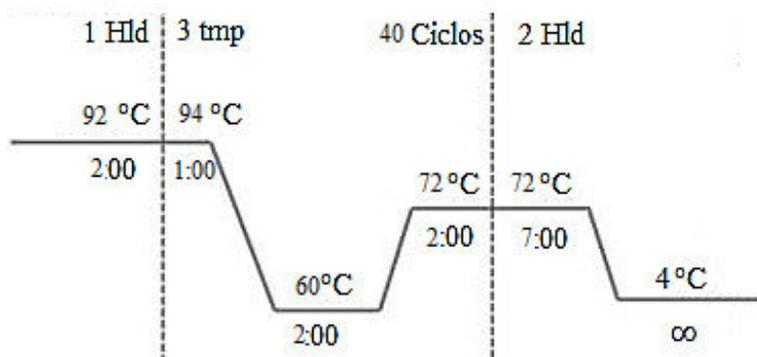


Figura 22. Programación para amplificación de *nifH*-PCR en termociclador.

La mezcla de la carga se realizó con las siguientes concentraciones:

Cuadro 5. Mezcla para carga de amplificación del gen *nifH*

Reactivo	1 tubo (10 µL)
dNTP's	0.72 µL
IGK3	0.45 µL
DVV	0.45 µL
MgCl <sup>++</sup>	0.45 µL
Buffer 10X	0.90 µL
Taq polimerasa	0.09 µL
DM50 (2%)	0.225 µL
DNA	1.00 µL
H <sub>2</sub> O MQ	5.75 µL
Volumen final	10.00 µL

Los amplicones se visualizaron a 356 bp en una electroforesis en gel de agarosa al 2% (80 V/30 min. Se usó como cepa control *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7 para detectar la amplificación del gen *nifH*. Los geles se revelaron en un Bio-Rad GelDoc™ EZ Imager (Zehr *et al.*, 2003).

### 6.5.5. Índices para medir la biodiversidad de la comunidad de halobacterias

Para medir la diversidad Alfa en la comunidad de bacterias halófilas se calculó la estructura con los índices de Dominancia de Simpson (1949) y el índice de Margalef (1958). En métodos no-paramétricos se midió la Riqueza Específica (S).

- Índice de Dominancia de Simpson

$$\lambda = \sum p_i^2$$

Donde:

$p_i$  = abundancia proporcional de la especie  $i$ , es decir, el número de individuos de la especie  $i$  dividido entre el número total de individuos de la muestra.

La frecuencia promedio de la especie  $i$  en el conjunto de comunidades, ponderada en función de la importancia de las comunidades ( $q_j$ ).

- Índice de Diversidad de Margalef

$$D_{Mg} = \frac{S-1}{\ln N}$$

Donde:

S = número de especies

N = número total de individuos

Transforma el número de especies por muestra a una proporción a la cual las especies son añadidas por expansión de la muestra.

- Riqueza específica (S)

Número total de especies obtenido por un censo de la comunidad.

## 6.6. Evaluación del potencial biotecnológico de las bacterias halófilas aisladas de un ambiente natural salino

El potencial biotecnológico de las cepas bacterianas aisladas se evaluó a través de las siguientes pruebas:

1. La capacidad de los aislados bacterianos para solubilizar el fosfato consistió en una prueba de carácter cualitativo, utilizando el medio de cultivo NBRIP (Nautiyal, 1999).
2. La habilidad para producir sideróforos se detectó al virar el medio CAS de azul a naranja-transparente (Louden *et. al.*, 2011). La preparación de este medio consistió en:

Solución Hierro (solución 1)..... 10 mL

(a) Preparación de 500 mL con HCl 10 mM (0.01M):

Se midió 125 ml de agua desionizada o doblemente destilada

Se añadió 411  $\mu$ L de HCl concentrado a los 125 mL de agua desionizada doblemente destilada.

Se ajustó a un volumen final de 500 mL usando agua desionizada o doblemente destilada.

(b) Preparación de 100 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ :

Se pesó 2.7 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  y se añadió 100 mL a la solución anterior (a).

(c) Preparación de la solución de hierro (10 mL):

Se midió 9.9 mL de la solución (a) y se añadió 0.1 mL de la solución (b). Esta solución es la de hierro o solución 1.

2. Solución CAS (solución 2) ..... 50 mL

Se disolvieron 0.065 g de CAS en 50 mL de agua desionizada o doblemente destilada.

3. Solución HDTMA (solución 3)..... 40 mL

Se disolvieron 0.073 g de HDTMA en 40 mL de agua desionizada o doblemente destilada.

- Preparación del colorante:
- Se mezcló solución 1 (Hierro) con solución 2 (CAS) ..... 60 mL

La mezcla anterior se agregó a la solución 3 (HDTMA) suavemente y en constante agitación.

Volumen final..... 100 mL

Se esterilizó en autoclave y se conservó en un recipiente de plástico.

- Medio de cultivo (LB o TSA) ..... 900 mL
  - Triptona ..... 9 g
  - Extracto de levadura..... 4.5 g
  - NaCl..... 9 g
  - Agar bacteriológico ..... 17 g
  - Agua destilada..... 850 mL

El pH se ajustó a 6.8

- Se esterilizaron por separado, sin agregar aún el colorante.
- Una vez esterilizados se mezcló bajo condiciones asépticas las dos soluciones.

5. La capacidad multifuncional para tolerar altas concentraciones de NaCl al 10,15 y 20%, pH de 3.5, 5.5, 8.5 y 10, temperaturas de 37 °C y 44 °C, y el potencial para crecer bajo la presencia de los metales pesados Aluminio y Cobre se realizó de acuerdo a lo descrito por Dorador *et al.* (2008).

6. Para evaluar la producción de extremoenzimas, las cepas bacterianas se cultivaron individualmente en caldo nutritivo en agitación durante la noche, posteriormente se utilizó un espectrofotómetro para ajustar la DO600 nm a 1.0, antes de la inoculación de las cepas en los medios de cultivos sólidos, para la visualización de producción de enzimas extracelulares, cada uno de los medios utilizados se describen a continuación:

▪ **Lipasa (Dastanger *et al.*, 2008)**

Se preparó agar nutritivo al volumen deseado adicionando CaCl<sub>2</sub> al 0.01% y NaCl 50 g/L, posteriormente se agregó 1% de Tween 80 y se mezcló hasta homogenizar. La prueba se tomó positiva cuando las bacterias generaron un halo blanquecino alrededor de la colonia crecida.

▪ **Amilasa (Kumar *et al.*, 2012)**

Se preparó medio sólido (g/L): 30 agar nutritivo, 10 almidón, 5 peptona, 3 extracto de levadura, 20 agar bacteriológico, 50 NaCl y se ajustó el pH a 7. Se inocularon e incubaron las placas durante 72 horas, la zona de digestión de almidón se determinó aplicando a las placas solución de yodo lugol.

▪ **Celulasa (Chand *et al.*, 2008)**

Se inocularon 50 µL de suspensión bacteriana en placas de CMC-agar (g/L): 2 NaNO<sub>3</sub>, 1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 KCl, 2 carboximetilcelulosa (CMC), 2 peptona, 17 agar bacteriológico. Las placas se dejaron incubar a 28 °C por 48 horas, después de la incubación se tiñeron con solución de yodo lugol de 3 a 5 minutos.

▪ **Proteasa (Fulzele *et al.*, 2011)**

Se prepararon medio en placas de agar de leche deslactosada con la siguiente composición (g/L): 5 peptona, 3 extracto de levadura, 1 de leche deslactosada. Se inocularon las cepas bacterianas en cada placa y se incubaron a 30°C durante 24 h. La actividad se tomó positiva si después de la incubación aparece una zona clara alrededor de la colonia bacteriana.

▪ **Asparaginasa y glutaminasa (Shirazain, 2016)**

Se preparó medio sólido en placa con la siguiente composición (g/L): 6  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 NaCl, 5 L-asparagina o L-glutamina, 0.5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 glucosa, 20 de agar bacteriológico y se añadió azul de bromotimol 3% (p/v) como indicador. Se incubaron a 37°C durante 48 h. El cambio de color del medio a un tono azul alrededor de las colonias bacterianas se tomó como positiva la actividad enzimática.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Composición físico-química del manantial Las Salinas

Una característica destacable de este entorno, es la diferencia de pH. En el sedimento el pH es un valor básico, y en el agua es ligeramente ácido. La temperatura se mantiene en grados cercanos en agua y sedimento. En un monitoreo geoquímico de un sistema evaporítico natural del Salar de Huasco, un sitio que se ubica dentro del desierto de Atacama, Chile, uno de los grandes terrenos salares a nivel mundial, Garcés y López (2010) midieron los elementos de agua de salmuera y sedimento del lugar encontrando los siguientes valores: 27.43 g/L en cloro ( $\text{Cl}^{-1}$ ), 0.29 g/L en calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), 1.33 g/L en magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), 11.52 g/L en sodio ( $\text{Na}^{+}$ ) y 4.45 g/L en potasio ( $\text{K}^{+}$ ).

Los datos del manantial Las Salinas se acercan a los valores que se registraron en este salar de Atacama, destaca la concentración de calcio, con valores similares entre este sitio en Chile, y el manantial en Chiapas. La concentración de calcio genera calcita y carbonato de calcio, compuesto clave en salares de paleolagos que se conectaban con mar abierto en un pasado geológico.

Extrapolando nuevamente lugares marinos, las chimeneas hidrotermales reportan grandes cantidades de Hierro y Manganeso, aunque los niveles son bajos en el manantial, se podría considerar que la presencia de estos elementos sugiere ser un remanente de la evolución paleoceanográfica que atravesó este ambiente.

La Conductividad eléctrica (CE) que es una medida para conocer la concentración total de componentes iónicos, en la salinidad de agua y sedimento hay una variación, el sedimento tienen mayor salinidad que el agua, este resultado apoya la idea, de que existe en el manantial “Las Salinas” y sus alrededores depósitos estuarinos-marinos, en donde el agua subterránea que se filtra del Río La Salina y otras fuentes acuíferas (cuencas endorreicas) disuelven la sal de los depósitos estuarinos que se desprenden del sedimento. Haciendo hincapié en la salinidad, el agua del mar posee una CE de 50 mS/cm (Roldán y Ramirez, 2008), mientras que la del agua del manantial es de 57.15 mS/cm y del sedimento 64.2 mS/cm.

Estos datos permiten hacer una reconstrucción del origen y naturaleza del manantial a través de los valores de factores fisicoquímicos y elementales que existen en el agua y sedimento.

Otros datos que se registraron en el manantial, fue la concentración de carbono de 2.244% y 1.817% y agua, en donde no toda la materia es orgánica, de acuerdo a lo ya comentado en resultados previos, el origen estuarino permitió el reciclaje de restos de materia vegetal y animal que quedaron alojados desde el Mioceno, este carbono en estado recalcitrante se encuentra secuestrado en el sedimento y agua, en compuestos como calcita y carbonato de calcio, este ecosistema salino funciona como un reservorio de carbono, esto se ve reflejado en el amplio radio de la relación C/N y los porcentajes bajos de nitrógeno de 0.127% en sedimento y 0.115% en agua, y en fósforo de 0.179% en sedimento y 0.108% en agua, por lo tanto consorcios bacterianos tuvieron que desarrollar mecanismos que les permitieran consumir fuentes nitrogenadas con éxito, esta idea se apoya con las cuatro cepas que poseen la capacidad de fijar nitrógeno, la competencia por fuentes nitrogenadas limitan a las cepas de este ambiente a competir por recursos, por lo tanto, las poblaciones de cada especie suelen ser poco numerosas, tal como se calculó en los índices ecológicos.

Los eventos de producción de carbonatados en el manantial surgen por la precipitación que las bacterias generan al formar microentornos, de tal forma que la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  bacteriana se posiciona hacia el exterior de la célula, y la bomba de  $\text{Mg}^{2+}$  hacia el interior, esto provoca que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  se adsorbe con mayor frecuencia respecto al ion  $\text{Mg}^{2+}$  en la envoltura celular, cargándose negativamente la superficie de las bacterias (Maier *et al.*, 2000).

Al producir iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , los cambios que se generan en el ambiente, junto con la concentración de iones en las envolturas celulares, sobre todo la adsorción de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , impulsarán la sobresaturación local de dichos iones, lo que conducirá a la precipitación de minerales carbonatados (Rosen, 1987).

Este proceso metabólico bacteriano genera un ambiente alcalino global, en particular, el metabolismo del nitrógeno orgánico como la desaminación oxidativa aeróbica de los aminoácidos y la reducción de nitrato, conducen al aumento del valor del pH en el entorno circundante (De Munynck *et al.*, 2010). El cambio de pH del medio

de condiciones neutras a alcalinas facilita la precipitación del carbonato de calcio (Morita, 1980), debido al pH del agua las cepas de Las Salinas tienden a ser de naturaleza haloalcalófila.

Esto demuestra que las bacterias no son simplemente núcleos heterogéneos para la precipitación, sino que son mediadores activos en procesos de mineralización (Morita, 1980).

Finalmente, por las características elementales y fisicoquímicas este ambiente salino puede ser categorizado como talasohalinos, un entorno que se derivó de la evaporación de agua de mar, produciendo salmueras que contienen una similitud en la composición iónica que hay en el mar en su etapa inicial de establecimiento, con pH que permanece entre 6-8 (Cuadro 6 y 7), con una precipitación secuencial de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ), hasta que finalmente alcance una saturación y se precipiten como halita (Horikoshi y Bull, 2011).

Cuadro 6. Elementos químicos (iones) determinados en muestras de agua y sedimento del manantial Las Salinas.

Elemento	Concentración (g/L)	
	Agua	Sedimento
Potasio inter ( $\text{K}^+$ )	1.95* $\pm$ (0.55)**	1.16 $\pm$ (0.32)
Calcio inter ( $\text{Ca}^{2+}$ )	0.32 $\pm$ (0.13)	0.19 $\pm$ (0.07)
Magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ )	1.66 $\pm$ (0.53)	0.99 $\pm$ (0.11)
Cloro ( $\text{Cl}^-$ )	22.24 $\pm$ (4.08)	13.27 $\pm$ (2.03)
Sodio ( $\text{Na}^+$ )	10.25 $\pm$ (0.76)	6.11 $\pm$ (0.45)
Fierro ( $\text{Fe}^{2+}$ )	0.04 $\pm$ (0.02)	0.02 $\pm$ (0.01)
Manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ )	0.72 $\pm$ (0.27)	0.42 $\pm$ (0.06)

\*Los valores de los parámetros son el resultado de promedio de tres repeticiones.

\*\* Los valores dentro del paréntesis corresponden a la desviación estándar

Cuadro 7. Características fisicoquímicas de las muestras de agua y sedimento del manantial Las Salinas.

Factor Físico-químico	Valor	
	Agua	Sedimento
pH	6.35 $\pm$ (0.07)**	7.89 $\pm$ (0.03)
Conductividad eléctrica (EC) dS/cm	57.15 $\pm$ (0.52)	64.2 $\pm$ (0.49)
Temperatura (°C)	24.1 $\pm$ (0.49)	24.3 $\pm$ (0.39)
Fosforo Total (%)	0.179 $\pm$ (0.04)	0.108 $\pm$ (0.06)
Nitrógeno Total (%)	0.127* $\pm$ (0.08)**	0.115 $\pm$ (0.05)
Carbono Total (%)	2.244 $\pm$ (0.1)	1.817 $\pm$ (0.3)
Relación C/N	17.6 $\pm$ (0.17)	15.8 $\pm$ (0.14)

\*Los valores de los parámetros son el resultado de promedio de tres repeticiones.

\*\* Los valores dentro del paréntesis corresponden a la desviación estándar

## 7.2. Características fenotípicas

En la tinción de diferenciación celular, 13 de las distintas cepas representativas poseen doble membrana celular por lo que están categorizadas como negativas dentro de la clasificación de Gram y solo tres cepas corresponden a Gram positivas (Cuadro 8). La morfología celular dominante es bacilos y en algunos casos, están en cadena, de tipo estreptobacilos, como la cepa TSS-4 y TSA-31, la forma menos abundante fue la de cocos para las cepas TSS1 y TSS3.

Cuadro 8. Características fenotípicas de las bacterias aisladas del manantial Las Salinas.

Nombre de Cepa	Especie con las que está estrechamente relacionada	Clasificación Gram	Morfología Celular	Forma de la colonia	Color de la colonia	Textura de la colonia
<b>TSS-1</b>	<i>Kocuria rosae</i>	-	Cocos	Circular	Fucsia	Mucosa
<b>TSS-3</b>	<i>Exiguobacterium profundum</i>	+	Cocos	Circular	Crema	Semicremosa
<b>TSS-4</b>	<i>Bacillus indicus</i>	-	Estreptobacilos	Semicircular	Melón	Semicremosa
<b>TSA-31</b>	<i>Salinicola salaries</i>	-	Estreptobacilos	Circular	Nuéz claro	Mucosa
<b>TSA-35</b>	<i>Oceanobacillus aidingensis</i>	-	Bacilos	Circular	Blanquecina	Cremosa
<b>SAL-1</b>	<i>Bacillus marmarensis</i>	+	Bacilos	Circular	Amarillenta	Semicremosa
<b>SAL-3</b>	<i>Halomonas axialensis</i>	-	Bacilos	Circulas	Blanquecina	Cremosa
<b>SSW-3</b>	<i>Halomonas zhaodongensis</i>	-	Bacilos	Circular	Blanquecina	Semicremosa
<b>ASW-8</b>	<i>Halomonas titanicae</i>	-	Bacilos	Circular	Blanquecina	Semicremosa
<b>SSW-9</b>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	Bacilos	Irregular-coralina	Amarillenta	Semicostrosa
<b>SSW-14</b>	<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	-	Bacilos	Circular	Amarillo-blanquecina	Semicremosa
<b>SSW-15</b>	<i>Agromyces aurantiacus</i>	+	Bacilos	Irregular	Amarillento	Seco
<b>ASW-1</b>	<i>Pseudomonas pelagia</i>	-	Bacilos	Semicircular	Crema	Semicremosa
<b>ASW-11</b>	<i>Halomonas axialensis</i>	-	Bacilos	Circular	Crema	Cremosa
<b>ASW-12</b>	<i>Halomonas boliviensis.</i>	-	Bacilos	Circular	Crema	Cremosa
<b>ASW-18</b>	<i>Halomonas sulfidaeris</i>	-	Bacilos	Circular	Crema	Cremosa

### 7.3. Características genotípicas

Se obtuvo el ADN de 88 cepas con un kit de extracción de ADN genómico bacteriano, la calidad de las extracciones se evaluó en gel de agarosa (Figura 23). A través de una lectura de huellas genómicas BOX-PCR se redujo el número de cepas que compartían bandas. Aquellas que no amplificaron no se tomaron en cuenta.

De acuerdo a estudios genéticos de biodiversidad en microorganismos extremófilos reportan que las paredes celulares están estructuradas a base lípidos que dificultan la ruptura para la extracción de ADN con los materiales que se incluyen en los kits de extracción, es ello una posible causa de que en algunos ADN no se visualizaron bandas.

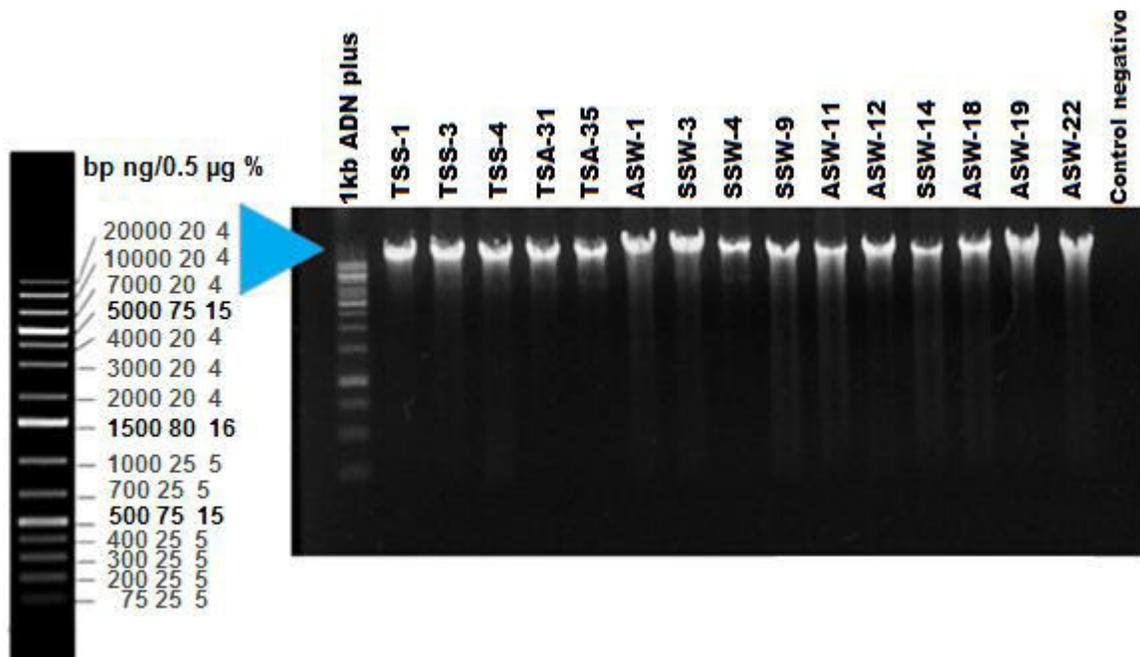


Figura 23. ADN genómico de cepas bacterianas halófilas.

#### 7.3.1. Huellas genómicas de bacterias halófilas

En el screening de BOX-PCR, el número de cepas estudiadas se redujo a 40 grupos de cepas, 10 en medio TSA y 30 cepas recuperadas del medio Winogradsky (figura 24 y 25).

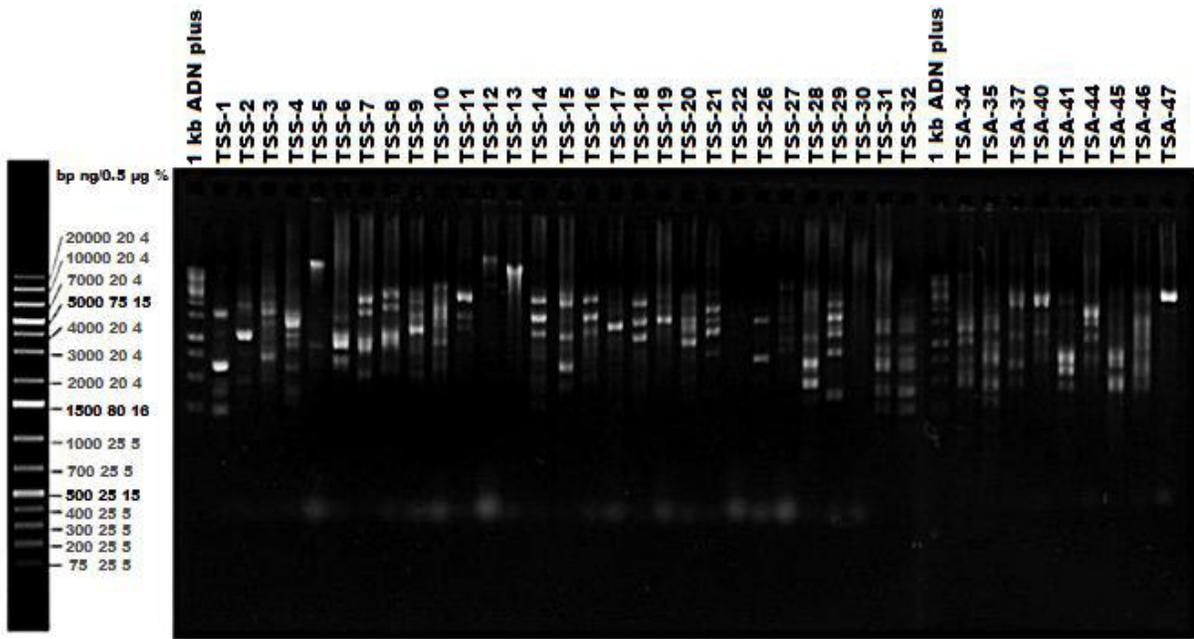


Figura 24. Perfil genómico BOX-PCR de cepas bacterianas halófilas aisladas del manantial Las Salinas usando el medio TSA.

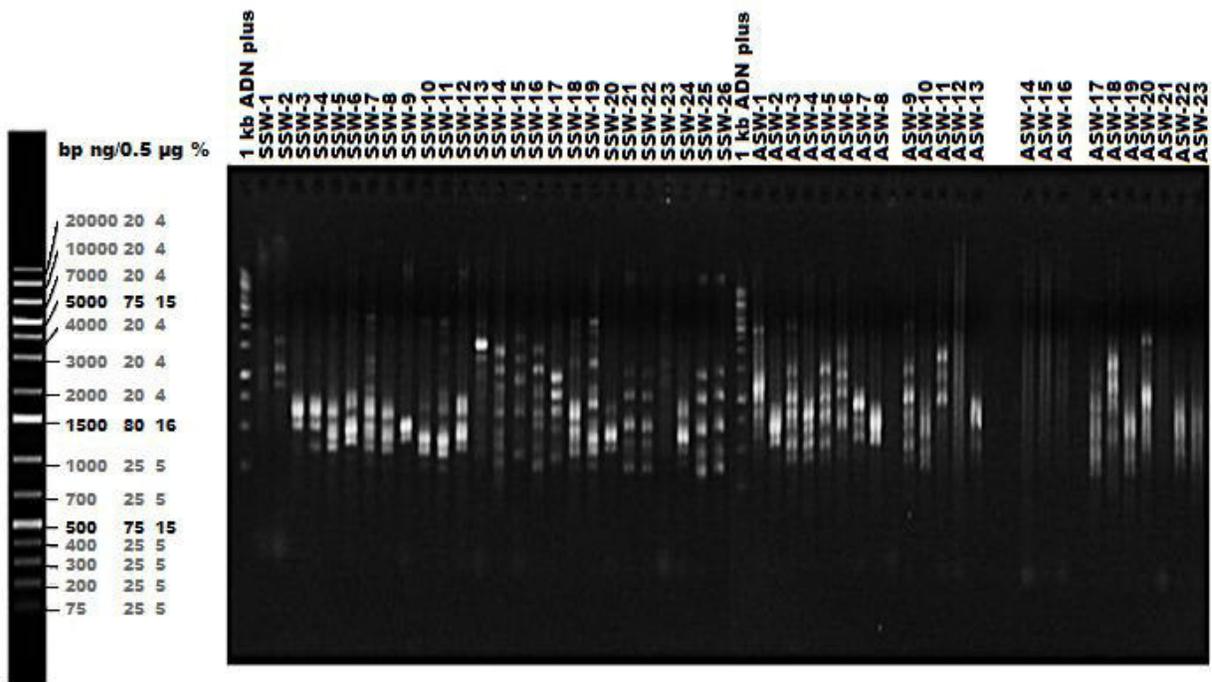


Figura 25. Perfil genómico BOX-PCR de las cepas bacterianas aisladas del manantial Las Salinas usando el medio Winogradsky.

### 7.3.2. Amplificación del gen cromosomal 16S ADNr

Los amplicones que corresponden al gen 16S ADNr de algunas de cepas bacterianas halófilas representativas se muestra en la Figura 26. La electroforesis en gel de agarosa al 1% permitió apreciar la integridad y calidad de los amplicones, los cuales tuvieron un tamaño aproximado de **1500 pb**. El análisis por NanoDrop usando una absorbancia de A260/280 permitió corroborar una concentración aproximadamente de **90 a 100 ng/μL**, la cual es adecuada para el secuenciamiento genético.

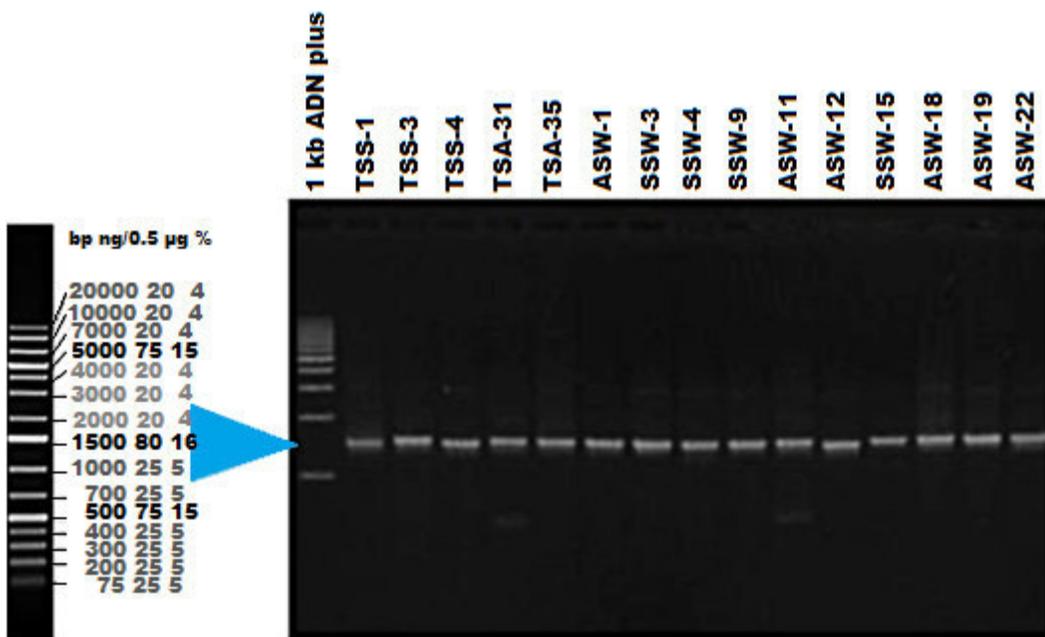


Figura 26. Amplificación del gen 16S ADNr de algunas cepas bacterianas halófilas aisladas del manantial Las Salinas.

### 7.3.3. Perfiles genómicos ARDRA

Se realizó la digestión de los productos de PCR del gen 16S de las cepas bacterianas halófilas representativas con la enzima *A<sub>lu</sub> I*. En la selección de cepas por identidad 16S ribosomal, con la aplicación de la técnica de ARDRA (Figura 27 y 28), los grupos de cepas se redujeron a 16 especies diferentes, 6 de agua y 10 de sedimento. El género con mayor abundancia fue *Halomonas*, con miembros que habitan tanto en agua como en sedimento.

La clase de bacteria con mayores integrantes registrados corresponde a Gammaproteobacteria con 10 miembros, la clase Bacilli es el segundo grupo con 4 integrantes, y la menos abundante fue la clase Actinobacteria con 2 especies.

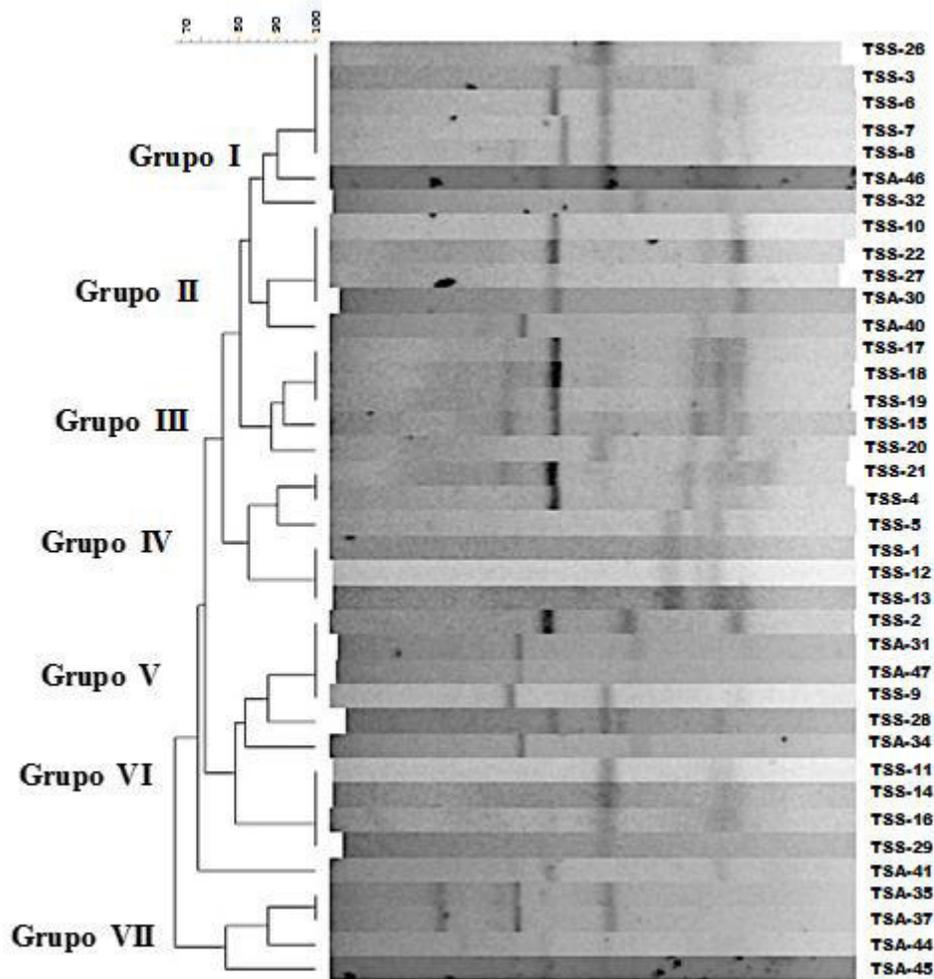


Figura 27. ARDRA de muestras de cepas del medio TSA.

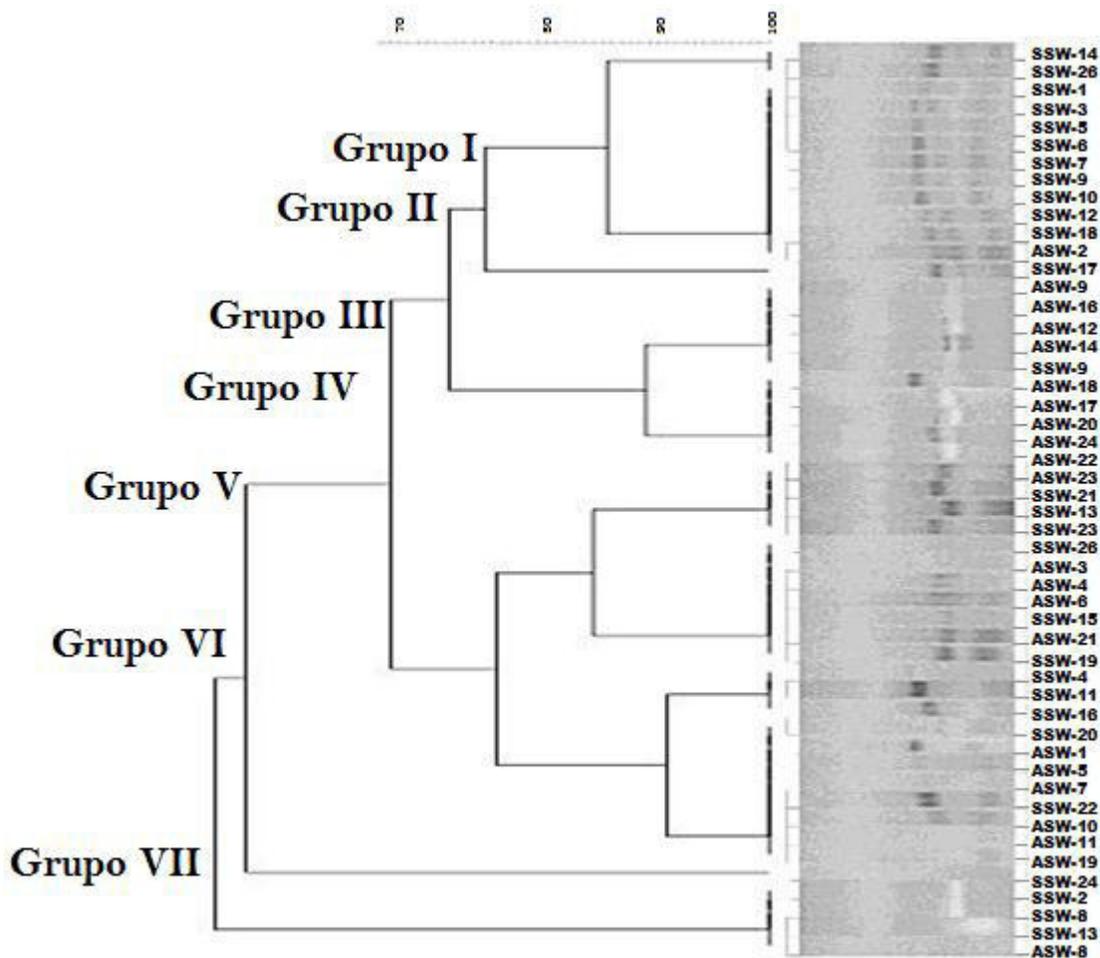


Figura 28. ARDRA de muestras de cepas del medio Winogradsky.

#### 7.4. Análisis filogenético y construcción de árboles

Un total de 16 especies diferentes se registraron, seis cepas están dentro del género *Halomonas*, tres especies en el grupo de las *Pseudomonas*, dos en *Bacillus*, y para los géneros *Salinicola*, *Kocuria*, *Exogobacterium*, *Oceanobacillus* y *Agromyces* solo se aisló una especie. La extensión de los nucleótidos que comparten con las especies tipo, el porcentaje de similitud y la clase están registrados en el cuadro 9, todos estos aspectos se siguieron de acuerdo a lo que establece la clasificación de Bergey.

Cuadro 9. Identificación molecular de bacterias del manantial Las Salinas.

Cepa bacteriana	Relación filogenética de acuerdo a secuencia del gen 16S rRNA	% de similitud	Fuente de aislamiento	Clase bacteriana
TSS-1	<i>Kocuria rosae</i> DSM 20447	99	Sedimento	Actinobacteria
TSS-3	<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C	99	Sedimento	Bacilli
TSS-4	<i>Bacillus indicus</i> Sd/3	99	Sedimento	Bacilli
TSA-31	<i>Salinicola salarii</i> 0285	99	Agua	Gammaproteobacteria
TSA-35	<i>Oceanobacillus ailingensis</i> AD7-25	97	Agua	Bacilli
SAL-1	<i>Bacillus marmarensis</i> GMBE72	97	Sedimento	Bacilli
SAL-3	<i>Halomonas axialensis</i> Althf1	99	Sedimento	Gammaproteobacteria
SSW-3	<i>Halomonas zhaodongensis</i> NEAU-ST10-25	99	Agua	Gammaproteobacteria
ASW-8	<i>Halomonas titanicae</i> H5	99	Agua	Gammaproteobacteria
SSW-9	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588	100	Sedimento	Gammaproteobacteria
SSW-14	<i>Pseudomonas knackmussii</i> B13	96	Sedimento	Gammaproteobacteria
SSW-15	<i>Agromyces indicus</i> NIO-1018	99	Sedimento	Actinobacteria
ASW-1	<i>Pseudomonas pelagia</i> CL-AP6	97	Agua	Gammaproteobacteria
ASW-11	<i>Halomonas sulfidaeris</i> Esulfide1	98	Agua	Gammaproteobacteria
ASW-12	<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS	100	Agua	Gammaproteobacteria
ASW-18	<i>Halomonas profundus</i> AT1214	98	Agua	Gammaproteobacteria

Manual de <sup>8</sup>Bergey 2004: www. bergeys.org.

El parentesco filogenético de cada cepa está esquematizado en los cladogramas a partir de la figura 30 a la 37. En estas figuras el círculo amarillo indica que la cepa fue recuperada del sedimento, en cambio, el círculo azul indica que la cepa se aisló de agua salina.

Cabe destacar que si bien, las especies con las que comparten similitud genética han sido aisladas de lugares salinos, algo sorpresivo es aislar especies del género *Agromyces* en lugares extremos, y en especial *A. indicus* de vida libre no ha sido reportada en un lugar hipersalino, sin embargo la cepa SSW-15 tienen una alta similitud de un 99% con *A. indicus*, de ser la misma especie, sería el primer reporte de esta bacteria en un lugar hipersalino, además nunca se ha mencionado en estudios moleculares que especies de *H. alkaliantarctica*, *H. sulfidaeris* y *H. profundus* y *A. indicus* amplifiquen el gen *nifH*, sin embargo, las cepas ASW-12, ASW-

11, ASW-18 y SSW-15 amplificaron el gen *nifH* (Figura 29) y tienen alta similitud genética con las especies de halófilas previamente mencionadas.

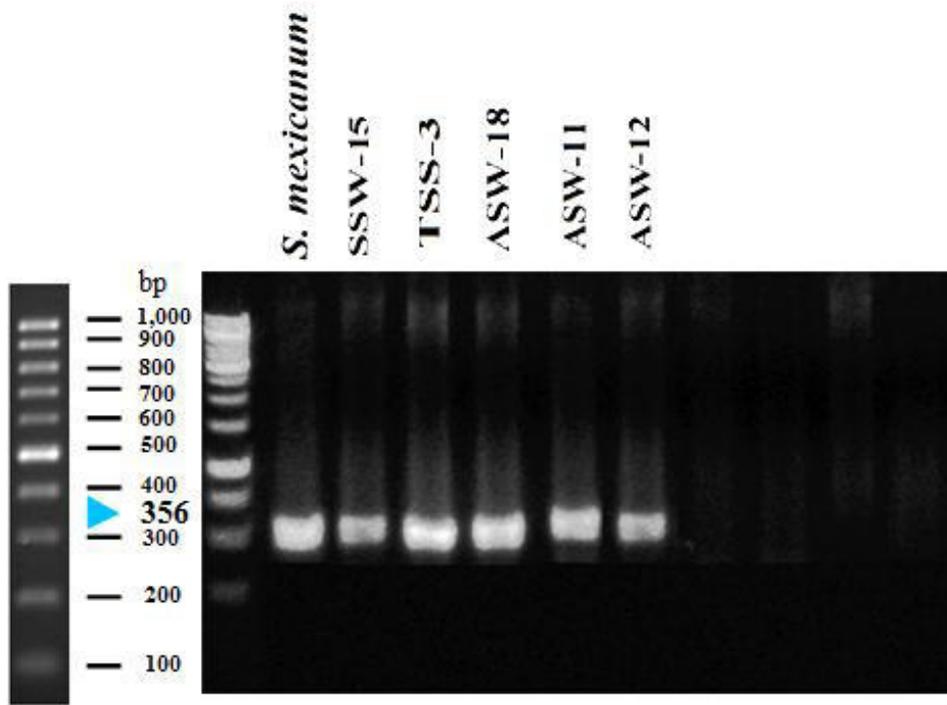


Figura 29. Gen *nifH* (356 bp) amplificado por las cepas bacterianas halófilas del manantial Las Salinas.

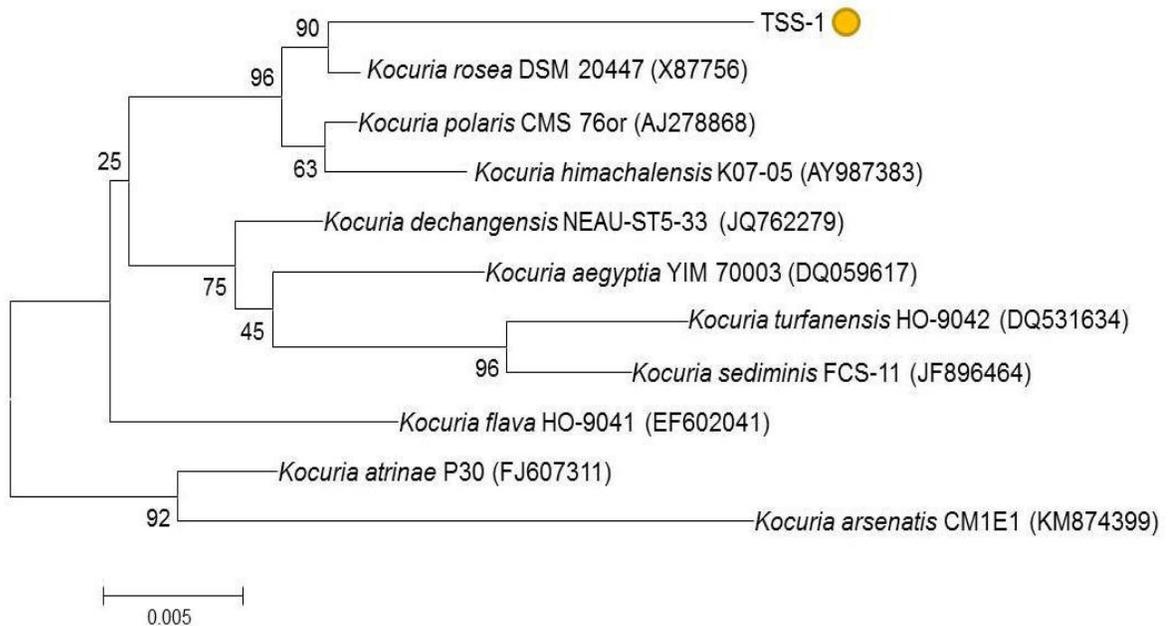


Figura 30. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa *Kocuria* TSS-1.

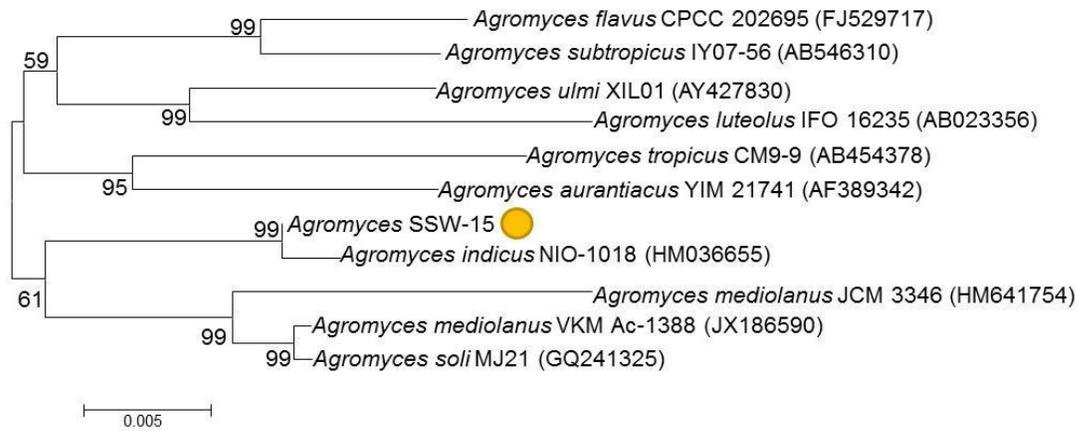


Figura 31. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa *Agromyces* SSW-15.

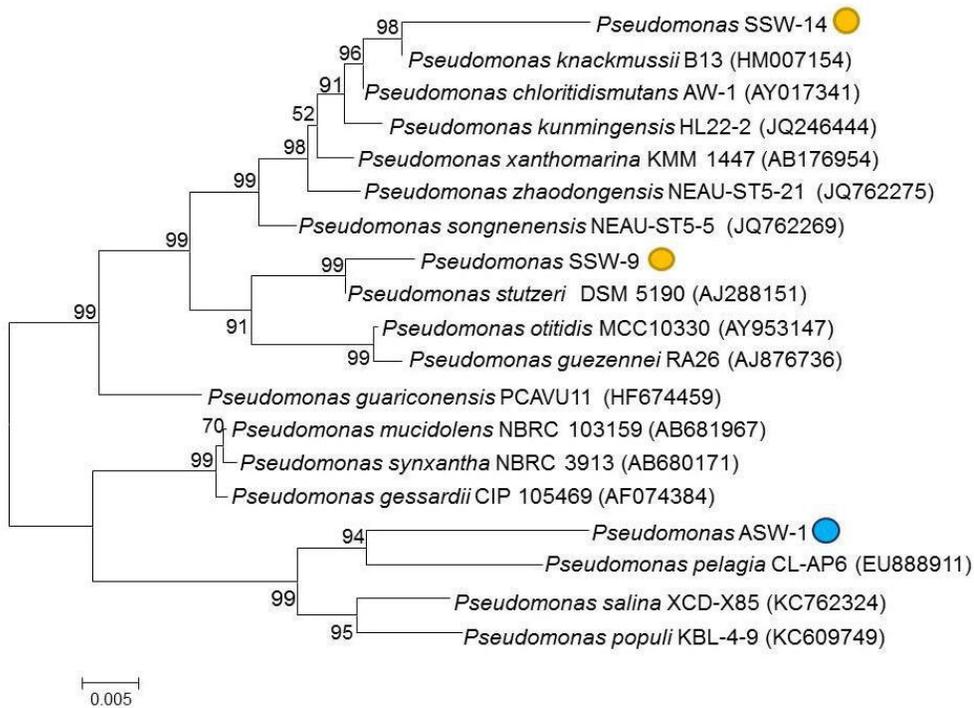


Figura 32. Árbol filogenético Neighbour-Joining de las Cepas *Pseudomonas* ASW-1 y SSW-14.

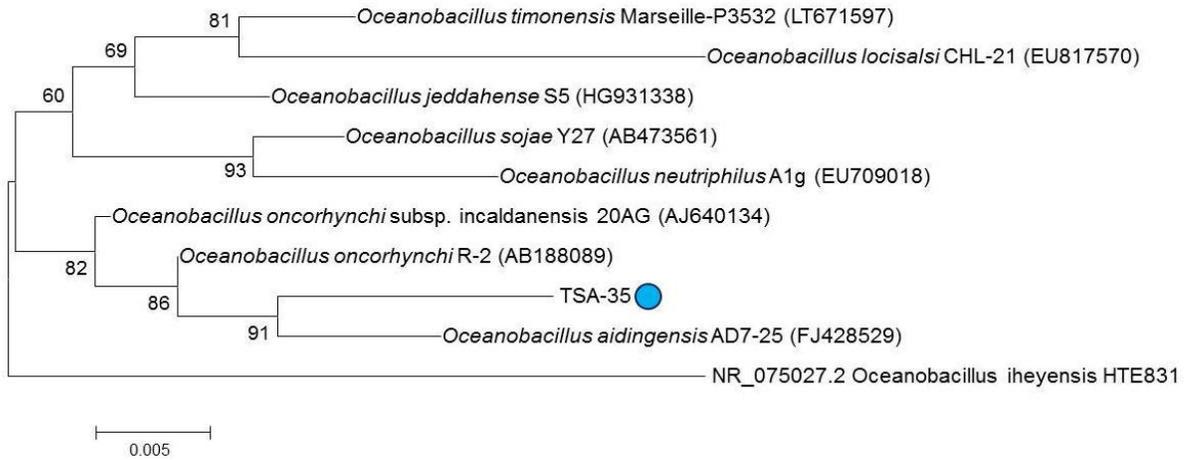


Figura 33. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa *Oceanobacillus* TSA-35.

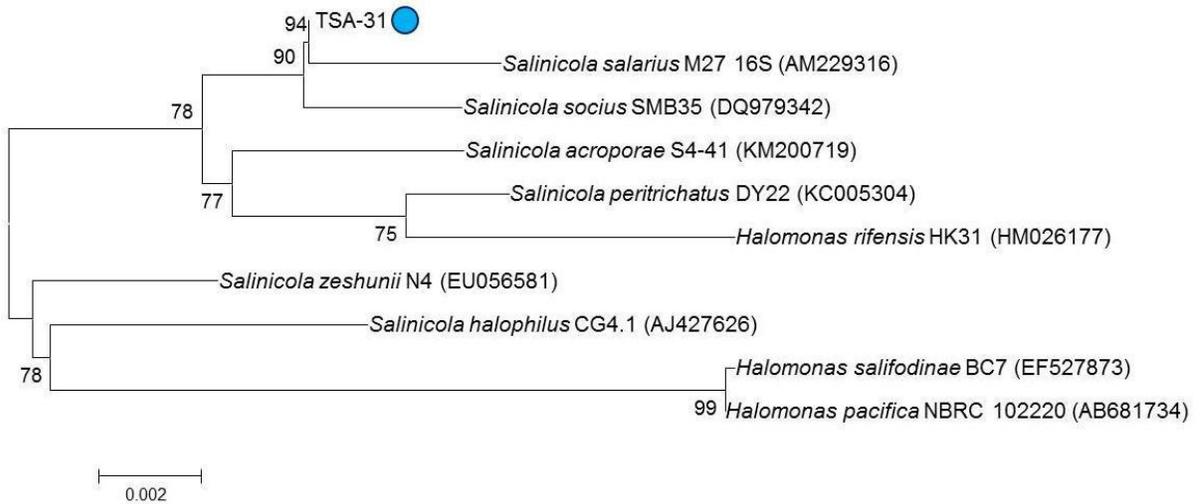


Figura 34. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa *Salinicola* TSA-31.

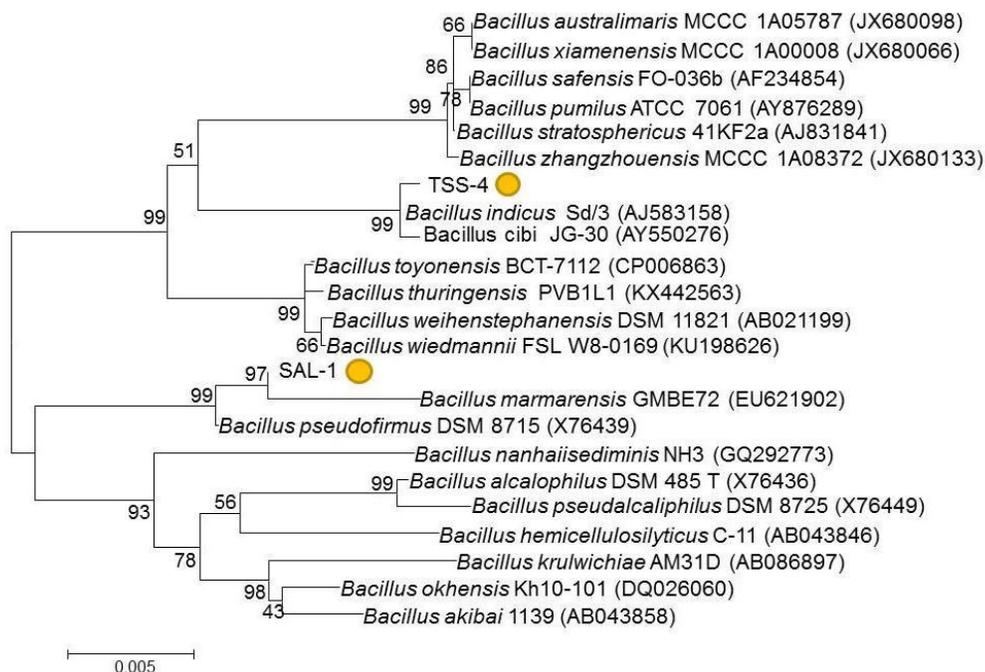


Figura 35. Árbol filogenético Neighbour-Joining Cepas *Bacillus* SAL-1 y TSS-4.

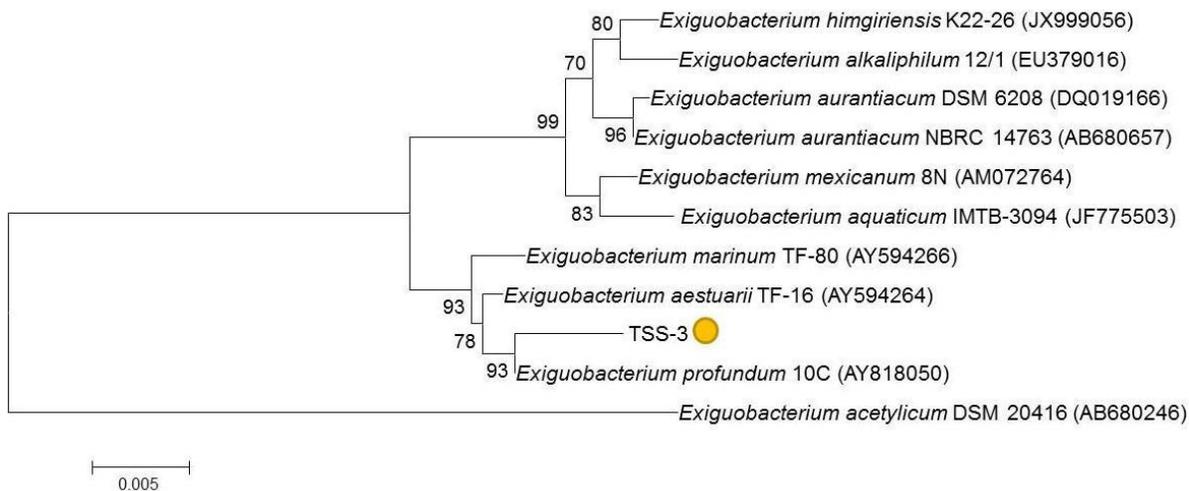


Figura 36. Árbol filogenético Neighbour-Joining de la Cepa *Exiguobacterium* TSS-3.

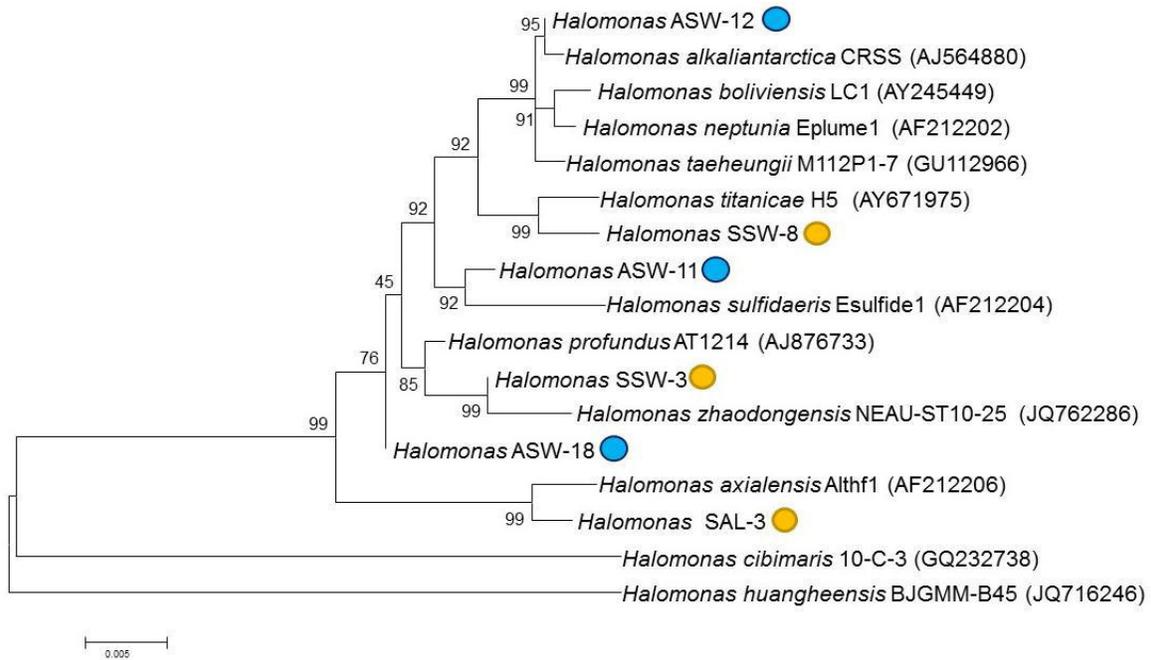


Figura 37. Árbol filogenético Neighbour-Joining de las cepas *Halomonas* SAL-3, SSW-4-ASW-18, ASW-12, ASW-19, ASW-22, ASW-8, SSW-3 y ASW-11.

Las secuencias del gen 16S RNAr fueron depositadas en el GenBank database bajo los siguientes números de registro: *Agromyces* sp. MH221130, *Bacillus* sp. MH221131, *Exiguobacterium* sp. MH221132, *Halomonas* sp. MH221133, *Halomonas* sp. MH221134, *Halomonas* sp. MH221135, *Halomonas* sp. MH221136, *Kocuria* sp. MH221137, *Oceanobacillus* sp. MH221138, *Pseudomonas* sp. MH221139, *Pseudomonas* sp. MH221140, *Salinicola* sp. MH221141.

## 7.5. Índices ecológicos para medir la biodiversidad de bacterias en el manantial Las Salinas

Los índices de Simpson calculados en la estructura de la comunidad, informan que las halófilas del sedimento contienen por cada grupo taxonómico, pocos o únicos integrantes, si se manejan porcentajes, en una muestra de agua para que se consiga aislar aleatoriamente dos o más cepas del mismo grupo, existe una probabilidad del 25%, mientras que en el sedimento existe una probabilidad del 21%.

Si se relaciona el censo de la riqueza específica de 10 especies de bacterias en sedimento con las seis especies de agua y se extrapola el valor del índice de Margalef, el sedimento se posiciona como un sitio con buena biodiversidad. El valor calculado en el agua inferior a 2 indica una menor diversidad, por lo tanto las halófilas buscan recursos elementales y condiciones fisicoquímicas que puedan ser aprovechadas, y en el sedimento se reúnen condiciones más favorables que en el agua, esto posiblemente ha conducido a que exista una mayor demanda por espacio y mayor competencia por recursos en el sedimento, esto se refleja en la importancia que invierten en el mantenimiento celular, con bajas tasas de reproducción, por ello hay baja tasa de integrantes o integrantes únicos en la población de algunos grupos taxonómicos aislados.

Todo el aprovechamiento y las fuentes que han destinado las halobacterias para obtener energía se expondrán a mayor detalle más adelante.

Cuadro 10. Valores de índices ecológicos de bacterias halófilas de Las Salinas.

Índice	Valor
▪ Índice de Simpson en halófilas aisladas de agua	$\lambda=0.25$
▪ Índice de Simpson en halófilas aisladas de sedimento	$\lambda =0.21$
▪ Índice de Margalef en halófilas aisladas de agua	$D_{Mg}= 1.66$
▪ Índice de Margalef en halófilas aisladas de sedimento	$D_{Mg}= 3.00$
▪ Índice de Jaccard en halófilas aisladas del manantial	$I_J= 0.836$

## 7.6. Capacidad multifuncional de bacterias aisladas del manantial Las Salinas

Las cepas aisladas no son extremadamente hiperhalófilas, no toleran crecer a 30% de NaCl en donde la sal se satura y se cristaliza en el agua, sin embargo, si se desarrollan en concentraciones de NaCl al 20% las siguientes cepas: SSW-15, TSA-35, TSA-31, ASW-8, ASW-11, ASW-18 y ASW-12. En la categorización que propuso Kushner (1993) para el estudio de halófilos, las cepas recientemente mencionadas son extremadamente halófilas porque crecen con NaCl de 9-23%. Las cepas restantes registradas que se mencionan forman parte de halófilos moderados por requerir NaCl en cantidades del 3-15%: TSS-3, TSS-4 y SSW-9.

Además manejan una versatilidad a distintos pH, sus células crecen en escalas de 5.5 a 11.5, pero tienen mejor desarrollo en pH alcalinos, sus colonias emiten pigmentos naranjas y rosáceos de alta intensidad, esta afinidad por pH alcalino las vincula a ser haloalcalófilas, además las 15 cepas resisten a la exposición de Cobre y Aluminio en cantidades que resultan ser tóxicas para el resto de microorganismos y poseen la capacidad de quelar hierro, este desempeño que tienen sobre estos metales puede estar vinculado a una exposición frecuente de precipitación de minerales por actividad volcánica. En Ixtapa existen aguas termales vigentes en El Carrizal y en Francisco Romo Serrano, además hay cavidades geológicas formadas a partir de filtraciones de agua, estas son las grutas en Santa Bárbara, Concepción y el Zapotillo (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2019).

En el desempeño enzimático, ninguna cepa digiere la beta galactosidasa en la prueba de indol, las lecturas dieron negativo, y ninguna de estas bacterias participa en la reducción de ácido sulfhídrico, pero 13 bacterias poseen la enzima nitrato reductasa o nitrito reductasa, o ambas, y nuevamente se hace énfasis en el gen *nifH* que poseen 4 cepas. Esta inversión energética provee datos de la naturaleza del manantial.

Algo inesperado fue la actividad de celulasa en seis cepas, en un sitio confinado donde no hay vida vegetal macroscópica, en tanto en el desempeño de lipasas como en proteasas solo dos cepas dieron positivo al test, en el consumo de almidón a través de amilasa tres cepas tienen esta funcionalidad.

El consumo de ciertos azúcares por las halófilas está vinculado a la capacidad para incorporar sin metabolizar azúcares u oxidar de forma incompleta, tienen como prioridad almacenar en el interior celular estos azúcares y utilizarlos como solutos compatibles, que les de apoyo osmótico para la presión que se ejerce en entornos salinos. Los azúcares no generan cargas eléctricas, por eso el proceso en la oxidación de azúcares es en muchos casos incompleta para producir ácidos que generen carga eléctrica, este es el motivo por el cual rechazan el consumo de algunos azúcares.

Una actividad sobresaliente en la cepa ASW-18 fue el cambio de color del medio que fue preparado con L-glutamina. Esta cepa no cambio el tono del medio a azul, si no a matices rojos. Las cepas que dieron positivo para la actividad de glutaminasa pigmentaron un halo azul alrededor de donde crecieron. Un dato clave de la cepa ASW-18 es que comparte alta similitud genética con la especie *Halomonas profundus* aislada cerca de un respiradero hidrotermal ubicado en La dorsal mesoatlántica.

La mayoría de las cepas son excelentes productoras de exopolisacáridos (EPS), principalmente las cepas que son integrantes del género *Halomonas*.

El perfil enzimático-multifuncional de la actividad de cada cepa se formula en el mapa de calor de la figura 38:

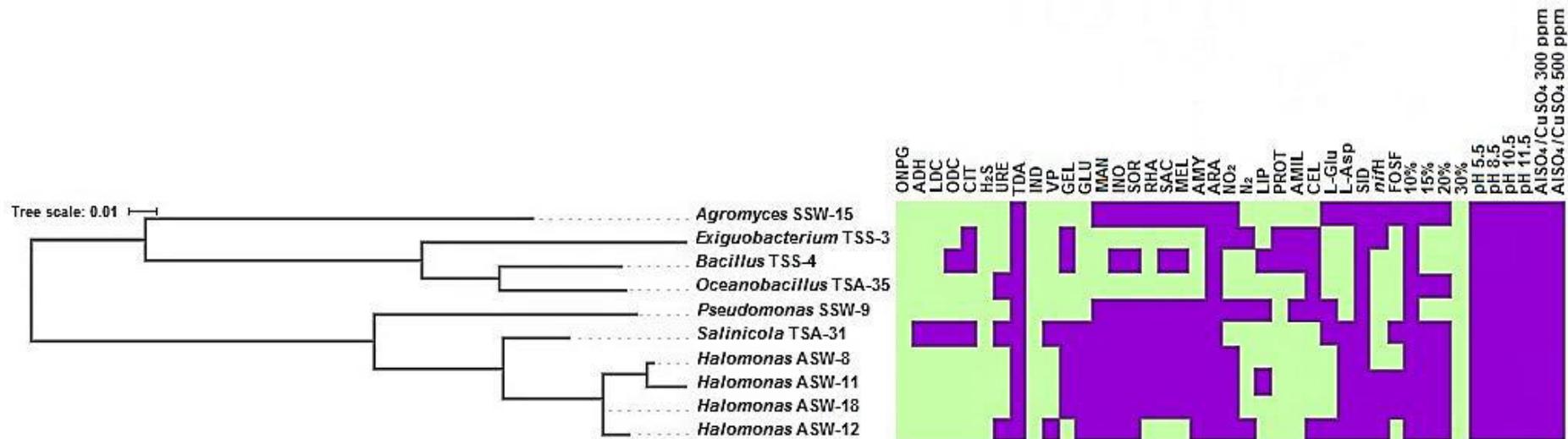


Figura 38. Perfiles enzimáticos-multifuncionales de halófilas de Las Salinas. Las abreviaturas en el heat map son desglosadas a continuación. ONPG: Beta galactosidasa., ADH: Arginina deshidrolasa ., LDC: lisisna descarboxilasa ., ODC: Ornitina descarboxilasa., CIT: Utilización del citrato., H<sub>2</sub>S: Producción de ácido sulfhídrico ., URE: Ureasa., TDA: Triptofano desaminasa., IND: Producción de indol., VP: Producción de acetoina., GEL: Gelatinasa., GLU: Fermentación/oxidación de glucosa., INO: Fermentación/oxidación de inositol., SOR: Fermentación/oxidación de sorbitol., RHA: Fermentación/oxidación de ramnosa., SAC: Fermentación/oxidación de sacarosa., MEL: Fermentación/oxidación de melobiosa., AMY: Fermentación/oxidación de amigdalina., ARA: Fermentación/oxidación de arabinosa., NO<sub>2</sub>: Reducción de Nitratos., N<sub>2</sub>: Reducción de Nitritos., LIP: Lipasa., PROT: Proteasa., AMIL: Amilasa., CEL: Celusasa., L-Glu: L-glutaminasa., L-Asp: L-asparaginasa., SID: Producción de sideroforo., *nifH*: Gen *nifH*., FOSF: Solubilización de fosforo., Tolerancia de salinidad (10, 15, 20, 30)., Tolerancia de pH 5.5, 8.5, 10.5, 11.5 ., Tolerancia a 300 ppm de CuSO<sub>4</sub> y AlSO<sub>4</sub> ., Tolerancia a 500 ppm de CuSO<sub>4</sub> y AlSO<sub>4</sub>.

## 7.7. Distribución geográfica actual y recorrido paleogeográfico

A través del software GPlates versión 2.00 y plantillas desarrolladas por el Dr. Christopher R. Scotese se hizo el recorrido paleogeográfico de los sitios en los que actualmente han sido reportadas las bacterias halófilas que comparten gran similitud genética con las cepas analizadas del manantial en Ixtapa, Chiapas. Estos ambientes se encuentran territorial y oceanográficamente distantes (Ixtapa está simbolizado con círculo amarillo en la Figura 39, el resto de los entornos con círculos de distintos colores).

Ha sido ampliamente propuesta la idea que las primeras formas de vida ya consolidadas como bacterias surgieron como extremófilos. Las bacterias actuales se derivaron de linajes de halófilos, por antecesores que habitaron aguas oceánicas abundantes en el desarrollo de la historia de la Tierra.

La aproximación planteada en la reconstrucción del recorrido y el posible desplazamiento de halófilos de sus centros de origen por las distintas direcciones que han tomado las corrientes, junto a la deriva continental y la tectónica de placas, se estima que parte de un paleocéano llamado Tetis en la era Mesozoica entre los continentes de Gondwana y Laurasia.

En los mapas de las figuras 40 y 41 las flechas amarillas son corrientes cálidas y las flechas azules y blancas indican corrientes frías. En la figura 40 los círculos rojos representan las coordenadas en donde se ubicaban durante el Mesozoico los sitios intercontinentales reportados, las coordenadas actuales están simbolizadas con un triángulo rojo, las líneas punteadas que conectan triángulos rojos y círculos rojos es el recorrido que cada sitio efectuó desde un pasado geológico del Mesozoico hasta la era actual. Los triángulos verdes representan sitios que han permanecido siempre en vía marina.

En el océano de Tetis y zonas adyacentes reconstruidas, actualmente albergan halófilas que en un pasado por el recorrido de la deriva continental ocupaban lugares estrechamente cercanos antes de ser desplazadas estas zonas.

La zona territorial de Ixtapa imaginariamente se localizaba en costas de Gondwana, en lo que hoy es la franja del Ecuador, de ahí mismo partían las corrientes

que recorrían todo el hemisferio este y llegaban hasta el hemisferio oeste, en donde se distribuía el océano que antecedió a Tetis (Océano Paleo-Tetis), a estas corrientes cálidas, se sumaban las frías, tanto del hemisferio norte como del sur, por lo tanto el rumbo de la corriente de la mayoría de los sitios marcados llegaba hacia ellos, lo que pudo provocar una dispersión de antecesores de estas especies de halófilas.

En el desarrollo geológico de la Tierra, durante el cretácico se comenzaron a separar ya los continentes y a emerger del agua extensiones territoriales. La circulación de corrientes marinas se amplió y se direccionó a otras zonas que anteriormente no abarcaban, pero manteniendo su recorrido sobre la franja del ecuador, circulando del hemisferio este al oeste, donde se consolidó la formación del Océano de Tetis, y estas corrientes cálidas que tomaban rumbo al norte se conectaban a corrientes frías de la Antártica para desembocar en la Antártida, en donde se ha reportado una especie interesante de *Halomonas* y *Pseudomonas* (Figura 41).

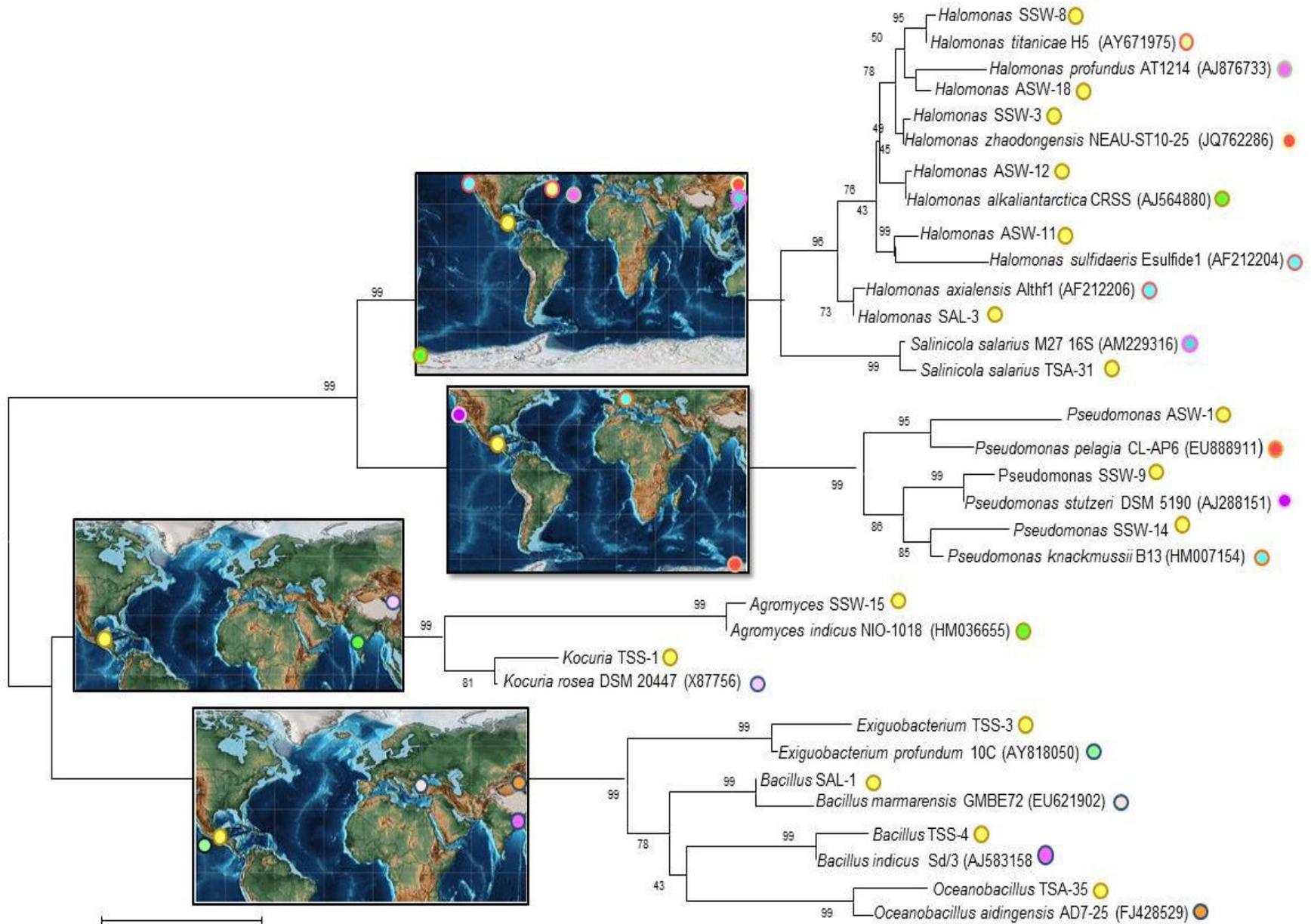


Figura 39. Ambientes de donde se han reportado las especies de halófilas que comparten alta similitud genética con las cepas de Las Salinas en Ixtapa, Chiapas.

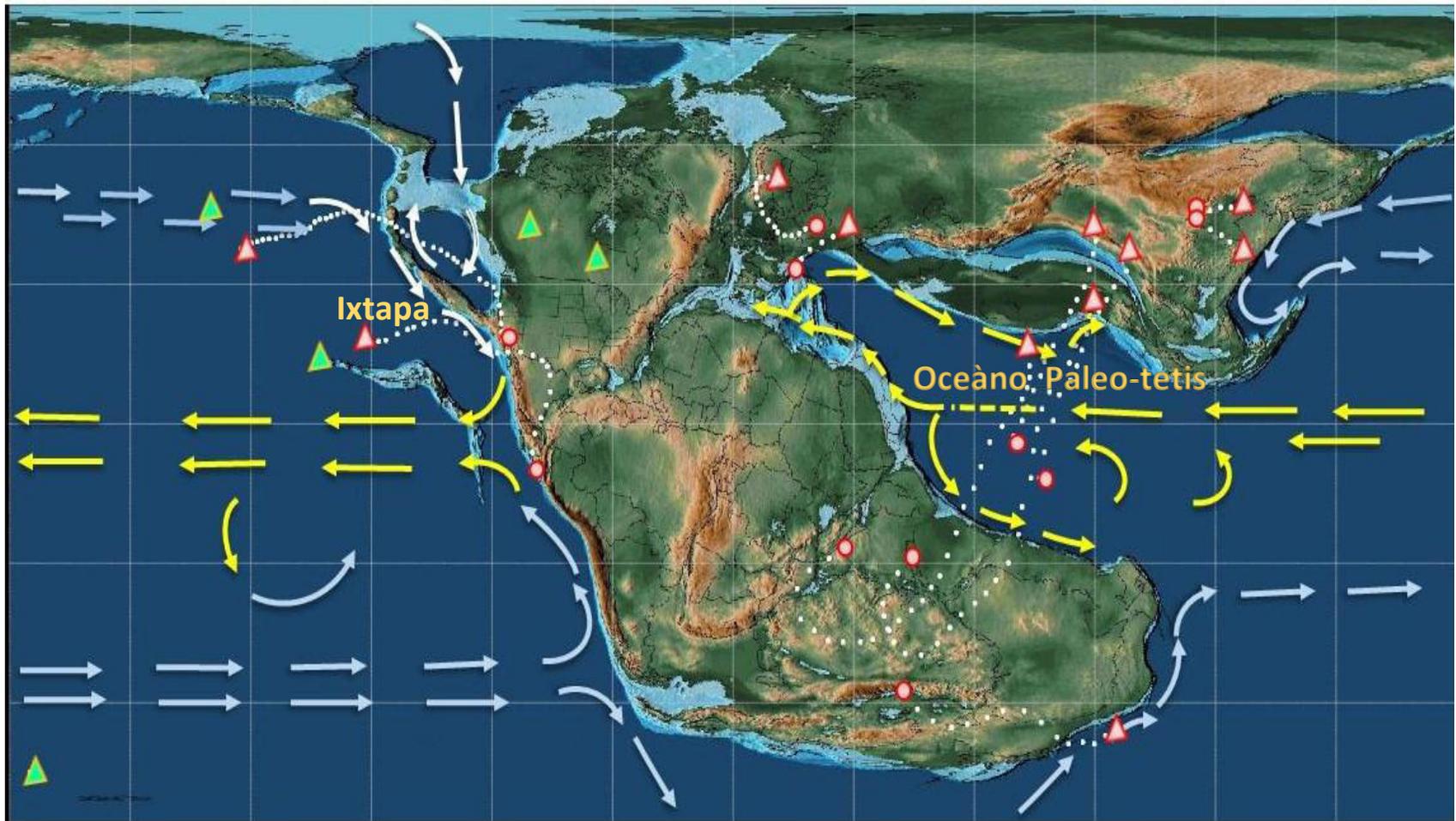


Figura 40. Distribución de los paleoambientes y corrientes marinas en el Mesozoico.

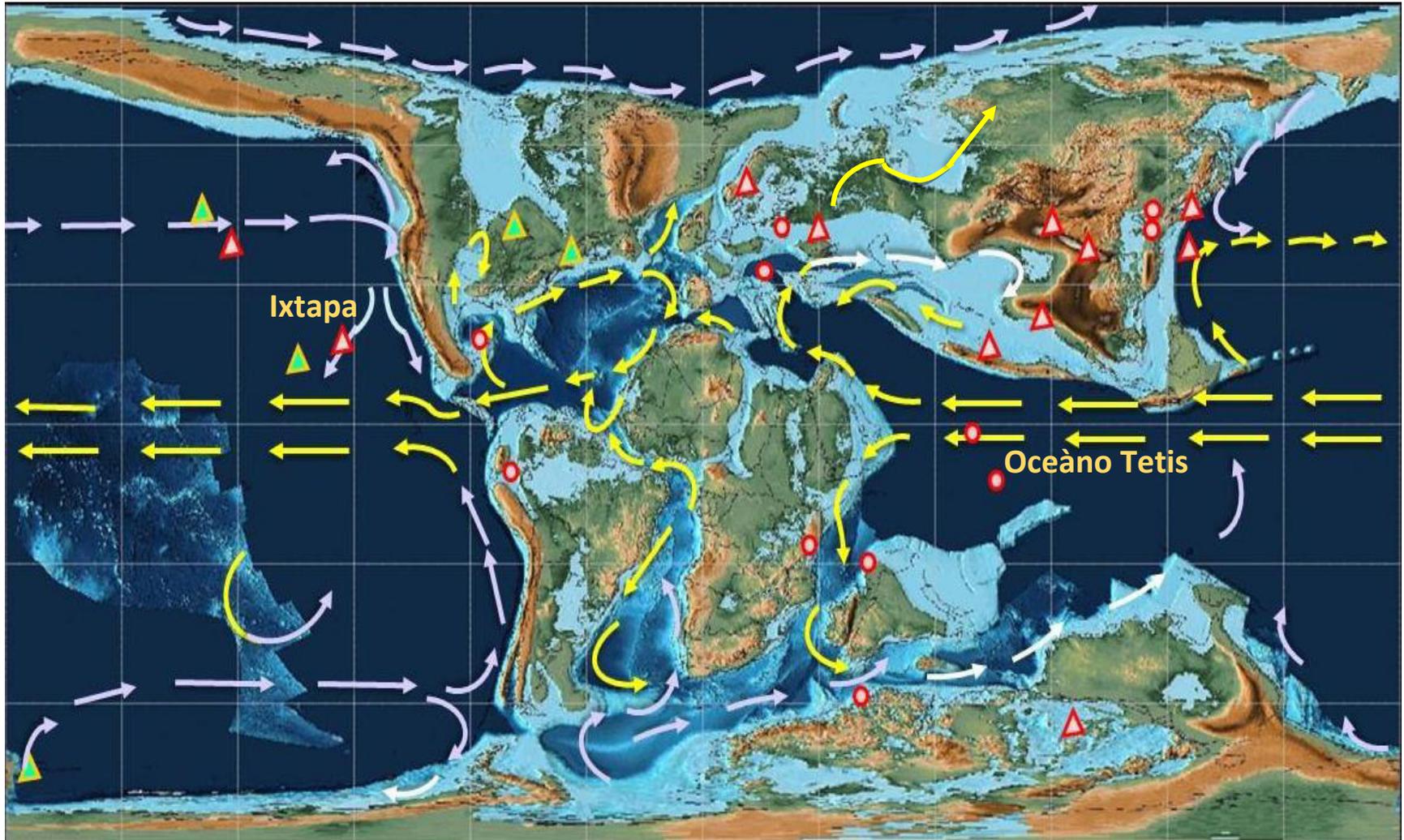
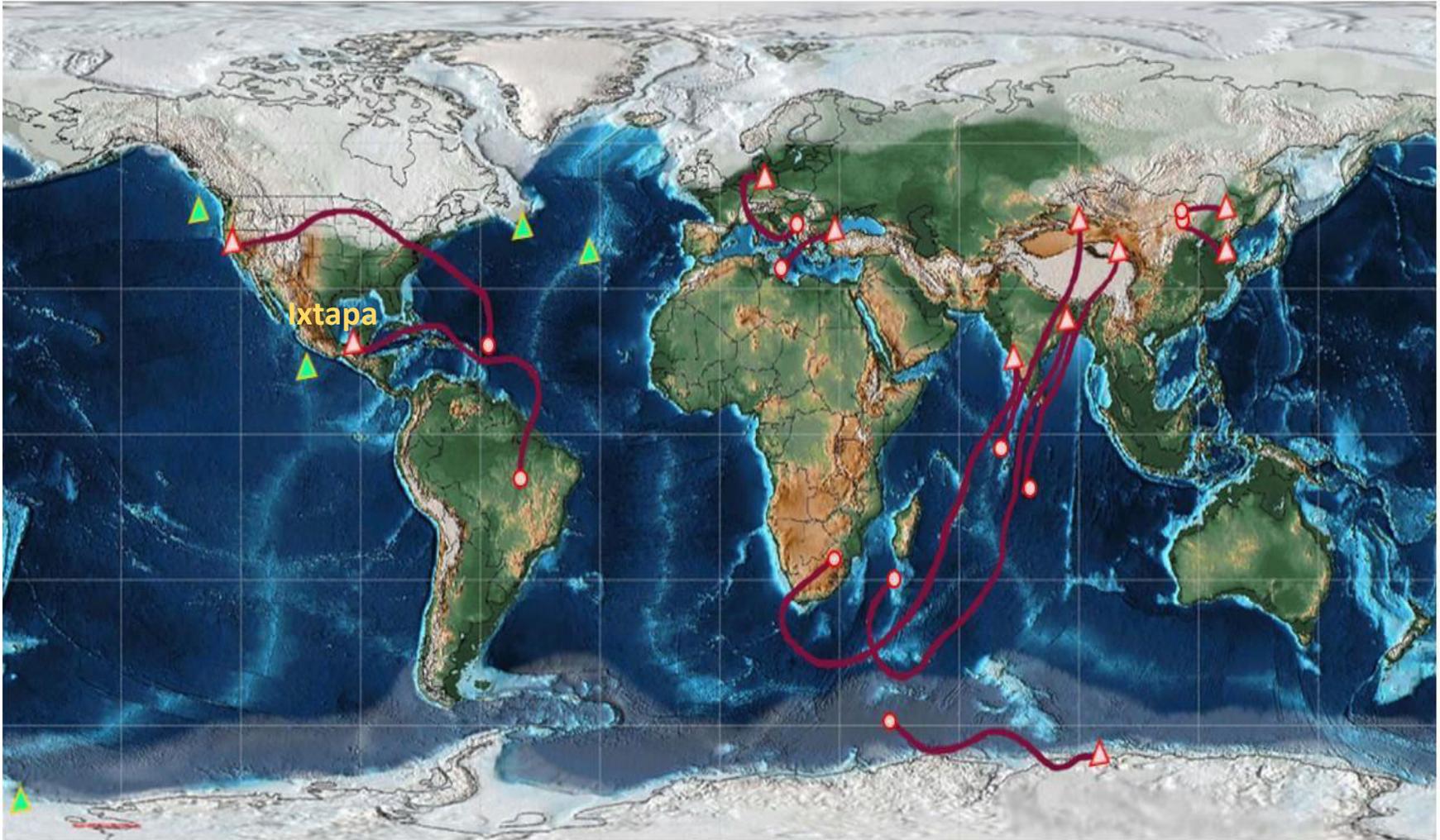


Figura 41. Distribución de los paleoambientes y corrientes marinas en el Cretácico.

En un mapa actual global, en la figura 40, se marcó el recorrido de los ambientes salinos a lo largo de su historia paleogeográfica. En muchos de estos sitios se interrumpió la comunicación que habían tenido en algún momento con el mar, restringiéndose a un territorio intercontinental y no costero, como el manantial, “Las Salinas” en Ixtapa, Chiapas.

Las coordenadas actuales en la figura 42 están simbolizadas con triángulos rojos, las líneas rojas que conectan triángulos rojos y círculos rojos es el recorrido que cada sitio efectuó desde un pasado geológico del Mesozoico, hasta la era actual. Los triángulos verdes representas sitios que han permanecido siempre en vía marina.



93 Figura 42. Distribución actual y el recorrido de los ambientes donde se han reportado halófilas tipo del Genbank.

## VIII. DISCUSIÓN

Las cepas del género *Halomonas* fueron las más abundantes en este ambiente natural hipersalino. Los miembros de este taxón tienen plasticidad fisiológica y características de adaptación para hacer frente a las diferentes condiciones ambientales, por lo que el género *Halomonas* es un modelo apropiado para estudiar las adaptaciones ecológicas de halófilas generalistas (Gaboyer *et al.*, 2017).

En su capacidad multifuncional, las cepas de *Halomonas* muestran una actividad impresionante, sintetizan enzimas de alto interés terapéutico: L-asparaginasa y L-glutaminasa, enzimas con un desempeño anticancerígeno para terapia contra la leucemia linfoblástica aguda, un padecimiento que en el 2016 afectó a muchos niños chiapanecos y una de las causas frecuente de muerte frecuentes, registradas por el entonces director del Hospital de Especialidades Pediátricas, Alejandro Robles Nucamendi (Periódico Mural Chiapas, 2016).

Esta enfermedad representa un problema nacional que es urgente atender, las cifras reportan que en México los índices de supervivencia son de 56 por ciento en menores de 15 años, mientras que en naciones desarrolladas es de 87 por ciento (Periódico La Jornada, 2017).

La amplitud de eficiencia de L-asparaginasa y L-glutaminasa también se puede aplicar en la industria alimenticia como un preventivo para reducir la acrilamida, un compuesto cancerígeno en alimentos horneados y fritos (Prihanto y Wakayama, 2016).

Retomando los matices rojos producidos en el medio de L-glutamina por la cepa ASW-18, lo que se observó puede tratarse de una estrategia bioquímica. Un dato clave de esta cepa es la alta similitud genética que comparte con la especie *Halomonas profundus*, una halófila aislada cerca de un respiradero hidrotermal ubicado en La dorsal mesoatlántica. Esta especie produce polihidroxialcanoatos (PHA), un polímero que se ha reportado que sintetizan el 83% de las especies de arqueas halófilas que tienen una reacción anaplerótica para la asimilación de la coenzima A, estas arqueas utilizan el ciclo de metilaspártato como una variación metabólica de la ruta de los ácidos cítricos y el ciclo del glioxilato (Han *et al.*, 2010).

El surgimiento de dos vías para un mismo propósito en un grupo microbiano filogenéticamente y fisiológicamente estrecho sugiere la existencia de una presión

evolutiva sobre las haloarqueas (Oren, 1995). Borijan *et al.* (2015) plantean que el ciclo de metilapartato está configurado para la utilización de polihidroxicanoatos durante la inanición de carbono, mientras que el ciclo de glioxilato probablemente está adaptado para el crecimiento en sustratos metabolizados a través de acetil-CoA.

Genera interés el que ninguna especie representante del filo bacteria ha sido reportada que realice el ciclo de metilapartato como comportamiento metabólico, aún y cuando posiblemente los antepasados de los tres órdenes poseían genes de polihidroxicanoato sintasa, genes que se transfirieron verticalmente en haloarqueas mayormente (Borijan *et al.*, 2015) y fue en *Haloarcula marismortui* que se reportó, se describió y se estudió esta ruta anaplerótica por primera vez (Khomyakova *et al.*, 2011).

A partir de esta información se plantea que la cepa ASW-18 al hacer virar el medio adicionado con L-glutamina en matices rojos utilizó el glutamato para incluirlo en la ruta del ciclo metilapartato, otro dato que apoya esta hipótesis es que se ha reportado que la enzima glutamato mutasa está activa en el ciclo de metilapartato de *H. marismortui* (*Idem*). Considerando que el glutamato es un soluto compatible en muchas bacterias halófilas, esta variante metabólica podría encontrarse también en las bacterias.

Contemplando la producción de PHA que se ha reportado en *H. profundus*, posiblemente la cepa ASW-18 tenga esta capacidad para sintetizar estos polímeros, pero se necesita apoyo experimental para conocer si es capaz de sintetizar plásticos biocompatibles y biodegradables sintetizados, como una fuente de desarrollo biotecnológico en la industria del plástico de origen no petroquímico (Lemos y Mina, 2015).

En trabajos recientes se ha revelado que múltiples especies de *Halomonas* y otros microorganismos marinos producen sideróforos novedosos y altamente eficientes (Martínez *et al.*, 2000). Una gran parte de especies con estos sideróforos eficaces han sido aisladas de respiraderos marinos ricos en hierro (Hickford *et al.*, 2004).

Sorpresivamente, algunas especies de *Halomonas* productoras de sideróforo también oxidan  $Mn^{2+}$ , lo que indica que pueden estar involucradas tanto en los ciclos

de hierro como el del manganeso en entornos que existan concentraciones de estos elementos (Homann *et al.*, 2009).

Un rasgo distintivo que se ha reportado en los sideróforos de bacterias haloalcalófilas es la capacidad de autoensamblar de micelas a vesículas. La transición de micela a vesícula se debe a su naturaleza anfifílica que cambia de forma cónica a cilíndrica cuando se produce la quelación del hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Serrana *et al.*, 2016).

Este interruptor inducido por metales plantea que este cambio fisiológico está involucrado en la protección contra las proteasas y otras enzimas degradativas que están ampliamente dispersas en el agua del océano, además estos sideróforos representan una ventaja sobre las especies monomoleculares de sideróforos que poseen las especies terrestres (Sandy y Bluter, 2009).

La disponibilidad de hierro que exista en el entorno, genera grandes competencias entre las bacterias haloalcalófilas que influyen para que los sideróforos tengan una amplitud y eficacia para unirse de manera efectiva a otros metales y metaloides como el arsénico (Rajkumar *et al.*, 2010). Debido a la competencia que se genera por la disposición de hierro, recientemente se ha propuesto que estas cepas con este tipo de sideróforos actúen como fuentes de biocontrol esencial en la prevención de infecciones de varios fitopatógenos como *Fusarium oxysporium* (Mukherjee *et al.*, 2019), limitándoles la disponibilidad de hierro libre en el medio, para impedir la colonización, infección y el desarrollo de varios microbios patógenos (Berthelin *et al.*, 1991).

En las cepas TSS-3, ASW-8, ASW-11, ASW-18 y SAL-3 existe una particularidad, comparten gran similitud genética con especies que han sido aisladas y reportadas de respiraderos hidrotermales ubicados en profundidades marinas, además considerando la habilidad de las bacterias del manantial para crecer a pesar de estar expuestas a cobre, aluminio y de quelar hierro, se puede hacer una aproximación hipotética de las bacterias en “Las Salinas” con su entorno geológico.

Mora *et al.* (2012) describe la complejidad geológica del Arco Volcánico Chiapaneco (CVA) como una cadena de volcanes de 150 km de longitud alineada irregularmente y ubicado en la parte central del Estado de Chiapas, que surgió como resultado de la subducción de la cresta de Tehuantepec, una cresta submarina que se

encuentra en La Placa de Cocos de la Costa del Pacífico de México, que representa un arco continental cuaternario calco-alkalino (Damony Montesinos, 1978). Debido a su ubicación geográfica el CVA tiene un papel muy importante en la evolución geológica de la región (Figura 43) y la actividad volcánica de el CVA ha sido continua desde hace 2 Ma hasta el presente (Mora *et al.*, 2012).

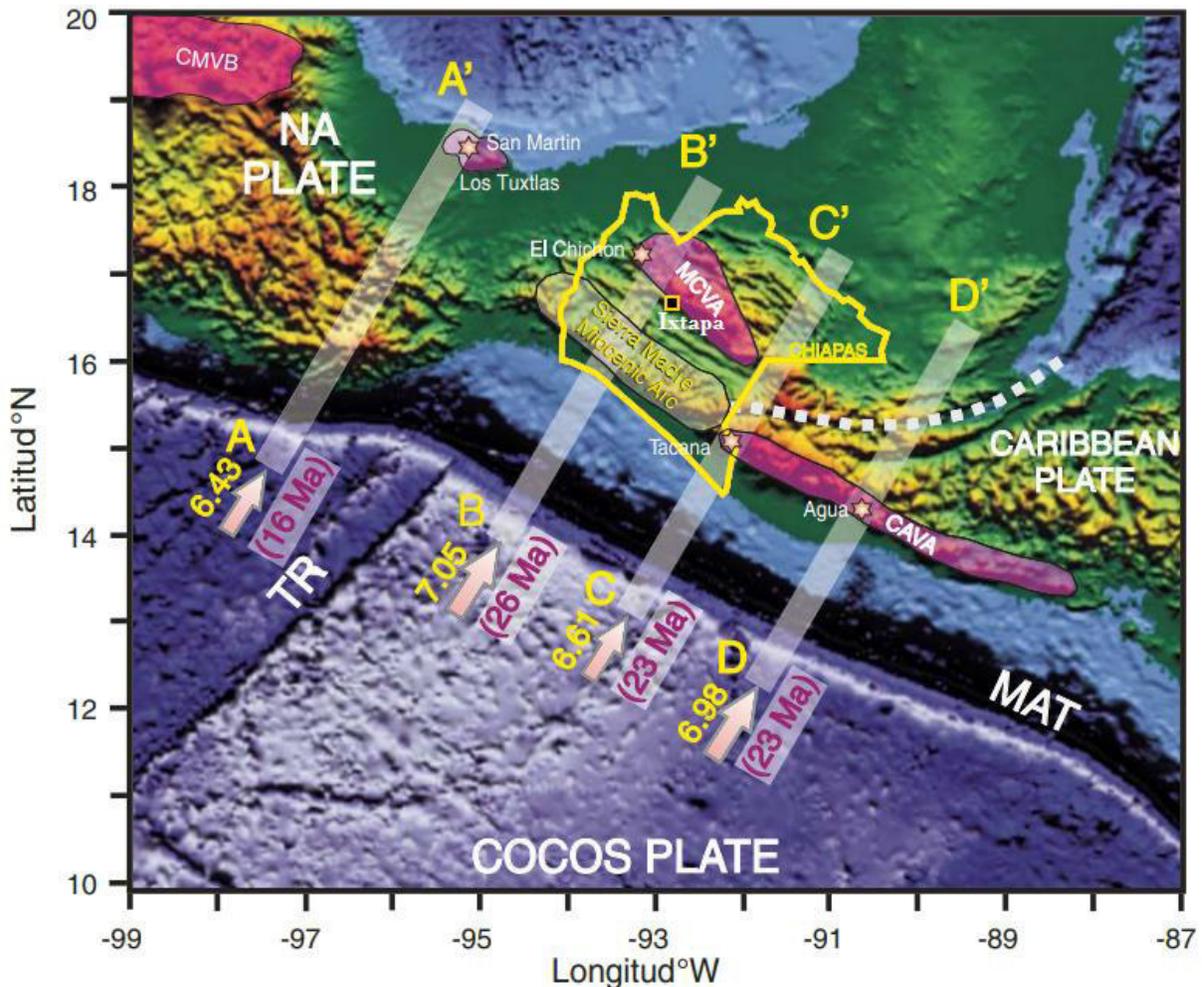


Figura 43. Configuración tectónica del moderno arco volcánico chiapaneco (CVA). Fuente: Menea y Menea, 2006.

Esta franja geológica volcánica activa podría guardar una conexión con la zona de Ixtapa. En Ixtapa existen aguas termales vigentes en El Carrizal y en Francisco Romo Serrano, las aguas termales en si son producto de actividad volcánica reciente que surge por la geotermia que se ejerce sobre el agua subterránea al estar en contacto con rocas calientes y magma (National Park Services, 2019), además en

Ixtapa están presentes cavidades geológicas formadas a partir de filtraciones de agua, estas son las grutas en Santa Bárbara, Concepción y el Zapotillo (INAFED, 2019).

Todo este vínculo de historia geológica puede estar involucrado en la existencia de una conexión subterránea y un posible paleodrenaje con paleocorrientes sobre toda esa franja geológica, que hacen posible una precipitación y acarreo de minerales surgidos eventualmente por la actividad volcánica en la geodinámica del CVA. El transporte en el flujo de estos minerales por una posible red subterránea podría guardar una conexión con “Las Salinas”, y esta conjugación de factores geofísicos y mineralógicos podrían estar ejerciendo una presión en las cepas para tolerar metales pesados, desarrollar sideróforos eficientes y la inducción de secreción de abundante exopolisacarido por posibles grietas subterráneas que existan cerca del manantial con condiciones hostiles como las que se mantienen en los ventiladores hidrotermales.

La abundante secreción de exopolisacaridos en las cepas aisladas, además podría estar destinada para eventos de anclaje por la competencia constante en la colonización y permanencia en este entorno, y bajo esta tensión la producción de EPS resulta una estrategia que beneficia a cada especie aún y cuando la inversión energética de carbono sea de un costoso 70% (Wolfaardt *et al.*, 1999). En cepas que se han aislado de respiraderos hidrotermales en aguas profundas han demostrado una resistencia a los metales pesados con alta producción de EPS que permiten la adhesión de metales y sustancias tóxicas (Loaec *et al.*, 1997., Wuertz *et al.*, 2000). Estos exopolímeros exhiben un estado polianiónico en el medio marino que muestra una alta afinidad de unión por los cationes y los metales traza (Poli *et al.*, 2010).

Toda esta capacidad que poseen los EPS permiten su aprovechamiento para estrategias de biorremediación en zonas contaminadas por metales y otros minerales, como adhesivos, absorbentes, lubricantes, acondicionadores de suelo, cosméticos, vehículos de suministro de medicamentos, textiles, materiales de alta resistencia, emulsionantes, viscosificadores, agentes de suspensión y quelantes (Mata *et al.*, 2006., Kumar *et al.*, 2007., Freitas *et al.*, 2011., Llamas *et al.*, 2012), además posibilitan su uso en la aplicación de curación ósea, demostrando en células osteoblásticas de la calota craneal de ratas en ensayos *in vivo* la capacidad de promover la adhesión de estas células para una osificación (Zanchetta y Guezenec, 2001).

En bioensayos realizados por Mukherjee *et al.* (2019) en *Avicennia marina* se reportó que el exopolisacarido purificado producido por cepas de *Halomonas* favoreció el crecimiento de plántulas de arroz en condiciones abióticas, este resultado plantea un desempeño crucial del EPS halo-rizobacteriano en el alivio del estrés salino, en la solubilización de fosfato inorgánico y el flujo absorción de nutrientes para un mejor crecimiento y desarrollo vegetal en suelos salinos.

La activación sideróforos y producción de EPS podría tener un vínculo directo entre sí por la presión que existe en el manantial.

Dentro de los perfiles metabólicos, las haloalcalófilas fueron selectivas con el consumo de los carbohidratos para darles un uso como solutos compatibles, que les de apoyo osmótico para la presión que ejerce la salinidad del entorno. Dentro de este esquema, cinco cepas no consumieron la glucosa como fuente de carbohidrato, si bien, algunos microorganismos poseen las enzimas necesarias para la ruta de Entner-Doudoroff, que es una ruta metabólica alternativa que cataboliza glucosa a piruvato usando una serie de enzimas distintos a la glucólisis y a la ruta de la pentosa fosfato (Entner y Doudoroff ,1952) y muchas halófilas tienen incorporada esta vía secundaria de metabolismo y variantes de esta ruta por el bajo costo energético que esta representa, una variante es EM inversa (gluconeogénesis)., otras vías descritas son la vía semifosforilada, donde la glucosa se convierte en 2-deshidro-3-desoxigluconato (KDG).

En otras especies como *Sulfolobus* y *Thermoplasma*, se ha descrito una ruta ED no fosforilada, pero existen casos en donde la bacteria carece de todos los genes enzimáticos para la vía ED como la especie *Natronomonas pharaonis*, por lo tanto no consume glucosa como fuente de carbohidrato, sin embargo, muchas de estas brechas en las vías se han elucidado con el descubrimiento de nuevas enzimas no ortólogas en las halófilas para la síntesis de novo de mevalonato (Barkley *et al.*, 2004; Grochowski *et al.*, 2006b), purinas (Graupner *et al.*, 2002; Ownby *et al.*, 2005) y cobamida (Woodson *et al.*, 2003; Woodson y Escalante-Semerena 2004; Zayas *et al.*, 2006).

Las halófilas emplean nuevas enzimas y precursores para la formación de pentosas (Grochowski *et al.*, 2005) y la síntesis de aminoácidos aromáticos (White

2004, Porat *et al.*, 2006) para eludir las enzimas ausentes de la vía clásica de la pentosa-fosfato (Falb *et al.*, 2008). Por lo tanto, si son selectivas en el consumo de carbohidratos para mantener un equilibrio osmótico, por lo que han desarrollado habilidades que les permitan cumplir las funciones vitales sin poner en riesgo su integridad metabólica.

La multifuncionalidad de las haloalcalófilas que aloja el manantial Las Salinas, en Ixtapa, Chiapas brinda oportunidades alentadoras para un uso biotecnológico sustentable.

Las  $\alpha$ -amilasas tienen una aplicación potencial en una gran cantidad de procesos industriales. Las industrias de detergentes son los principales consumidores de enzimas, en términos de volumen y valor. El uso de enzimas en las formulaciones de detergentes mejora la capacidad de los detergentes para eliminar manchas difíciles y hacer que el detergente sea ambientalmente seguro.

Las amilasas son el segundo tipo de enzimas utilizadas en la formulación de detergentes enzimáticos, y el 90% de todos los detergentes líquidos contienen estas enzimas. Estas enzimas se usan en detergentes para lavado de ropa y en lavavajillas automáticos para degradar los residuos de alimentos con almidón, como las papas, las salsas, las natillas, el chocolate, dextrinas y otros oligosacáridos más pequeños (Mitidieri *et al.*, 2006).

Las  $\alpha$ -amilasas se han utilizado ampliamente en la industria de la panificación. Estas enzimas se pueden agregar a la masa del pan para degradar el almidón de la harina en dextrinas más pequeñas, que posteriormente son fermentadas por la levadura. La adición de  $\alpha$ -amilasa a la masa da como resultado la mejora de la tasa de fermentación y la reducción de la viscosidad de la masa, lo que da como resultado mejoras en el volumen y la textura del producto (Monteiro y Oliveira, 2010).

Además, genera azúcar adicional en la masa, lo que mejora el sabor, el color de la corteza y las cualidades de tostado del pan. Aparte de generar compuestos fermentables, las  $\alpha$ -amilasas también tienen un efecto antienvjecimiento en la panificación, y mejoran la retención de suavidad de los productos horneados, aumentando la vida útil de estos productos (Monteiro y Oliveira, 2010).

Por las cualidades de mejora que muestra el uso de amilasas en harinas, recientemente se ha propuesto el uso de ellas en la nixtamalización de la tortilla, para una tortilla de mejor calidad la cual no pierda sus propiedades al enfriarse o refrigerarse (Saab *et al.*, 2017).

Las cepas TSS-3, TSS4 y SSW-9 pueden ser propuestas para promover la producción de  $\alpha$ -amilasas, en la elaboración de los productos ya mencionados, además por la naturaleza halófila, estas amilasas tienen una actividad óptima a altas salinidades y, por lo tanto, podrían usarse en muchos procesos industriales severos en los que las soluciones salinas concentradas inhibirían muchas conversiones enzimáticas de otras bacterias no halófilas, además de ser enzimas muy estables a temperaturas elevadas (Amoozegar *et al.*, 2003).

Otra extremoenzima de interés biotecnológico son las lipasas, su naturaleza de la región específica 1,3 de las lipasas es eficaz en la producción de un sustituto de manteca de cacao y también en la producción de triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga de aceites de pescado, que son útiles para prevenir enfermedades coronarias. Las lipasas también se usan industrialmente para la producción de una variedad de productos tales como jugos de frutas, alimentos horneados y fermentación vegetal, con enriquecimiento lácteo (Sarpah *et al.*, 2017).

Otro uso es en la utilización para la modificación y la descomposición de biomateriales complejos, la eliminación de grasa de la carne y los productos de pescado, tratamiento de yema de huevo en la producción de mayonesa usando fosfolipasas. Además de exhibir propiedades de emulsificación, la lipasa es explotada en la hidrólisis de fosfolipasa de la lecitina de huevo, iso-lecitina en el tratamiento de yema de huevo (*Idem*).

Se sabe que las lipasas catalizan la síntesis de ésteres de ácidos grasos del ácido L-ascórbico, SL como bajos en calorías y dietéticos triacilglicerol, así como reacciones de modificación de antioxidantes fenólicos, tocoferoles (vitamina E), etc., que constituyen un componente muy importante de la industria de los complementos alimenticios (*Idem*).

Recientemente, se ha reconocido el potencial terapéutico del monoglicérido lipasa, ya que se considera un objetivo farmacológico prometedor para una serie

terapéutica de padecimientos como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias. A partir del estudio de Pan *et al.* (2016) se demostró que, en el campo de la nanomedicina, los fármacos de fosfolípidos lábiles de Sn2 lipasa junto con el suministro de fármacos facilitado por contacto proporcionan ventajas clave de aumentar la biodisponibilidad de células diana y prevenir la pérdida difusional prematura del fármaco durante la circulación.

Además, se encuentra que las lipasas son útiles para catalizar los pasos clave de síntesis de procesos de ingredientes farmacéuticos activos enantioméricamente puros y sus intermedios. La revisión informada por Loli *et al.* (2015) cubre los últimos avances y nuevos potenciales de aplicación de lipasas en el campo de la medicina como herramientas de diagnóstico para ciertas enfermedades, como candidatos a la prevención y terapia del cáncer, ayudan a una persona que tiene fibrosis quística, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, entre otros padecimientos.

En la biorremediación, proceso empleado para descontaminar muestras de derrames de petróleo, suelos mojados en aceite, desechos industriales y aguas residuales teñidas con lípidos que de lo contrario pueden tener consecuencias peligrosas cuando ingresan a los recursos naturales sin tratamiento previo. Se pueden adoptar pasos de biorremediación catalizados por lipasas para tratar eficazmente los desechos de fábricas de procesamiento de lípidos y restaurantes (Sarpah *et al.*, 2017).

Las cepas TSS-4 y ASW-11 y sus lipasas pueden involucrarse en los procesos antes descritos o en la propuesta de algún producto en donde participen las lipasas, por su desempeño exitoso en el test de lipasas.

Las proteasas como extremoenzimas tienen un papel importante en la industria de detergentes. La mejora de técnicas para utilizar en la elaboración de detergentes ha ido avanzando. Las proteasas estabilizan el rendimiento del detergente, específicamente por la capacidad para trabajar a temperaturas bajas (Sikandar y Ghulam, 2017).

Proteasas que muestran actividad a bajas temperaturas se han obtenido de naturaleza extremófila, pero han sido desarrollados en el laboratorio por un enfoque de avance. El Pronod 153L es limpiador de instrumentos quirúrgicos que se manchan

por proteínas de la sangre, este limpiador elaborado a base de las proteasas hidroliza una gran cantidad de las moléculas de proteína al estar en contacto con pigmentos duros (*Idem*).

Las enzimas proteasas con especificidad se están utilizando en el desarrollo operativo de agentes terapéuticos. Como algunas proteasas contienen funciones proteolíticas que juegan un papel importante en la invasión de tejido, modulando la respuesta inmune y en la adhesión de las células epiteliales del huésped, debido a estas funciones adicionales están asociadas con el diseño terapéutico. En la industria farmacéutica y cosmética las enzimas son ampliamente utilizadas para la disposición de medicamentos, por ejemplo, tratamientos para el desbridamiento de heridas, y también se usan para la eliminación de queratina en el acné, las queratinasas, pueden eliminar cicatrices y ayudar en la regeneración del epitelio o la eliminación de callos humanos y células y piel queratinizada (*Idem*).

Las cepas TSS-3 y TSS-4 podrían utilizarse en la realización de procesos industriales que impliquen la acción de proteasas, para el desarrollo de compuestos bioactivos.

Por otro lado, las celulasas son las enzimas más exitosas utilizadas en el procesamiento húmedo textil, se han utilizado con éxito para el biostoning de jeans y biopolishing de algodón y otras telas celulósicas. Durante el proceso de biodetección, las celulasas actúan sobre la tela de algodón y rompen los pequeños extremos de la fibra en la superficie del hilo, aflojando así el tinte, que se elimina fácilmente mediante abrasión mecánica en el ciclo de lavado. La acción de las celulasas elimina las fibras cortas, la borrosidad de la superficie, crea una apariencia lisa y brillante, y mejora el brillo del color, la hidrofiliidad y la absorción de humedad, y el proceso ecológico (Bath, 2000).

El uso de celulasas junto con proteasa y lipasa en los detergentes es una innovación más reciente en esta industria (Singht *et al.*, 2007). En la actualidad, el detergente líquido para ropa que contiene tensioactivo aniónico o no iónico, ácido cítrico o una sal soluble en agua, proteasa, celulosa y una mezcla de propanodiol y ácido bórico o su derivado se ha usado para mejorar la estabilidad de las celulasas (Chander *et al.*, 2011).

Las celulasas también se han usado para mejorar la calidad del suelo. Tradicionalmente, la incorporación de paja se considera una estrategia importante para mejorar la calidad del suelo y reducir la dependencia de los fertilizantes minerales (Ortíz, 2008). Muchos estudios han intentado apresurar la descomposición de la paja a través de rutas microbianas. Las aplicaciones de hongos y bacterias celulolíticos han mostrado resultados prometedores. Fontaine *et al.* en el 2004 mostró que la suplementación con celulasa exógena aceleró la descomposición de la celulosa en el suelo. Por lo tanto, el uso de celulasa exógena puede ser un medio potencial para acelerar la descomposición de la paja y aumentar la fertilidad del suelo (Han, 2010).

Las cepas TSS-3, TSS-4, TSA-35, SSW-9, y ASW-12, son cepas que tienen en su perfil metabólico enzimas celulósicas, en donde hay mucho alcance en las aplicaciones biotecnológicas.

Un problema que se ha diagnosticado en suelos agrícolas de todo el mundo, es la salinidad. Aproximadamente 5,200 millones de hectáreas de tierras agrícolas se ven afectadas por la erosión, la salinidad y la degradación del suelo. El estrés por salinidad ha afectado significativamente las tierras fértiles y, por lo tanto, tiene un gran impacto en la agricultura y la economía de un país (Numan *et al.*, 2018).

El estrés salino tiene efectos severos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también reduce su rendimiento. Las plantas están inherentemente equipadas con la capacidad de tolerancia al estrés para responder al tipo específico de estrés.

Las plantas mantienen mecanismos específicos mitigar el estrés salino, como la estimulación hormonal, el intercambio iónico, las enzimas antioxidantes y la activación de cascadas de señalización en sus fronteras metabólicas y genéticas que alivian la condición de estrés pero cuando la salinidad del entorno excede su capacidad para hacerle frente, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) poseen un mecanismo especializado que juega un papel clave para la brindarle la señalización y protección contra su medio salino. Estas bacterias provocan que las plantas produzcan diferentes hormonas de crecimiento vegetal como auxina, citoquinina y giberelina, hormonal indispensables para el crecimiento de las plantas, además estas bacterias también producen reguladores de crecimiento como sideróforos, fijan el nitrógeno

atmosférico y solubilizan el fosfato orgánico e inorgánico y así compensan la tolerancia a la sal en las plantas (*Idem*).

Todas las cepas del manantial presentan al menos una funcionalidad que favorece el desarrollo de las plantas, y las cepas que pueden desempeñarse como PGPB son SSW-15, ASW-12, ASW-18 y ASW-11, para brindar un manejo de buen rendimiento en suelos agrícolas que estén siendo afectados por salinidad, como una herramienta rentable y económica en la tolerancia a la salinidad y la promoción del crecimiento vegetal.

La relevancia en la multifuncionalidad de las bacterias haloalcalófilas del manantial “Las Salinas” y su importancia como una fuente de moléculas que son susceptibles de emplearse en biotecnología para Chiapas se debe a que estas cepas han seguido sus propios rumbos adaptativos, porque el manantial posee características elementales y fisicoquímicas únicas.

Hasta el momento no se ha realizado un reporte de *Halomonas alkaliantarctica* aislada en una zona distinta al mar Ross en la Antártida (Poli *et al.*, 2007). En el 2013 se consideraba a esta especie como potencialmente endémica de la Antártida (Jadoon *et al.*, 2013), pero la cepa ASW-12 aislada de agua del manantial Las Salinas comparte el 100% de similitud genética del gen 16S ADNr, bajo este criterio puede considerarse como una cepa ecotipo que tiene dentro de su constitución genética la capacidad de fijar nitrógeno.

Siguiendo el concepto de evolución de mosaico de las rutas biosintéticas, formulado por Ycas en 1974 y completado por Jensen en 1976, las enzimas ancestrales de baja especificidad de sustrato fueron moldeadas por sustratos específicos. El modelamiento ocurre a partir de una enzima ancestral que fue capaz de unirse a tres sustratos (S1, S2 y S3) y catalizar tres reacciones diferentes, pero semejantes (Fani, 2012).

En el proceso de la duplicación del gen que codificaba la enzima ancestral (E0), una copia divergió de la información original y se originó una enzima nueva (E2), con una especificidad aumentada y reducida; y un evento de duplicación de genes adicional, vuelve a resultar en una divergencia evolutiva, conduciendo a una enzima diferente (E3). De esta forma, la enzima ancestral E0 que pertenecía a una ruta

metabólica determinada se "recluta" para servir a otras vías novedosas, de acuerdo a los sustratos que ofrezca el medio ambiente (Fani, 2012), por lo tanto, es como muchos productos metabólicos que estas bacterias halohalcalófilas sintetizan, emergieron de las presiones selectivas resultantes de los objetivos celulares que ayudaron a guiar la expansión y la poda de las vías metabólicas a lo largo de historia la evolutiva (Nam *et al.*, 2011) de estas bacterias haloalcalófilas.

Por otra parte, la transferencia y la recombinación de la información genética pueden acelerar la evolución y la diversificación de las propiedades bioquímicas, especialmente si la ruta está codificada en plásmidos muy móviles o si se localiza en transposones (Atlas y Bartha, 2002).

Esto fundamenta, el por qué las cepas de este manantial que tienen similitud genética alta con especies de otros sitios hipersalinos, no tienen la misma capacidad metabólica ni la síntesis de extremoenzimas que estas cepas tienen., o la capacidad de fijar nitrógeno, quelar hierro, aunque guarden un alto vínculo genético con las cepas tipos registradas en el Genbank. A pesar de ser un recurso natural biotecnológico que encierra historia evolutiva y paleogeográfica, con potencial para resolver problemas locales, estatales y nacionales, no se les ha brindado el interés a estos microorganismos que tienen mucho que ofrecer y que han resistido a condiciones hostiles y del tiempo para mantenerse vigentes, a pesar de que han sido ignorados por los esfuerzos de conservación. Sin embargo, su papel en los procesos biogeoquímicos, su diversidad y abundancia, y su potencial como depositarios de valiosa información genética y productos metabólicos los hacen tan importantes como los animales y las plantas, aún y cuando se no se les asigne el valor adecuado por tener la idea errónea de la ser entidades con ubicuidad que los hace cosmopolitas (Kaye *et al.*, 2011). Por tal motivo, los argumentos para su conservación requieren un examen cuidadoso y no meramente una extrapolación de los argumentos para la conservación de animales y plantas (Cockell y Jones, 2009).

## IX. CONCLUSIONES

1. Considerando los valores de pH (8.0) y la alta conductividad eléctrica CE (64.2 dS/m) determinados en este ecosistema, así como por la presencia de altas concentraciones (g/L) de: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>; el manantial Las Salinas es un ambiente natural altamente salino-alkalino.
2. Un total de 88 cepas halófilas fueron aisladas del manantial salino. Las bacterias aisladas forman parte de los ocho géneros bacterianos: *Agromyces*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Oceanobacillus*, *Pseudomonas* y *Salinicola*.
3. Las cepas bacterianas *Agromyces* SSW-15, *Halomonas* sp. ASW-18, ASW-11 y *Pseudomonas* sp. SSW-9 amplificaron el gen *nifH*, por lo tanto, estas halófilas tienen capacidad para la fijación del nitrógeno en este ambiente salino.
4. Las cepas halófilas crecieron en altas concentraciones de NaCl (25% w/v), por tanto, se sugiere clasificarlas como extremadamente halófilas y algunas son moderadamente halófilas, con capacidad para crecer bajo la exposición de cantidades tóxicas de cobre y aluminio (300 ppm y 500 ppm), y mantenerse activas a distintos pH.
5. La comunidad de bacterias del manantial aloja cepas con alto potencial biotecnológico en diversos campos para distintas industrias.
6. Las cepas pueden ser categorizadas como miembros de la gama de haloalcalófilos por sus características adaptativas y los factores que les favorecen para crecer.
7. En el manantial Las Salinas existe una alta diversidad y abundancia de especies bacterianas halófilas, donde predominan especies agrupadas en el género *Halomonas*.

8. El manantial La Salinas es de tipo talohosalino, que en su historia geológica guarda evidencia que estuvo conectado con el mar.

9. Se sugiere que Las Salinas de Ixtapa pertenece a una franja geológicamente activa que es parte de una red subterránea conectada directa o indirectamente al CVA.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbamondi, G., De Rosa, S., Iodice, C. and Tommonaro, G. 2014. Cyclic dipeptides produced by marine sponge-associated bacteria as quorum sensing signals. *Natural Product Communications*. 9 (2): 229–232.
- Abdallah, M., Karray, F., Mhiri, N., Mei, N., Quéméneur, M., Cayol, L., Erauso, G., Tholozan, J., Alazard, D. and Sayadi, S. 2016. Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. *Extremophiles*. 20 (2): 125-38.
- Adams, R., Bygraves, J., Kogut, M. and Russell, N. 1988. *Genetic Microbiology*. 133: 1861–1870.
- Alcocer, J. y Williams, W., 1993. Lagos salinos mexicanos. Biodiversidad marina y costera de México. En: Salazar-Vallejo, S. y González, N. (Editores). González Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). D.F. México. Pp. 849–865.
- Ali, I., Akbar, A., Aslam, M., Ullah, S., Anwar, M., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Yanwisetpakdee, B., Permpornsakul, P. and Rakshi, S. 2015. Comparative study of physical factors and microbial diversity of four Man-Made Extreme Ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 (21): 767–778.
- Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59: 143-169.
- Análisis de agua - aguas naturales epicontinentales, costeras y marinas-muestreo. Proyecto de norma mexicana: PROY-NMX-AA-121/2-SCFI-2008.

<http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/nmx-AA-05/proy-nmx-aa-121-scfi-2005.pdf>

Antunes, A., Taborda, M., Huber, R., Moissl, C., Nobre, M. and Da Costa, M. 2008. *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 215-220.

Asociación Mexicana de la Industria Salinera A.C. 2015. Recuperado el 15 de enero del 2017 en [www.amisac.org.mx/produccion](http://www.amisac.org.mx/produccion)

Argandoña, M., Fernández-Carazo, R., Llamas, I., Martínez-Checa., F., Caba, J., Quesada, E., and Del Moral, A. 2005. The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph. *FEMS Microbiology Letters*. 244 (1): 69-74.

Backermans, C. 2015. Microbial evolution under extreme conditions. Volumen 2. De Gruyter. Berlin, Alemania. 377 pp.

Baldini, J., Massenas, V., Sempio, S., Boddy, H. and Divan S. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 384: 413–431.

Bashan, Y., Holguin, G. and Lifshitz, R. 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: Glick, B, and Thompson, J. (Eds). *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. California, USA. Pp. 331-345.

Bell, E. 2008. *Life at extremes: environments, organisms, and strategies for survival*. Cabi. Wallingford, U.K. 576 pp.

- Benachenhou, N. and Baldacci, G. 1991. The gene for a halophilic glutamate dehydrogenase sequence, transcription analysis and phylogenetic implications. *Molecular & General Genetics*. 230 (3): 345–352.
- Berthelin, J., Leyrol, C., Laheurt, F., and Degiudici, P. 1991. “Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedling and plant growth related to phosphorus solubilizing”. In: Keel, B. and Koller, G. (Eds). *Plant Growth-promoting Rhizobacteria: Progress and Prospects*. Switzerland: IOBC. Pp. 359–364.
- Boring, J., Kushner, D. and Gibbons, N. 1963. Specificity of the salt requirement of *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian Journal Microbiology*. 9: 143-154.
- Borjian, F., Han, J., Hou, J., Xiang, H. and Berg I. 2015. The methylaspartate cycle in haloarchaea and its possible role in carbon metabolism. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*. 10 (3): 546-557.
- Boujelben, I., Martínez-García, M., Pelt, J. and Maalej, S. 2014. Diversity of cultivable halophilic archaea and bacteria from superficial hypersaline sediments of Tunisian solar salterns. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106: 675-692.
- Brito, J., López, A., Yarza, P., Antón, J. and Rossello, R. 2009. Occurrence of *Halococcus* sp. in the nostrils salt glands of the seabird *Calonextris diomedea*. *Extremophiles*. 13: 557-565.
- Brown, A. 1976. Microbial water stress. *Bacteriology American*. 40: 803-846.
- Bowers, K., Mesbah, N. and Wiegel, J. 2009. Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life?. *Saline Systems*. 5: 9.

- Cavicchioli, R. 2002. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*. 2 (3): 281-292.
- Case, R., Boucher, Y., Dahllo, I., Holmstrom, C., Doolittle, F. and Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and environmental microbiology*. 73 (1): 278-288.
- Cervantes, A., Flores, H. y Valdés, J. 2001. Las Euphorbiaceae halófilas y gipsófilas de México, excepto *Euphorbia*. *Revista UNAM*. D.F., México. 72 (1): 1-83.
- Chad, R., Salwan, R., Dahr, H. and Gulati, A. 2008. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*. 57: 503-507.
- Choumiline, K., López-Cortés, A., Grajeda-Muñoz, M., Shumilin, E. and Sapozhnikov, D. 2013. Lanthanide behavior in hypersaline evaporation ponds at Guerrero Negro, Baja California, Mexico, an environment with halophiles. *American Geophysical Union*. California, USA. Recuperado de <https://choumiline.files.wordpress.com/2015/11/agu-2013-san-francisco-ca-konstantin-choumiline.pdf>
- Comisión Nacional del Agua. 2011. Atlas del agua en México 2011. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. D.F., México. 133 pp.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2008. Cuatro Ciénegas recuperado de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp\\_048.html](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp_048.html)
- Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M. and Enache, M. 2009. Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a

subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*. 14 (5): 4658–4664.

Coordinación General de Minería Mexicana. 2013. Perfil de mercado de sal. Secretaría de Economía. México. 15 pp.

Crapart, S., Fardeau, M., Cayol, J., Thomas, P., Sery, C. and Ollivier, B. 2007. *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 287-292.

Damon, P. and Montesinos, E. 1978. "Late Cenozoic volcanism and metallogenesis over an active Benioff Zone in Chiapas, Mexico". *Arizona Geological Society*. 11: 155-168 p.

Dastager, S., Qiang, Z., Damare, S., Tang, S. and Li, W. 2012. *Agromyces indicus* sp. nov., isolated from mangroves sediment in Chorao Island, Goa, India. *Antonie van Leeuwenhoek*. 102 (2): 345-352.

De la Haba, R., Sánchez-Porro, C., Márquez., C. and Ventosa., A. 2010. Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 963-971.

De Muyndck, W., De Belie, N. and Verstraete, W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering*. 36: 118-136.

Dennis, P. and Shimmin, L. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiology Molecular Biology*. 61 (1): 90-104.

- Delgado-García, M. 2011. Aislamiento e identificación de microorganismos halófilos en suelos del estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Biología. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila. 89 pp.
- Denizci, A., Kazan, D. and Erarslan A. 2010. *Bacillus marmarensis* sp. nov., an alkaliphilic, protease-producing bacterium isolated from mushroom compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1590-1594.
- Dias, F., Ventullo, R. and Rowe, J. 1990. Regulation and energization of nitrate transport in a halophilic *Pseudomonas stutzeri*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 166 (1): 424-430.
- Dojka, M., Harris, J. and Pace, N. 2000. Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of Bacteria. *Applie Environmental Microbiology*. 66: 1617–1621.
- Dorador, C., Busekow, A., Vila, I., Imhoff, J. and Witzel, K. 2008. Molecular analysis of enrichment cultures of ammonia oxidizers from the Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile. *Extremophiles*. 12: 405-414.
- Gaby., D. and Buckley, J. 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS One*. 7 (7): 42149-42169.
- Gasol, J., Casamayor, E., Joint, I., Garde, K., Gustavson, K., Benlloch, S., Díez, B., Schauer, M., Massana, R. and Pedrós, C. 2004. Control of heterotrophic prokaryotic abundance and growth rate in hypersaline planktonic environments. *Aquatic Microbiology Ecology*. 34: 193-206.

- Grant, W., Kamekura, M., McGenity, T. and Ventosa, A. 2001. Halobacteria class. nov. In: Boone, D., Castenholz, R. and Garrity, G. (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer Verlag. N. Y., USA. Pp. 294-301.
- Grant, W. and Sorokin, D. 2011. Distribution and diversity of Soda Lake alkaliphiles. In: Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb, F. and Stetter, K. (Eds). *Extremophiles handbook*. Springer. N. Y., USA. Pp. 27-54 p.
- Eichler, J. 2003. Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco) proteins. *Microbiology Journal*. 149: 3347-3351.
- Easterling, D., Meehl, G., Parmesan, C., Changnon S., Karl, T. and Mearns, L. 2000. Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science*. 289: 2068-2074.
- Enache, M. and Kamekura, M. 2010. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Biotechnological Letters*. 47 (1): 47–59.
- Ettenauer, J., Jurado, V., Piñar, G., Miller, A., Santner, M., Saiz-Jiménez, C. and Sterflinger, K. 2014. Halophilic microorganisms are responsible for the rosy discolouration of saline environments in three historical buildings with mural paintings. *PLoS One*. 9 (8): 13.
- Fani, R. 2012. The origin and evolution of metabolic pathways: why and how did primordial cells construct metabolic routes? *Evolution: Education & Outreach*. 5(3): 367-381.
- Freitas, F., Alves V. and Reis, M. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. 29: 388-398.

- Fulzele, R., DeSa, E., Yadav, A., Shouche, Y. and Bhadekar, R. 2011. Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolate from the Indian Ocean. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 1364-1373 p.
- Galinski, E. 1995. Osmoadaptation in bacteria. In: Poole, R. (Ed). *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press. London. Pp. 273-329.
- Galinski, E. and Louis, P. 1998. Compatible solutes: ectoine production and gene expression. In: Oren, A. (Ed). *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. CRC Press. Florida, USA. Pp. 187-202.
- Grant, W., Gemmel, R. and McGenity, T. 1998. Halophiles. In: Horikoshi, K and Grant, W. (Eds). *Extremophiles: microbial life in extreme environment*. Wiley. USA. Pp. 93-132.
- Grant, W. and Sorokin, D. 2011. Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles. In: Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A., Robb, F. and Stetter, K. (Eds). *Springer: Extremophiles handbook*. N.Y. USA. Pp. 27–54.
- Gu, Di., Jiao, Y., Wu, J., Liu, Z. and Chen, Q. 2017. Optimization of EPS production and characterization by a halophilic bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with response surface methodology. *Molecules Journal*. 22 (5): 814.
- Guixa-Boixareu, N., Calderón-Paz, J., Haldal, M., Bratbak, G. and Pedrós-Alió, C. 1996. Viral lysis and bacteriology as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquatic Microbiology Ecology*. 11:215-227.
- Gupta, S., Sharma, P., Dev, K., Srivastava, M. and Souriraja, A. 2015. A diverse group of halophilic bacteria exist in Lunsu, a natural salt water body of Himachal Pradesh, India. *Springer Plus*. 4: 274-273.

- Han, J., Hou, J., Liu, H., Cai, S., Feng, B., Zhou, J., Xiang, H. 2010. Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 7811-7819.
- Harrison, J., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D. and Cockell, C. 2013. The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiology*. (21): 204-212.
- Hedi, A., Sadfi, N., Fardeau, M., Rebib, H., Cayol, J., Ollivier, B. and Boudabous, A. 2009. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International Journal of Microbiology*. 2009: 17.
- Hernández, K. 2013. Cuéntame un cuento: Taller para el mejoramiento a la Lecto-Escritura en Ixtapa, Chiapas. Tesina de Licenciatura en Lengua y Literatura Hispanoamericanas. Facultad de Humanidades. UNACH. Chiapas, México. 59 pp.
- Hook, L. Odelson, D., Bogardt, A., Hemmingsen, B., Labeda, D. and MacDonell, M. 1991. Numerical analysis of DNA restriction fragment length polymorphism, and whole cell protein banding patterns: a means of bacterial identification at the species and subspecies level. *USFCC Newsletter*. 21 (3): 1-10.
- Hong, H., Huang, J., Khaneja, R., Hiep, L., Urdaci, M., and Cutting, S. 2008. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 105 (2): 510-520.
- Horikoshi, K., 2006. Alkaliphiles: genetic properties and applications of enzymes. In: Horikoshi, K. (Ed). Springer. N. Y., USA. 270 pp.

- Horikoshi, K., Bull, A., Robb, F. and Stetter, K. 2011. Distribution of Extremophiles and Extremotroph. In: Horikoshi, K. (Ed). Extremophiles Handbook. Springer. Pp. 6-7.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. and Pace, N., 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bacteriology*. 180: 4765-4774.
- Imhoff, J. and Trueper, H. 1981. *Ectothiorhodospira abdelmalekii* sp.nov., a new extremely halophilic and alkaliphilic phototrophic bacterium. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*. 2 (3): 228-234.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). 2019. Ixtapa. Recuperado <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM07chiapas/municipios/07044a.html>
- Jadoon, W., Nakai, R. and Naganuma, T. 2013. Biogeographical note on Antarctic microflorae: Endemism and cosmopolitanism. *Geoscience Frontiers*. 4 (6): 633-646.
- Jan-Roblero, J., Magos, X., Fernández, L., Hernández-Rodríguez, C. and Le Borgne, S. 2004. Phylogenetic analysis of bacterial populations in waters of the former Texcoco Lake, Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*. 50 (12): 1049-1059.
- Jensen, R. 1976. Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annual Review of Microbiology*. 30: 409-425.
- Kamekura, M. and Kates, M. 1999. Structural diversity of membrane lipids in members of Halobacteriaceae. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63: 969-972.

- Karan, R., Capes, M. and DasSarma, S. 2012. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*. 8 (4): 1-15.
- Karan, R., Mohan-Singh, R., Kappor, S. and Khare, K. 2011. Gene identification and molecular characterization of solvent stable protease from a moderately haloalkaliphilic bacterium, *Geomicrobium* sp. EMB2. *Journal Microbiology Biotechnology*. 21: 129-135.
- Kamekura, M. and Onishi, H. 1974. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *Journal Bacteriology*. 119: 339-344.
- Kaur, B. 2004. Investigation of the identity and biocorrosive ability of a novel deep-sea bacterium, belonging to the genus *Halomonas* from the Titanic. PhD thesis. Dalhousie University. New Escotia, Canada. 171 pp.
- Kerkar, S. 2004. Ecology of hypersaline microorganisms. Marine microbiology: facets and opportunities. In: Ramaiah, N. (Ed). National Institute of Oceanography Goa. Goa, India. Pp. 37-47.
- Kevbrin, V., Zhilina, TN., Rainey, FA. and Zavarzin, GA. 1998. *Tindallia magadiigen*. nov., sp. nov.: an alkaliphilic anaerobic ammonifier from soda lake deposits. *Current Microbiology*. 37: 94-100.
- Kjeldsen, K., Loy, A., Jakobsen, I., Thomsen, T., Wagner, M. and Ingvorsen, K. 2007. Diversity of sulphatereducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake. *FEMS Microbiology Ecology*. 60: 287-298.
- Khomyakova, M., Bükmez, Ö., Thomas, L., Erb, T. and Berg, I. 2011. A methylaspartate cycle in haloarchaea. *Science*. 331: 334-337.

- Koeuth, T., Versalovic, J. and Lupski, J. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*. 5: 408-418.
- Kumar, A., Mody, K. and Jha, B. 2007. Bacterial exopolysaccharides a perception. *Journal Basic Microbiology*. 47 (2): 103-117.
- Kushner, D. and Kamekura, M., 1988. Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodriguez-Valera, F. (Ed). Halophilic bacteria. CRC Press. Florida, USA. Pp. 1: 109-138.
- Kushner, DJ., 1993. Growth and nutrition of halophilic bacteria. In: Vreeland, R. and Hochstein, L. (Eds), The biology of halophilic bacteria. CRC Press. Florida, USA. Pp. 87-89.
- Kushner, D. and Bayley, S., 1963. The effect of pH on surface structure and morphology of the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. *Journal Microbiology*. 9: 53–65.
- Lanyi, J. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Journal Bacteriology*. 38 (3): 272-290.
- Lechner, J. and Sumper, M. 1987. The primary structure of a procaryotic glycoprotein. Cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of halobacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 262: 9724-979.
- Lemos-Delgado, A. and Mina-Cordoba A. 2015. Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Revista SENA*. Colombia. 79 (1): 93-101.

- Leuko, S., Legat, A., Fendrihan, S. and Stan-Lotter, H. 2004. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of environmental hypersaline samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 6884-6886.
- Leuko, S., Legat, A., Fendrihan, S., Wieland, H., Radax, C., Gruber, C., Pfaffenhuemer, M., Weidler, G. and Stan-Lotter, H. 2005. Isolation of viable haloarchaea from ancient salt deposits and application of fluorescent stains for in situ detection of halophiles in hypersaline environmental samples and model fluid inclusions. In: Gunde-Cimerman, N., Oren, A. and Plemenitas, A. (Eds). Cellular origins, life in extreme habitats and astrobiology (COLE). Springer Verlag. N.Y., USA. Pp. 91-104.
- Li, X. and Hui, Y. 2015. Biodiversity and screening of halophilic bacteria with hydrolytic and antimicrobial activities from Yuncheng Salt Lake, China. *De Gruyter: Biology*. 70 (2): 151-156.
- Litchfield, C. 1998. Survival strategies for microorganism in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics and Planetary Science*. 33: 813-819.
- Lizama, C., Monteoliva-Sanchez, M., Prado, B., Ramos-Cormenzana, A., Weckesser, J. and Campos, V. 2001. Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the "Salar de Atacama", Chile. *Systematic and Applied Microbiology*. 24: 464-474.
- Loaec, M., Olier, R. and Guezennec, J. 1997. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*. 31: 1171-1179.
- Loli, H., Narwal, S., Saun, N. and Gupta, R. 2015. Lipases in Medicine: An Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 15 (14): 1209-1216.

- López-Cortés, A., García-Pichel, F., Nübel, U. and Vázquez-Juárez, R., 2011. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *International Microbiology*. 4: 227-236.
- Louden, B., Haarmann, D. and Lynne, A. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal Microbiology Biology Education*. 12 (1): 51-53.
- Llamas, I., Quesada, E., Martínez-Cánovas, M., Gronquist, M., Eberhard, A. and González, JE. 2005. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lacton. *Extremophiles*. (4): 333-341.
- Llamas, I., Amjres, H., Mata, J., Quesada, E. and Béjar, V. 2012. The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Journal Molecules*. 17: 7103-7120.
- Maier, R., Pepper, I. and Gerba, Ch. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press. CA., USA. 589 pp.
- Manea, V. and Manea, M. 2006. Origin of the modern Chiapanecan Volcanic arc in southern México inferred from thermal models. In: Rose, W., Bluth, G., Carr, M., Ewert, J., Patino, L. and Vallance, J. (Eds). Volcanic Hazards in Central America. Geological Society of America. Colorado, USA. Pp. 27-38.
- Margalef, D. 1958. Information theory in ecology. *General Systematics*. 3: 36-71.
- Martínez-Hernández, E. 1992. Caracterización ambiental del terciario de la región de Ixtapa, Estado de Chiapas, un enfoque Palinoestratigráfico. *Revista del Instituto de Geología UNAM*. 10 (1): 54-64.

- Massol-Deya, A., Odelson, D., Hickey, R. and Tledje, J. 1995. Bacterial Community Fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A., Van Elsas, J. and De Bruijn, F. (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer. Dordrecht, Holland. Pp. 289-296.
- Mata, J., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P. and Tallon, R. 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology*. 157: 827-835.
- Mata-Fernández, I., Rodríguez-Gamiño, ML., López-Blanco, J. y Vela-Correa, G. 2014. Dinámica de la salinidad en los suelos. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente*. 1: 26-35
- Maynard, J., 1995. Do bacteria have population genetics? In: Boumberg E., Young, J., Saunders, J. and Wellington, E. (Eds). *Population genetics of bacteria*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. Pp. 1-12 p.
- Mesbah, N. and Wiegel, J. 2012. Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4074-4082.
- McGenity, T. and Oren, A. 2012. Life in environmental extreme. *Hypersaline Environments*. CABI. UK. Pp. 402-437.
- Mohr, V. and Larsen, H. 1963. On the structural transformation and lysis of *Halobacterium salinarium* in hypotonic and isotonic solutions. *Journal of General Microbiology*. 31: 267-280.

- Mondal, K., Kumar, J., Pandey, R., Gupta, S., Kumar, M., Bansal, G., Mukerjir, M., Dash, D. and Chauhan, N. 2017. Comparative Genomics of Host–Symbiont and Free Living *Oceanobacillus* Species. *Genome Biology Evolution*. 9 (5): 1175-1182.
- Monteoliva, M., Ferrer, M., Ramos-Cormenzana, A., Quesada, E. and Monteoliva, M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila* effect of growth temperature and salt concentration. *Journal Genetic Microbiology*. 134: 199-203.
- Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A. and Russell, N. 1993. The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *Journal General Microbiology*. 139: 1877-1884.
- Morita, R. 1980. Calcite precipitation by marine bacteria. *Journal Geomicrobiol.* 2: 63-82.
- Mora, J., Layer, P. and Jaimes-Viera, C. 2012. New  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  ages from the Central Part of the Chiapanecan Volcanic Arc, Chiapas, México. *Geofísica Internacional*. 51 (1): 39-49.
- Moschetti, G., Aponte, M., Blaiotta, G., Casaburi, A., Chiurazzi, M., Ventrino, V. and Villani, F. 2006. Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. *Annals of Microbiology*. 56: 119-127.
- Mukherjee, P., Mitra A., and Roy M. 2019. *Halomonas* rhizobacteria of *Avicennia marina* of indian sundarbans promote rice growth under saline and heavy metal stresses through exopolysaccharide production. *Frontiers in Microbiology*. 10 (1207): 1-18.

- Mueller, D., Vincent, W., Bonilla, S. and Laurion, I. 2005. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 53: 73–87.
- Müllerried, F. 1957. Geología de Chiapas. Gobierno Constitucional del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 180 pp.
- Muyzer, G., De Waal, E. and Uitterlinden, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 695-700.
- Nam, H., Conrad, T. and Lewis, N. 2011. Metabolic pathway evolution and cellular objectives. *Current Opinion in Biotechnology*. 22 (4): 595-600.
- National Park Service Arkansas. 2006. The Natural Systems in Hot Springs National Park or “Follow the Water”. 1: 22. Recuperado de [https://www.nps.gov/hosp/learn/education/upload/followthewater\\_final.pdf](https://www.nps.gov/hosp/learn/education/upload/followthewater_final.pdf)
- Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letter*. 170: 2017-2021.
- Niemetz, R., Karcher, U., Kandler, O., Tindall, B.J. and König, H. 1997. The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *European Journal of Biochemistry*. 249: 905-911.
- Nuestro México. 2017. Las Salinas, Chiapas. Recuperado de <http://www.nuestro-mexico.com/Chiapas/Ixtapa/Areas-de-menos-de-20-habitantes/Las-Salinas/>

- Ochsenreiter, T., Pfeifer, F. and Schleper, C. 2002. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles*. 6: 267-274.
- Obis, D., Guilliot, A., Gripon, J., Renault, P., Bolotin, A. and Mistou, M. 1999. Genetic and biochemical characterization of high affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *Journal Bacteriology*. 181 (20): 6238-6246.
- Ollivier, B., Hatchikian, C., Prensier, G., Guezennec, J. and Garcia, J. 1991. *Desulfohalobium retbaense* gen. nov. sp. nov., a halophilic sulphate-reducing bacterium from sediments of a hypersaline lake in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41: 74-81.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. and Mah, R. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiological Reviews*. 58: 27-38.
- Oueriaghli, N. 2013. Estudio de la diversidad procariota en ambientes salinos empleando técnicas moleculares. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Granada, España. 323 pp.
- Oren, A. 1995. Uptake and turnover of acetate in hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology*. 18: 75-84.
- Oren, A., 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 63: 334-348.
- Oren, A., 2002. Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 39:1-7.

- Oren, A. and Gurevich, P. 1995. Dynamics of a bloom of halophilic archaea in the Dead Sea. *Hydrobiology*. 315: 149-158.
- Oren, A. 2006. Life at high salt concentrations. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, H. and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. Springer. N. Y. USA. Pp. 2: 263-282.
- Oren, A., Gurevich, P., Anati, D., Barkan, E. and Luz, B. 1995. A bloom of *Dunaliella parva* in the Dead Sea in 1992: biological and biogeochemical aspects. *Hydrobiology*. 297: 173-185.
- Oren, A. 2006. The order Haloanaerobiales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, H. and Stackebrandt, E. (Eds). *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer. N. Y., USA. Pp. 3 (4): 804-817.
- Oren, A. 2009. Microbial diversity and microbial abundance in salt saturated brines: Why are the waters of hypersaline lakes red? *Natural Resources and Environmental Issues*. 15 (49): 247-255.
- Oren, A. 2010. Industrial and environmental application of halophilic microorganisms. *Environmental Science and Technology*. 31 (8–9): 825–834.
- Oren, A., 2011. Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*. 13: 1908-1923.
- Oremland, R. 1990. Nitrogen fixation dynamics of two diazotrophic communities in Mono Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 614-622.

- Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian Journal Microbiology*. 47: 621-627.
- Pan, D., Pham, C., Weilbaecher, K., Tomasson, M., Wickline, S. and Lanza, G. 2016. Contact-facilitated drug delivery with Sn2 lipase labile prodrugs optimize targeted lipid nanoparticle drug delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology branding banner*. 8 (1): 85-106.
- Padilla, J., 2007. Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 59 (1): 19-42.
- Pagaling, E., Wang, H., Venables, M., Wallace, A., Grant, W., Cowan, D., Jones, B., Ventosa, A. and Heaphy, S. 2009. Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a Salt Lake in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 5750-5760.
- Papke, R., Zhaxybayeva, O., Feil, E., Sommerfeld, K., Muise, D. and Doolittle, W. 2007. Searching for species in haloarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 104: 14092-14097.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J., MacLean, M., Medina, G., Marassé, C., Gasol, J. and Guixa-Boixereu, N., 2000a. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 143-155.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J. and Gasol, J. 2000b. Comparative analysis shows that bacterivory, not viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 157-165.

- Poli, A., Anzelmo, G. and Nicolaus, B. 2010. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs Journal*. 8 (6): 1779-1802.
- Poser, A., Vogt, C., Knoeller, K., Finster, K., Sorokin, DY., Lohmayer, R., Planer-Friedrich, B. and Richnow, H. 2013. Disproportionation of elemental sulfur by haloalkaliphilic bacteria from Soda lakes. *Extremophiles*.17: 1003-1012.
- Post, F. 1977. The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbiology Ecology*. 3: 143-165.
- Qvit-Raz, N., Jurkevitch, E. and Belkin, S. 2008. Drop-size soda lakes: transient microbial habitats on a salt-secreting desert tree. *Genetics*. 178: 1615-1622.
- Rademaker, J., Aarts, H. and Vinuesa, P. 2005. Molecular typing of environmental isolates. Osborn, M. and Smith C. (Eds). *Molecular Microbial Ecology*. BIOS Advanced methods. USA. Pp. 89-124.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M., and Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 28: 142-149.
- Ramírez, N., Sandoval, A. y Serrano, J. 2004. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de microbiología*. Recuperado de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562004000100004](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100004)
- Ramírez, N., Serrano, J. y Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos: Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37 (3): 56-71.

- Rincón-Molina, C. 2016. Identificación molecular de comunidades bacterianas en el Cráter-Lago del Volcán Chichón. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. México. 86 pp.
- Rincón-Rosales, R., Villalobos-Escobedo, JM., Rogel, MA., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. 2013. *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayanse* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 3423-3429.
- Roberts, M. 2004. Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Frontiers Bioscience*. 1 (9): 1999-2019.
- Rodriguez-Valera, F. 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: Rodriguez-Valera F. (Ed). Halophilic Bacteria. CRC Press. Florida, USA. Pp. 1: 3-30.
- Rodriguez-Valera, F., Juez, G. and Kushner, D. 1982. Halocins: Salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Canadian Journal of Microbiology*. 28: 151-154.
- Rohban, R., Amoozegar, A. and Ventosa, A. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolases from Howz Soltan Lake Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 36: 3-33.
- Romano, I., Lama, L., Nicolaus, B., Poli, B., Gambacorta, A. and Giordano, A. 2006. *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* subsp. nov., an alkalitolerant halophile isolated from an algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy), and emended description of *Oceanobacillus oncorhynchi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 805-810.

- Rosen, B. 1987. Bacterial calcium transport. *Biochimica et Biophysica Acta*. 906: 101–110.
- Ross, H., Grant, W. and Harris, J. 1985. Lipids in archaebacterial taxonomy. In: Goodfellow, M. and Minnekin, D. (Eds). *Chemical methods in bacterial systematics*. Academic Press. London. Pp. 289-299.
- Rothschild, L. and Mancinelli, R. 2001. Life in extreme environments. *Nature*. 409: 1092-1101.
- Ruiz-Valdiviezo, V., Ventura-Canseco, L., Castillo-Suárez, L., Gutiérrez-Miceli, F., Dendooven, L. and Reiner-Rincon, R. 2015. Symbiotic potential and survival of native rhizobia kept on different carriers. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46 (3): 735-742.
- Russell, NJ. 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. In: Russell, H. and Hochstein, L. (Eds). *The biology of halophilic bacteria*. CRC Press. Florida, USA. Pp. 1:163-210.
- Saitou, N. and Imanishi, M. 1989. Relative efficiencies of the Fitch Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic reconstructions in obtaining the correct tree. *Molecular Biology Evolution*. 6: 514-525.
- Saum, S. and Muller, V. 2008. Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline System*. 4(4): 15 p. DOI: 10.1186/1746-1448-4-4
- Sandy, M., and Bluter, A. 2009. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chemical Reviews*. 109 (10): 4580-4595.

- Sánchez-Porro, C., Kaur, B., Mann, H. and Ventosa, A. 2010. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 2768-2774.
- Schleifer, K., Steber, J. and Mayer, H. 1982. Chemical composition and structure of the cell wall of *Halococcus morrhuae*. *Zentrbl Bakteriol Mikrobiol Hyg I Abt Orig*. 3: 171-178 p.
- Seckbach, J., Oren, A. and Stan-Lotter, H. 2013. Polyextremophiles: life under multipleForms of stress. Springer. Dordrecht, Netherlands. 615 p.
- Serrano, L., Pitts, B., Uchida, M., and Richards A. 2016. Vesicle self-assembly of amphiphilicsiderophores produced by bacterial isolates from Soap Lake Washington. *Canadian Journal of Chemistry*. 94 (1): 35-43.
- Setati, E. 2009. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*. 9 (11): 1555-1560.
- Sewald, X., Saum, SH., Palm, P., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D. and Müller, V. 2007. Autoinducer-2-producing protein LuxS, a novel salt- and chloride-induced protein in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (2): 371-379.
- Sheng-Jin, Li., Zheng-Shuang, H., Li-Nan, H., Jie, L., Su-Hua, S., Lin-Xing, C., Jia-Liang, K., Jun, L., Min, H. and Wen-Sheng, S. 2014. Microbial communities evolve faster in extreme environments. *Scientific Reports*. 4 (6205): 1-9.

- Shirazian, P., Asad, S. and Amoozegar, M. 2016. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI Journal*. 15: 268-279.
- Shubhangi, H. and Anupama, P. 2016. Saline Soil Microbiome: a rich source of halotolerant PGPR. *Journal Crop Science Biotechnology*. 19 (3): 231-239.
- Simon, R., Abeliovich, A. and Belkin, S. 1994. A novel terrestrial halophilic environment: the phylloplane of *Atriplex halimus*, a salt-excreting plant. *FEMS Microbiology Ecology*. 14: 99-110.
- Simpson, E. 1949. Measurement of diversity. *Nature*. 163 (4148): 688.
- Silva, C. y Vinuesa, P. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los rizobios. *Ecología molecular*. SEMARNAT. D.F., México. Pp. 351-424.
- Sorokin, D. 1998. Occurrence of nitrification in extremely alkaline natural habitats. *Microbiology*. 67: 404-408.
- Sorokin, D., Tourova, T., Lysenko, A. and Kuenen, J. 2001c. Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 528-538.
- Sorokin, D., Tourova, T., Lysenko, A., Mityushina, L. and Kuenen, J. 2002b. *Thioalkalivibrio thiocyanooxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria from the soda lakes able to grow with thiocyanate. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. 52: 657-664.

- Sorokin, D., Antipov, A. and Kuenen, J. 2003. Complete denitrification in a co-culture of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from a soda lake. *Archives of Microbiology*. 180: 127-133.
- Sorokin, D., Tourova, T., Antipov, A., Muyzer, G., Kuenen, J. 2004b. Anaerobic growth of the haloalkaliphilic denitrifying sulphur-oxidising bacterium *Thi alkalivibrio thiocyanodenitrificans* sp. nov. with thiocyanate. *Microbiology*. 150: 2435-2442.
- Sorokin, D. and Kuenen, J. 2005. Alkaliphilic chemolithotrophs from sodas lakes. *FEMS Microbiology Ecology*. 52: 287-295.
- Sorokin, D., Tourova, T., Mussmann, M. and Muyzer, G. 2008b. *Dethiobacter alkaliphilus* gen. nov. sp. nov., and *Desulfurivibrio alkaliphilus* gen. nov. sp. nov. two novel representatives of reductive sulfur cycle from soda lakes. *Extremophiles*. 12: 431-439.
- Sorokin, D., Tourova, T., Henstra, A., Stams, A., Galinski, E. and Muyzer, G. 2008. Sulfidogenesis at extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatrosipira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatrosipira delicata* sp. nov. - a novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes. *Microbiology*. 154: 1444-1453.
- Sorokin, D. and Muyzer, G. 2010. *Desulfurispira natronophila* gen. nov. sp. nov.: an obligately anaerobic dissimilatory sulfur-reducing bacterium from soda lakes. *Extremophiles*. 14: 349-355.
- Sorokin, D., Rusanov, I., Pimenov, N., Tourova, T., Abbas, B. and Muyzer, G. 2010a. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions in soda lakes of Kulunda steppe (Altai, Russia). *FEMS Microbiology Ecology*. 73:278–290 p.

- Sorokin, D., Tourova, T., Detkova, E., Kolganova, T., Galinski, E. and Muyzer, G. 2011. Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thiosulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovibrio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov. *Extremophiles*. 15: 391-401.
- Sorokin, D., Kuenen, J. and Muyzer, G. 2011b. The microbial sulfur cycle in soda lakes. *Frontiers in Microbiology*. 2: 44.
- Sorokin, D., Detkova, E. and Muyzer, G. 2011. Sulfur-dependent respiration at extremely haloalkaline conditions in soda lake “acetogens” and the description of *Natroniella sulfidigena* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters*. 319: 88-95.
- Sorokin, D., Tourova, T., Panteleeva, A., Kaparullina, E. and Muyzer, G. 2012. Anaerobic utilization of pectinous substrates at extremely haloalkaline conditions by *Natranaerovirga pectinivora* gen. nov., sp. nov., and *Natranaerovirga hydrolytica* sp. nov., isolated from hypersaline soda lakes. *Extremophiles*. 16:307-315.
- Sorokin, D., Abbas, B., Tourova, T., Bumazhkin, B., Kolganova, T. and Muyzer, G. 2014b. Sulfate-dependent acetate oxidation at extremely natron-alkaline conditions by syntrophic associations from hypersaline soda lakes. *Microbiology*. 160: 723-732.
- Sorokin, D., Berben, T., Melton, E., Overmars, L., Vavourakis, C. and Muyzer, G. 2014. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*. 18 (5): 791-809.

- Stephens, D., Gillespie, D. 1976. Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. *Limnology Oceanography*. 21: 74-87.
- Suresh, K., Prabakaran, S., Sengupta, S. and Shivaji, S. 2004. *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1369-1375.
- Tahrioui, A., Quesada, E. and Llamas, I. 2011. The hanR/hanI quorum-sensing system of *Halomonas anticariensis*, a moderately halophilic bacterium. *Microbiology*. 157 (12): 3378–3387.
- Tahrioui, A., Schwab, M., Quesada, E. and Llamas, I., 2013b. *Quorum sensing* in some representative species of halomonadaceae. *Life*. 3: 260–275.
- Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512-526.
- Tindall, B. 1988. Prokaryotic life in the alkaline, saline, athalassic environment. In: Rodriguez-Valera F. (Ed). Halophilic bacteria. CRC Press. Florida, USA. Pp. 1:31-67.
- Tourova, T., Spiridonova, E., Berg, I., Slobodova, N., Boulygina, E. and Sorokin, D. 2007. Phylogeny and evolution of the family Ectothiorhodospiraceae based on comparison of 16S rRNA, cbbL and *nifH* genes. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. 57: 2387-2398.
- Valderrama, M., Monteoliva-Sánchez, M., Quesada, E. and Ramos-Cormenzana, A. 1988. Influence of salt concentration on the cellular composition of the

- moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Research in Microbiology*. 149: 675-679.
- Van-Belkum, A. and Hermans, P. 2001. BOX PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods in Molecular Medicine*. 48: 159-168.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C. and Marqués, M. 2008. Halophilic and halotolerant microorganisms from soils. In: Dion, P. and Nautiyal, C. (Eds). *Microbiology of Extreme Soils*. Springer. N.Y., USA. Pp. 87-115.
- Ventosa, A., Nieto, J. and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 504-544.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19: 6823-6831.
- Walsby, A. 1980. A square bacterium. *Nature*. 283: 69-71.
- Walsby, A. 1994. Gas vesicles. *Microbiological Reviews*. 58: 94-144.
- Walsby, A. 2005. Archaea with square cells. *Trends in Microbiology*. 13: 193-195.
- Ward, D., Weller, R. and Bateson, M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 345: 63-65.
- Ward, D. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. 1: 271-277.

- Warren, J. 2015. *Evaporites a geological compendium* 2ed. Springer. N.Y., USA. 1657 pp.
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. and Lane D. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. 173: 697-703.
- Wernick, D., Pontrelli, S., Pollock, A. and Liao, J. 2016. Sustainable biorefining in wastewater by engineered extreme alkaliphile *Bacillus marmarensis*. *Nature*. 6 (20224): 1-10.
- Wood, J., Bremer, E., Csonka, L., Krämer, R., Poolman, B., Van der Heide, T. and Smith, L. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solutes accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130: 437-460.
- Wolfaardt, G., Lawrence, J. and Korbe, D. 1999. Function of EPS. In: Wingender, J., Neu, T. and Flemming, H. (Eds). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Springer-Verlag. N.Y., USA. Pp. 171-200.
- Worthington, M., Luo, R. and Pelo, J. 2001. Copacabana method for spreading *E. coli* and yeast colonies. *Biotechniques*. 30 (4): 738-742.
- Wuertz, S., Muller, E., Spaeth, R., Pfeleiderer, P. and Flemming H. 2000. Detection of heavy metals in bacterial biofilms and microbial flocs with the fluorescent complexing agent Newport Green. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 24: 116-123.
- Xie, F., Ma, H., Quan, S., Liu, D., Chen, G., Chao, Y. and Qian, S. 2014. *Pseudomonas kunmingensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing

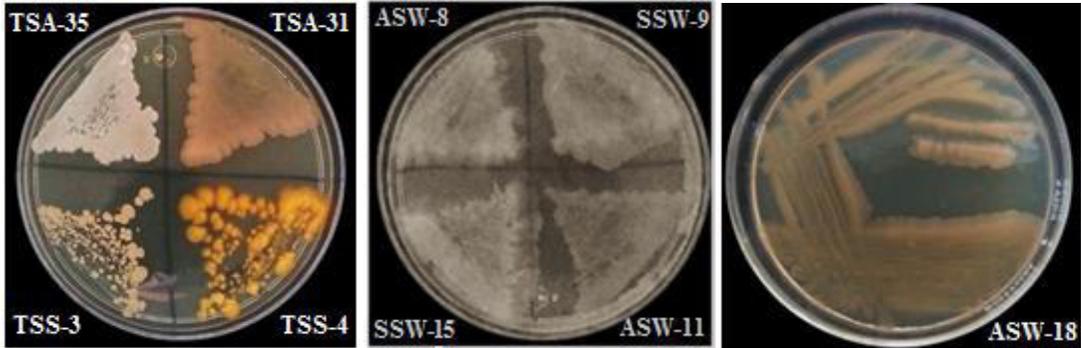
- bacterium isolated from a phosphate mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary*. 64 (2): 559-564.
- Ycas, M. 1974. On earlier states of the biochemical system. *Journal Theoretical Biology*. 144: 145-160.
- Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y. and Nakajima, K. 2005. *Oceanobacillus oncorhynchi* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile isolated from the skin of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and emended description of the genus *Oceanobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1521-1524.
- Zanchetta, P. and Guezennec, J. 2001. Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone active biomaterials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 22: 301–307.
- Zavarzin, G., Zhilina, T., and Kevbrin, V. 1999. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity. *Microbiology*. 68: 503-521.
- Zavarzin, G. and Zhilina, T. 2000. Anaerobic chemotrophic alkaliphiles. In: Seckbach, J. (Ed). *Journey to diverse microbial worlds*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp. 191-208.
- Zehr, J., Crumbliss, L., Church, M., Omoregie, E. and Jenkins, B. 2003. Nitrogenase genes in PCR and RT-PCR reagents: implications for studies of diversity of functional genes. *Biotechniques*. 35: 996-1005.
- Zhilina, T., Zavarzin, G., Detkova, E. and Rainey, F. 1995. *Natroniella acetigena* gen. nov. sp. nov., an extremely haloalkaliphilic, homoacetic bacterium: a new member of Haloanaerobiales. *Current Microbiology*. 32: 320-326.

Zhilina, T., Detkova, E., Rainey, F., Osipov, G., Lysenko, A., Kostrikin, N. and Zavarzin, G. 1998. *Natronoincola histidinovorans* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic acetogenic anaerobe. *Current Microbiology*. 37: 177-185.

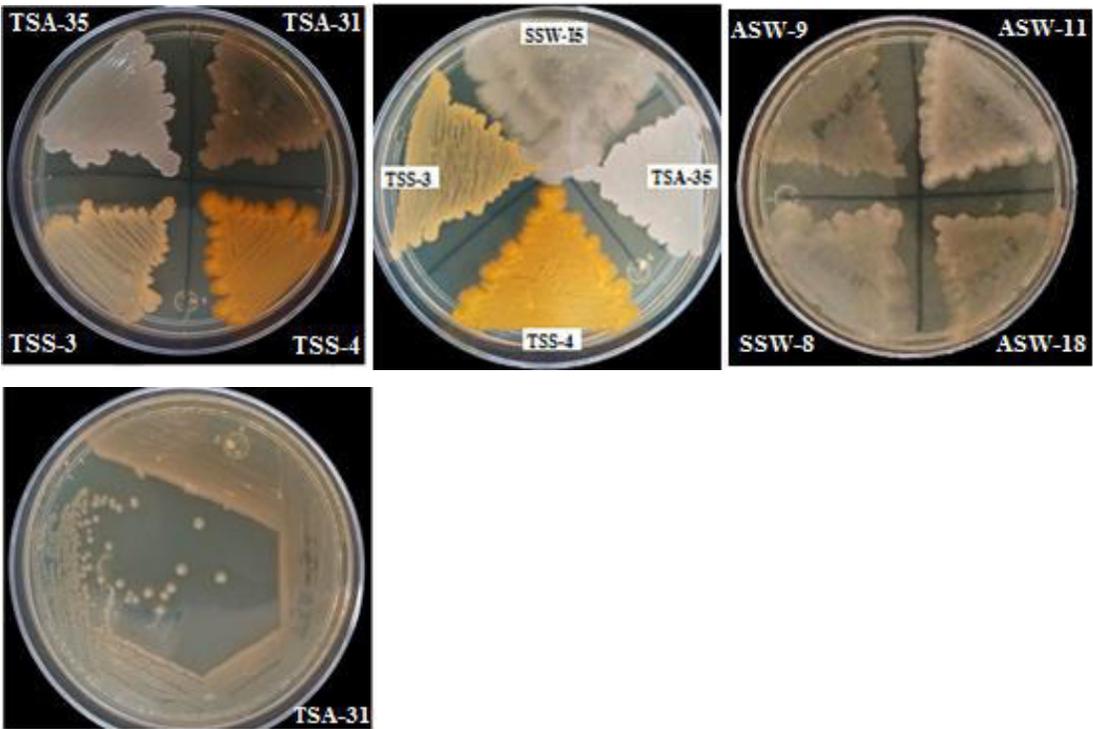
Zhilina, T., Zavarzina, D., Kolganova, T., Tourova, T. and Zavarzin, G. 2005. Candidatus "*Contubernalis alkalaceticum*", an obligately syntrophic alkaliphilic bacterium capable of anaerobic acetate oxidation in a coculture with *Desulfonatronum cooperativum*. *Microbiology*. 74: 695-703.

# XI. ANEXOS

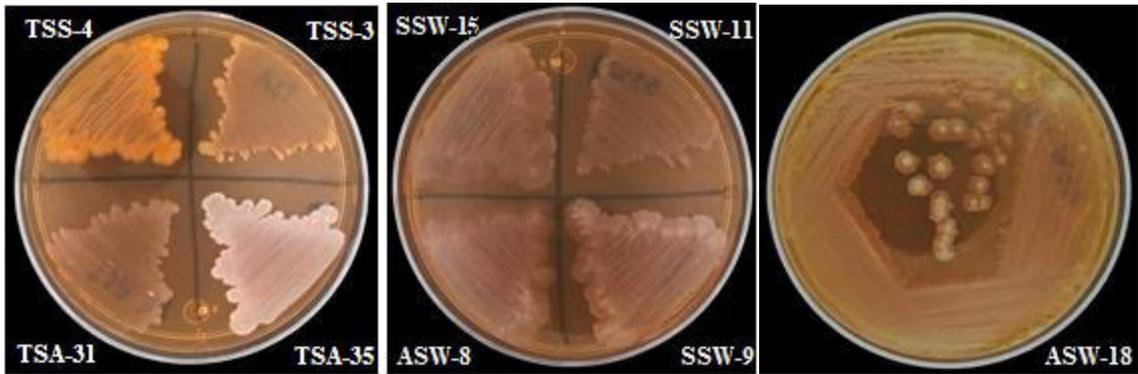
Anexo 1. Bacterias halófilas aisladas de Las Salinas, crecidas en pH 5.5.



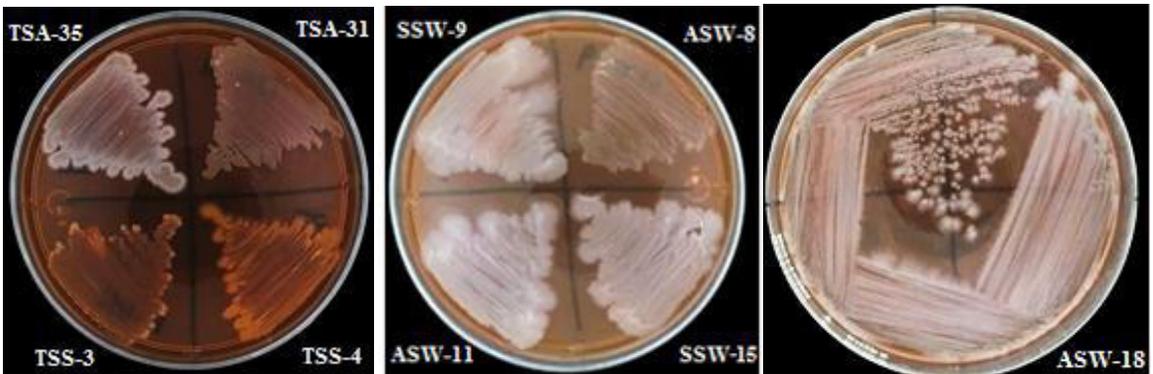
Anexo 2. Bacterias halófilas aisladas de Las Salinas, crecidas en pH 8.5.



Anexo 3. Bacterias halófilas aisladas de Las Salinas, crecidas en pH 10.5.



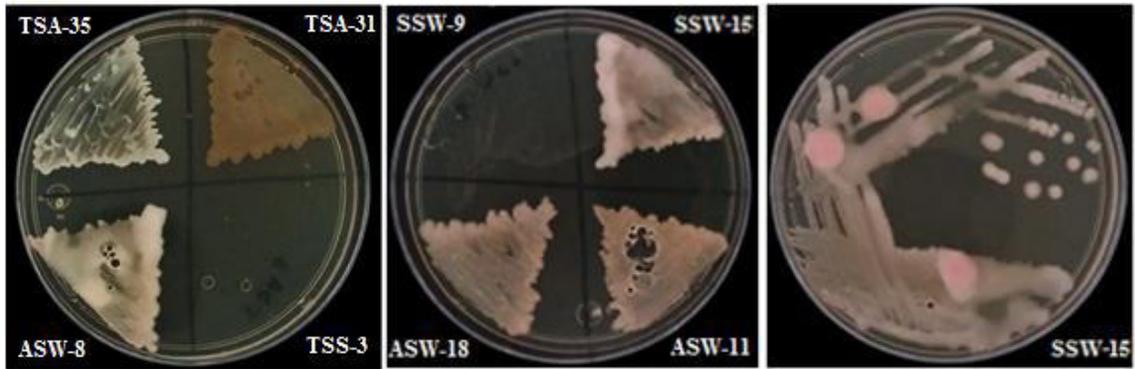
Anexo 4. Bacterias halófilas aisladas de Las Salinas, crecidas en pH 11.5.



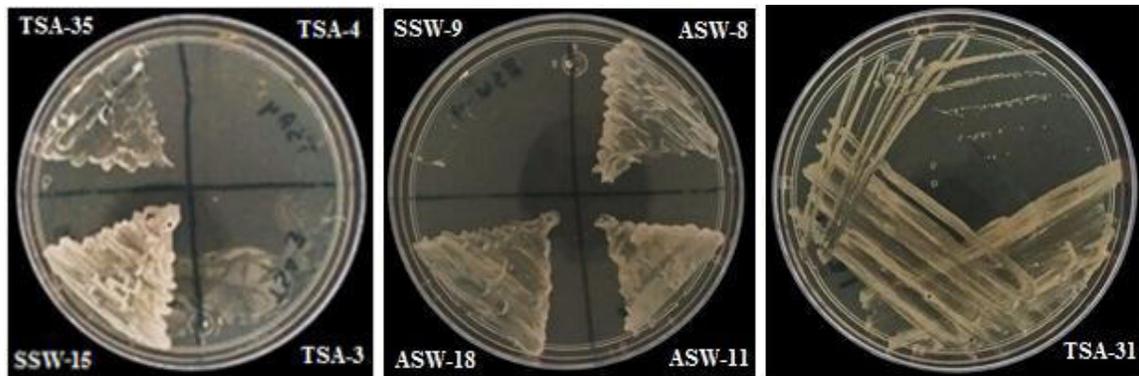
Anexo 5. Bacterias halófilas aisladas de Las Salinas, crecidas en 10 % de NaCl.



Anexo 6. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, crecidas en 15% de NaCl.



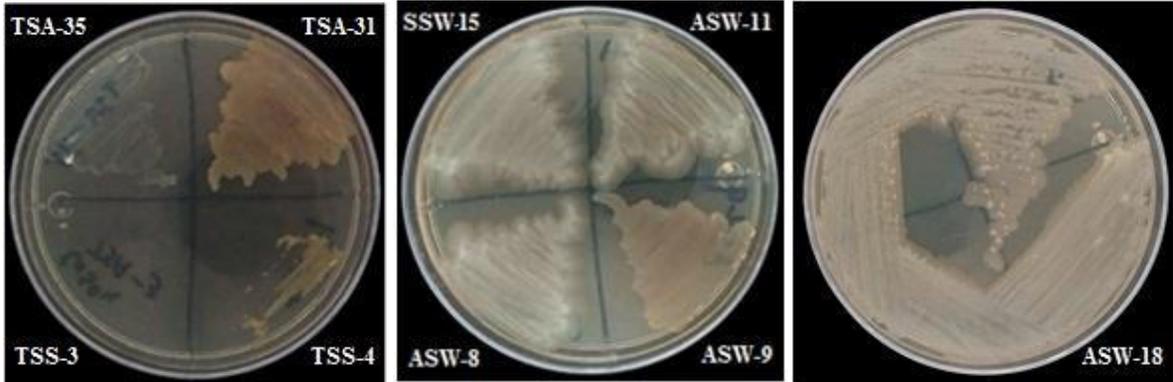
Anexo 7. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, crecidas en 20% de NaCl.



Anexo 8. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, crecidas en en  $\text{AlSO}_4$ .



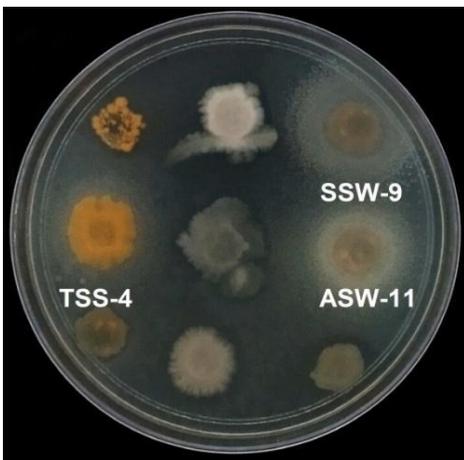
Anexo 9. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, crecidas en  $\text{CuSO}_4$ .



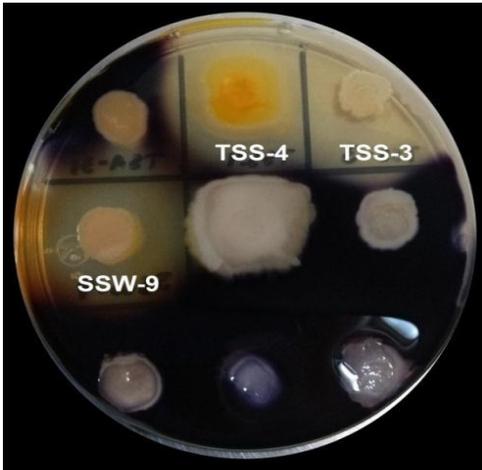
Anexo 10. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, con capacidad proteolítica.



Anexo 11. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, con capacidad lipídica.



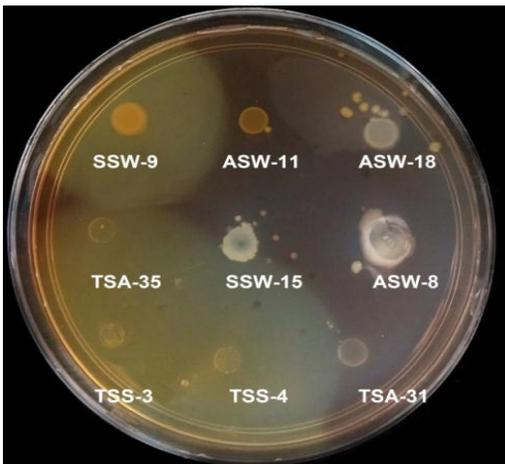
Anexo 12. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, con capacidad amilolítica.



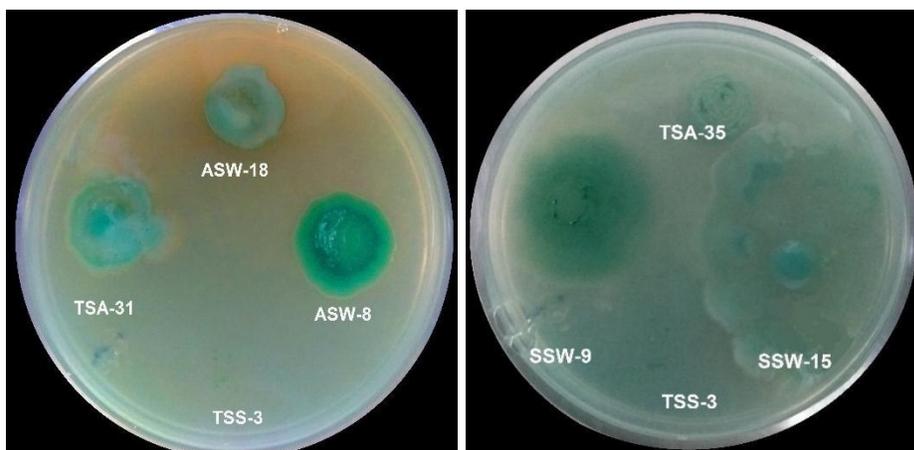
Anexo 13. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, con capacidad de solubilizar fosfato.



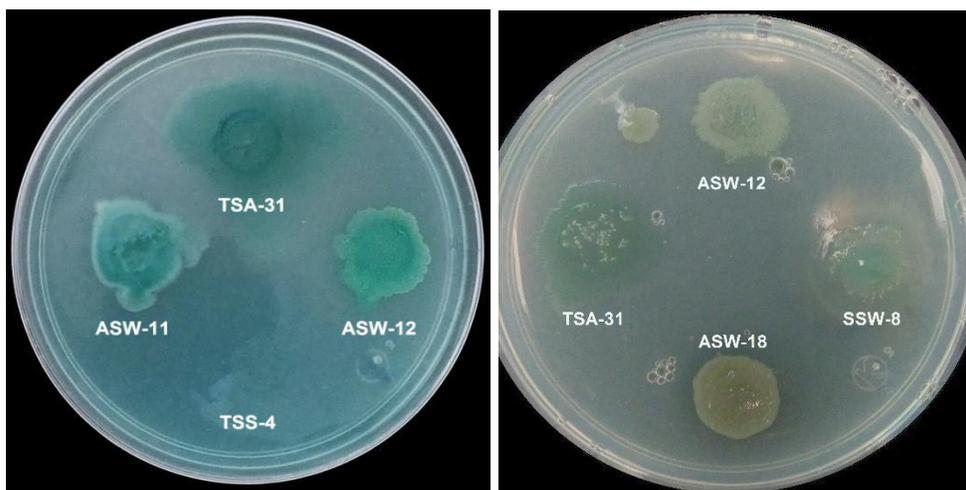
Anexo 11. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, con capacidad celulolítica.



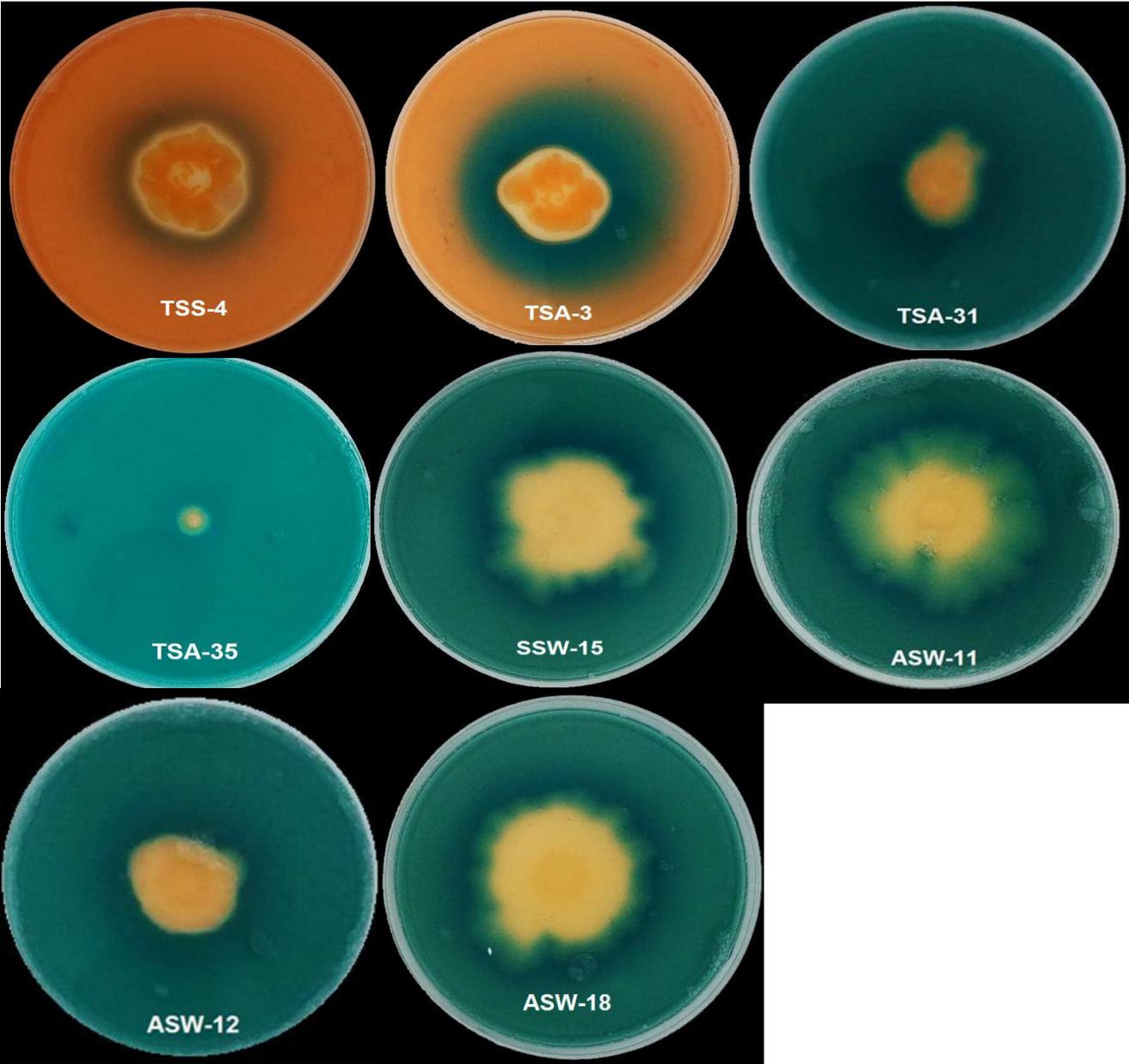
Anexo 15. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, productoras de glutaminasa.



Anexo 16. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, productoras de asparaginasa.



Anexo 17. Bacterias halofilas aisladas de Las Salinas, productoras de sideróforos.



Anexo 18. Manantial Las Salinas



Imagen de Revista Chiapas, 2014.



Imagen de Virginia Robles y Osiris del Carmen Torres, 2016.



Toma de muestras de agua y sedimento de Las Salinas con Don Manuel. Don Manuel continúa con esta tradición familiar de extracción de sal por cocimiento en Ixtapa.

Anexo 19. Cálculos realizados para índices ecológicos de bacterias halófilas

- Índice de Simpson en halófilas aisladas de TSA

$$\lambda = 0.015625 + 0.015625 + 0.0625 + 0.390625 + 0.015625 + 0.015625 = \underline{\underline{0.2658}}$$

- Índice de Shannon en halófilas aisladas de TSA

$$H' = 0.125 + 0.125 + 0.125 + 0.125 + 0.25 + 0.625 = 1.375 \ln = \underline{\underline{0.3184}}$$

- Índice de Jaccard

$$I_J = \frac{19}{11-8+19} = \underline{\underline{0.8636}}$$