



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES
(PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL)**

**“Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad
para capturar NaCl *in vitro*”**

TESIS QUE PRESENTA

DIANA NANCY CRUZ LUNA

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

SANTA CRUZ XOXOCOTLÁN, OAXACA

ENERO 2021



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-13
REP 2017

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 22 de Enero del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de CIIDIR UNIDAD OAXACA en su Sesión
(Unidad Académica)

Ordinaria No. 11 celebrada el día 14 del mes Diciembre de 2020 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Cruz	Apellido Materno:	Luna	Nombre (s):	Diana Nancy
--------------------------	-------------	--------------------------	-------------	--------------------	--------------------

Número de registro: B 1 8 0 4 7 0

del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl *in vitro*

Objetivo general del trabajo de tesis:

Identificar bacterias y arqueas halófilas; aisladas de las salineras de Salinas del Márquez, Salina Cruz, Oaxaca con propiedades para capturar y disminuir NaCl en medios de cultivo líquido.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: Dr. Alfonso Vásquez López 2° Director: Dra. Lucía Lourdes Martínez Martínez
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dr. Alfonso Vásquez López

Aspirante

Cruz Luna Diana Nancy

2° Director de Tesis (en su caso)

Dra. Lucía Lourdes Martínez Martínez

Presidente del Colegio

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CIIDIR OAXACA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
 REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Santa Cruz Xoxocotlán, Oax., siendo las 10:00 horas del día 22 del mes de Enero del 2021 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio del Centro de Investigación Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional, unidad Oaxaca (CIIDIR UNIDAD OAXACA) para examinar la tesis titulada:

Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl *in vitro*

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Cruz	Apellido Materno:	Luna	Nombre (s):	Diana Nancy
-------------------	------	-------------------	------	-------------	-------------

Número de registro: B 1 8 0 4 7 0

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y

Aprovechamiento de Recursos Naturales

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 11 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuentes original)*

El 11% se localiza en parte de la revisión de literatura y metodología adecuadamente referidas a la fuente original.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

La alumna cumplió con los objetivos que se establecieron dentro de su investigación, por ello el Comité de Revisión de Tesis avala su escrito para proseguir con el proceso de Titulación de la alumna.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

 Dr. Alfonso Vásquez López
 Director de Tesis
 Nombre completo y firma

 Dra Lucía Lourdes Martínez Martínez
 2° Director de Tesis (en su caso)
 Nombre completo y firma

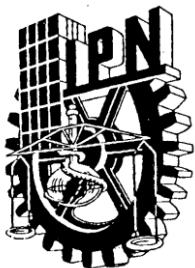
 Dr. Celerino Robles Pérez
 Nombre completo y firma

 Dr. Edgar García Sánchez
 Nombre completo y firma

 Dr. Gabino Alberto Martínez Gutiérrez
 Nombre completo y firma

 Dr. Salvador Isidro Belmonte Jimenez
 Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
 CIIDIR OAXACA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca el día 21 del mes Enero del año 2021, la que suscribe Diana Nancy Cruz Luna alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro B180470, adscrito a Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Alfonso Vásquez López y Dra. Lucía Martínez Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl in vitro, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dianita.lunacruz18@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Diana Nancy Cruz Luna

Nombre y firma

ÍNDICE

Índice de figuras.....	vii
Índice de cuadros.....	viii
Capítulo i.....	9
Resumen.....	9
Introducción	11
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
Hipótesis.....	15
Revisión de literatura.....	15
Referencias.....	35
Capítulo ii.....	46
Resumen.....	46
Introducción	47
Materiales y métodos	50
Resultados.....	64
Discusión	75
Referencias.....	79
Capítulo iii.....	85
Resumen.....	85
Introducción	86
Materiales y métodos	89
Resultados.....	102
Discusión	114
Referencias.....	118
Anexos	125

Índice de Figuras

CAPÍTULO I

Fig		Pág
1	Ambientes salinos	15
2	Clasificación de los microorganismos halófilos	18
3	Principales hábitats de las arqueas halófilas	22
4	Árbol filogenético de la vida	23
5	Microfotografía con el microscopio electrónico de barrido que muestra arqueas de forma cuadrada	25
8	Equipo de ICP-OES (Laboratorio UNSIJ Oaxaca)	33

CAPÍTULO II

Fig		Pág
1	Recolecta de sedimento sólido y salmuera en las lagunas salineras de Salina Cruz	51
2	Siembra y purificación de arqueas mediante la técnica de rayado fino sobre medio de cultivo nutritivo sólido adicionado con 25 % de NaCl	50
3	Técnica Método de Mohr	54
4	Técnica de espectroscopía de emisión por plasma	57
5	Comparación de medias (Tukey, 0.05) de la cantidad de NaCl presente en medio de cultivo nutritivo líquido	67
6	Captura de iones sodio por las cepas de arqueas halófilas a las cero y 72 h	68
7	Cinética de crecimiento de las arqueas	70
8	Árbol filogenético	73

CAPÍTULO III

Fig		Pág
1	Recolecta de sedimento sólido y salmuera en las lagunas salineras de Salina Cruz	88
2	Registro de pH, CE y temperatura de la salmuera	89
3	Técnica Método de Mohr	92
4	Técnica de espectroscopía de emisión por plasma	95
5	Comparación de medias (Tukey, 0.05) de la cantidad de NaCl presente en medio de cultivo nutritivo líquido	105
6	Captura de iones sodio por las cepas bacterias halófilas a las cero y 72 h	107
7	Cinética de crecimiento de las bacterias halófilas	109
8	Árbol filogenético	112
9	Análisis de sustitución	113

Índice de Cuadros

CAPÍTULO II

Cuadro		Pág
1	Volumen final de reacción para PCR	62
2	Condiciones de reacción para PCR	62
3	Valores de pH y temperatura de los sitios muestreados	64
4	Número de colonias de arqueas aisladas del sedimento sólido y salmuera de tres lagunas-salineras	64
5	Número de colonias de arqueas halófilas aisladas del sedimento sólido y salmuera	65
6	Cantidad de NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido inoculado con cepas de bacterias halófilas	66
7	ANOVA de la disminución de NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido.	66
8	Cantidad de NaCl (ppm) en el interior de las arqueas halófilas.	68
9	ANOVA de la captura de Na ⁺ al interior de las bacterias halófilas	69
10	ANOVA de los factores evaluados	67
11	Caracterización bioquímica de tres cepas de arqueas halófilas	71
12	CIC de las lagunas-salineras	74
	Resultados de los análisis en los suelos muestreados	75

CAPÍTULO III

Cuadro		Pág
1	Volumen final de reacción para realizar la PCR.	100
2	Condiciones de reacción para realizar la PCR	100
3	Valores de pH y temperatura de los sitios muestreados	102
4	Número de colonias de arqueas aisladas del sedimento sólido y salmuera	103
5	Colonias de arqueas halófilas agrupadas de acuerdo a sus características fenotípicas	103
6	Cantidad de NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido inoculado con cepas de arqueas halófilas	104
7	ANOVA de la disminución de NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido inoculado con cepas de arqueas halófilas	105
8	Cantidad de NaCl (ppm) al interior de las arqueas halófilas	106
9	ANOVA de la captura de Na ⁺ al interior de las arqueas halófilas a las cero y 72 h	108
10	ANOVA de los factores	109
11	Caracterización bioquímica de tres cepas de arqueas halófilas	110
12	CIC de las lagunas salineras	115
13	Resultados de los análisis en los suelos muestreados	116

CAPITULO I

Marcoteórico

RESUMEN

Las arqueas y bacterias halófilas se consideran microorganismos extremófilos debido a que habitan sitios con altas concentraciones de sal (NaCl, MgCl, KCl) que van de un 5 a 30%, estos producen diversos compuestos químicos que se han empleado con éxito en el área de médica, farmacéutica, industrial, biotecnológica, alimenticia y recientemente en el área agrícola. El objetivo del presente estudio fue caracterizar bacterias y arqueas halófilas, aisladas de la salinera de Salina del Marqués, Mpio. Salina Cruz Oaxaca, México, con capacidad para capturar NaCl en medio de cultivo líquido. Las bacterias y arqueas halófilas fueron seleccionadas de acuerdo a su efectividad para capturar NaCl mediante técnicas de espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y el método de Mohr. Se identificaron bioquímicamente y molecularmente. El análisis de las evaluaciones de las cepas bacterianas arrojó que obtuvieron mayor efectividad para capturar iones Na^+ fueron la B2 con 26398.09 ppm, seguida de B7 con 22616.95 y B9 20561.60 en medios líquidos con 20% de NaCl. En cuanto a las arqueas, se obtuvo que A2 tuvo un consumo de 20477.39 ppm, A3 con un consumo de 22775.59 ppm y A9 22035.99 ppm en medios líquidos con 25% de NaCl. Con respecto al método de Mohr las bacterias que capturaron mayor porcentaje de NaCl en el medio líquido con 20% de NaCl fueron las cepas B4 y B5 con un porcentaje 4.53%, seguidas de B9 y B10 con 4.25% de NaCl; en cuanto a las arqueas que capturaron mayor porcentaje de NaCl

en medio líquido a 25% de NaCl fueron las cepas: A1, A2 y A8 con 3.31%, seguidas de A3, A5 A6 y A7 con 2.92% de NaCl. Las bacterias fueron identificadas como *Virgibacillus salarius* y *V. marismortui*. De acuerdo al análisis filogenético las arqueas pertenecen al género *Halorubrum chaviator* y *H. distributum*. Las especies identificadas mostraron capacidad para capturar NaCl *in vitro* por lo que su uso podría tener éxito para la biorremediación de suelos salinos.

Palabras clave: Bacterias halófilas, arqueas halófilas, Método Mohr, Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP- OES), *Virgibacillus*, *Halorubrum*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias y las arqueas pertenecen a distintos dominios, las bacterias pertenecen al dominio de Bacteria y las arqueas al dominio Archaea, esta división se basó en el uso del ARNr 16s como marcador (Woese, 1977). Entre los dos grupos existen importantes diferencias morfológicas, anatómicas, bioquímicas y moleculares.

Existen bacterias y arqueas que se denominan halófilas por su capacidad para crecer y desarrollarse en ambientes (suelo y agua) con altas concentraciones de sales como cloruro de sodio, magnesio y calcio. Las bacterias halófilas fueron clasificadas por Kushner (1978) de acuerdo a su capacidad de tolerar diferentes niveles de sal, específicamente NaCl. Fueron clasificadas como: halotolerantes (<2%), moderadas (>15%) y extremas (>25%). Las arqueas se clasifican como microorganismos extremos porque pueden desarrollarse en hábitats hipersalinos (>30% de NaCl) (Messeguer, 2004).

Diversos estudios han reportado la presencia de bacterias y arqueas halófilas en ambientes salinos: en España se reportaron los géneros bacterianos *Spiribacter*, *Halomonas*, y de géneros de arqueas a: *Halobacterium* (Ventosa, 2014; Sánchez-Porro *et al.*, 2003), en EEUU se reportó el género bacteriano *Streptomyces* (Manam *et al.*, 2005), en la India reportaron a la arquea *Kokuria* (Kumar and Jadeja, 2018), en Israel a la arquea del género *Haloarcula* (Ventosa, 2019).

En México, se han realizado pocos estudios con estos microorganismos y han sido reportados de estados como Sonora, Coahuila, México y Baja California. Se han

aislado bacterias halófilas pertenecientes a los géneros de *Salinococcus*, *Halomonas*, *Nocardiopsis*, *Halococcus*, *Haloquadratum* (Coronado *et al.*, 2018, Castro-Piña *et al.*, 2011) y arqueas de los géneros *Haloarcula*, *halobacterium*, *Methanosarcina* (Rosas, 2017; Castro- Piña *et al.*, 2011, Tamez, 2009).

El género bacteriano *Virgibacillus salarius* y *V. marismortui* solo han sido reportados en la India y el mar muerto, respectivamente (Arahal *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2008). La arquea perteneciente al género *Halorubrum distributum* se reportó que fue aislada en suelos salinos del continente africano (Kamekura and Dyll-Smith, 1995), la arquea *H. chaviator* en 2009 se reportó su aislamiento en Grecia, Australia, Naxos, Baja California (Mancinelli *et al.*, 2009). Los géneros antes mencionados a excepción de *H. chaviator*, no se han reportado en México.

Actualmente se ha puesto especial atención al estudio de arqueas y bacterias halófilas dada su capacidad para producir enzimas, proteínas, biosurfactantes, pigmentos y otras moléculas con propiedades benéficas en la industria petrolera, alimenticia, médica, cosmética y últimamente agrícola (Bonfá *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2015; Leal- Ferrández, 2017; Gontia-Misrha *et al.*, 2017).

En 2006 Sánchez-Leal y Arguello- Arias reportaron a cuatro especies de bacterias halófilas débiles (*Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio alginolyticus*, *V. metschnikovii*, *Flavimonas oryzihabitans*) capaces de capturar iones sodio en medio de cultivo líquido.

La perspectiva del uso de las bacterias y arqueas halófilas en el área agrícola es prometedora y factible, así lo demuestran Arora *et al.*, (2016) en la India evaluó dos

cepas bacterianas en cultivos de maíz y trigo obteniendo como resultado la reducción de sales en el suelo y la promoción de crecimiento vegetal.

Por su parte Orhan (2016) en Brasil evaluó cepas halófilas tomando en cuenta dos variables CE y el pH como indicadores de salinidad del suelo al igual que la investigación anterior, las cepas lograron reducir la salinidad del suelo tomando los dos parámetros antes mencionados.

Kearl *et al.*, (2019) evaluó diferentes cepas halófilas inoculándolas en alfalfa sembrada en suelo salino. Con esta investigación descubrieron la capacidad del inoculo para establecerse como endófito a la par que estos microorganismos evaluados mejoran el crecimiento de la alfalfa en los suelos salinos.

En cuanto a arqueas se refiere Yadav *et al.*, (2017) mencionan que las arqueas poseen atributos como la solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, producción de ácido indol acético. Entre las arqueas que poseen varios de estas propiedades se encuentran los géneros: *Natrialba*, *Natrimena*, *Halolamina*, *Halosarcina*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, etc.

Al año siguiente Yadav y Saxena (2018) sugieren que las arqueas gracias a los diversos compuestos que producen podrían ser usados como biofertilizantes en suelos salinos como alternativa para una agricultura sustentable. Mahadevaswamy y Nagaraju (2018) comparten la misma opinión acerca de estos microorganismos halófilos y su aplicación en la agricultura para la disminución de salinidad y la promoción de crecimiento vegetal.

En el estado de Oaxaca, específicamente en la región de la Costa e Istmo de Tehuantepec, existe una superficie importante que abarca aproximadamente 115.10 hectáreas de suelo salino (Robles *et al.*, 1999). Esta zona fue detectada con problemas de salinización años atrás, debido a este problema ha perdido fertilidad; por esta razón es necesario encontrar alternativas para biorremediarlos. El empleo de bacterias y arqueas halófilas puede constituir una estrategia prometedora para recuperar la fertilidad de los suelos. En este contexto, se plantean los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar bacterias y arqueas halófilas; aisladas de las salineras de Salinas del Márquez, Salina Cruz, Oaxaca con propiedades para capturar y disminuir NaCl en medios de cultivo líquido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar, purificar y preservar colonias de bacterias y arqueas halófilas de recolectadas en las salineras de Salinas del Márquez
2. Evaluar mediante el método de Mohr la capacidad de los microorganismos para disminuir la cantidad de NaCl en dos medios de cultivo líquido inicialmente concentrados a 20% y 25% de NaCl.
3. Evaluar mediante la técnica de ICP- OES, la capacidad de los microorganismos, para disminuir la cantidad de NaCl en dos medios de cultivo líquido inicialmente concentrados a 20% y 25% de NaCl.

4. Caracterizar bioquímica y molecularmente las cepas de bacterianas y arqueas halófilas con capacidad de disminuir la concentración de NaCl en medios líquidos.

HIPÓTESIS

- En las salineras de Oaxaca se encontrarán cepas bacterianas y arqueas halófilas con capacidad para disminuir la concentración de NaCl en medio de cultivo líquido.

REVISIÓN DE LITERATURA

BACTERIAS

1. AMBIENTES SALINOS

La mayoría de ambientes salinos son desconocidos con respecto a la utilidad de los mismos. Sin embargo, pese a las condiciones poco amigables e imposibles de tolerar para muchos organismos vivos, la naturaleza ha permitido la coexistencia de grupos de microorganismos capaces de tolerar, crecer y desarrollarse bajo estas condiciones salinas y totalmente adversas para la mayoría de microorganismos existentes. A estos microorganismos se les conoce como microorganismos halófilos o comúnmente llamados también amantes de la sal (Millet, 2011).



Figura 1. Ambientes salinos (www.cyd.conacyt.gob.mx)

La vida en estos ambientes salinos es compleja debido al exceso de sales presentes, es decir, por arriba del 15% de sales, lo que da lugar a un estrés muy fuerte. Pese a estas condiciones los microorganismos han sido capaces de generar mecanismos que les permitan subsistir a estos ambientes extremos (Cadena-Rodríguez, 2014; Kushner, 1978).

Los ambientes salinos que se conocen en el mundo (por mencionar algunos) son: el mar muerto, salineras españolas (Santa Paola, Huelva, Cádiz, Mallorca), algunos Lagos de Mongolia Interior (China), zonas áridas de Irán, Lago salado Ekho (Antártida), suelos de Kuwait, Xinjiang (China), Valle de la muerte (California) Salineras Guerrero Negro (Baja California Sur) (Ramírez *et al.*, 2006; Ventosa, 2010; Taméz- Hidalgo, 2009).

2. DIVERSIDAD MICROBIANA

La mayoría de microorganismos extremos pertenecen al mundo microbiano, dada su capacidad de desenvolverse en muchas formas de vida que los demás organismos no son capaces de tolerar, tal es el caso de los microorganismos halófilos los cuales son capaces de tolerar y desarrollarse en ambientes hipersalinos (Roohi *et al.*, 2012).

El estudio de los microorganismos halófilos dio inicio hace ya cerca de un siglo y aunque actualmente se sabe de la existencia de gran variedad de microorganismos, solo se ha estudiado un pequeño porcentaje de los mismos. Estos microorganismos se encuentran en los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya. Los microorganismos halófilos se clasifican de acuerdo al porcentaje de salinidad que posee el ambiente en el que habite. Las bacterias halófilas se encuentran presentes en diversos hábitats ecológicos y ambientes marinos tales como lagos, salineras, estanques de evaporación, desiertos, etc (Meseguer, 2004; Gupta *et al.*, 2014; Ventosa *et al.*, 2015; Gontia-Mishra *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2015).

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS

Estos microorganismos pueden presentar morfologías como: cocos, bacilos y formas raras. La mayoría de ellos son aerobios estrictos y pocas especies son anaerobias, algunos otros son quimiorganotrofos utilizan la luz para obtener energía. Se desarrollan óptimamente en pH alcalinos y neutros. Algunas especies tienen bacteriorrodopsina y otras son coloreadas por los carotenoides que producen,

algunas especies pertenecen al grupo de las gram positivas y otras a las gram negativas¹.

Las bacterias halófilas poseen pared celular compuesta por peptidoglucano, con la cual soportan altas presiones, impiden la lisis celular. Algunas características las comparten con el dominio Archaea, por ejemplo: su organización celular es procariótico y ambos dominios no poseen envoltura celular. Las bacterias halófilas poseen fosfolípidos de la membrana plasmática no ramificados (Garzón-Pinto, 2017; Madigan *et al.*, 2015).

2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS HALÓFILAS

Las bacterias halófilas se caracterizan por resistir altos niveles de sal, se clasifican de acuerdo a su capacidad de tolerancia a los niveles de salinidad en los que crecen y se desarrollan de acuerdo a Kushner (1978), quien clasificó a los microorganismos desde halófilos débiles, moderados y extremos (0.2-0.5 M, 0.5-2.5 M y 2.5- %2 M de NaCl respectivamente).

¹https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=250&Itemid=276

Halófilos	Concentraciones de NaCl
Halófilos Extremos	Arriba de 20 %
Halófilos Moderados	Arriba de 10 – 20 %
Halófilos Débiles	0.5 - 10 %
Halotolerantes	Toleran la salinidad

Figura 2. Clasificación de los microorganismos halófilos en base a la realizada por Kushner (Ramírez *et al.*, 2006)

Estos microorganismos crecen óptimamente a 50°C, un pH de 7.2 y por supuesto en altos niveles de sal. Este grupo de microorganismos poseen gran potencial de aplicación por todos los compuestos que producen y por su tolerancia a diversos compuestos (Kaleem *et al.*, 2015).

2.3 MECANISMOS DE ADAPTACIÓN

Para adaptarse y sobrevivir a las condiciones salinas las bacterias halófilas han desarrollado mecanismos que les permiten mantenerse sin inconvenientes en estos ambientes. Entre estos mecanismos se encuentran dos:

- a) Salt in: Se caracteriza por acumular en el citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- , con lo que se forman moléculas de KCl, por ello, por cada tres moléculas de KCl que acumulen en el citoplasma, dos ATP se hidrolizan haciendo que esta estrategia sea más eficiente que el siguiente mecanismo. Este mecanismo permite tener ciertas modificaciones

fisiológicas necesarias para proteger las funciones metabólicas y reguladoras de los microorganismos (Gontia-Mishra *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2006).

- b) Salt out: En este mecanismo la estrategia consiste acumular compuestos orgánicos de bajo peso molecular y con ello equilibrar su potencial osmótico sin que estos interfieran con su metabolismo. A estos compuestos orgánicos de bajo peso molecular se les denomina solutos compatibles, entre ellos se encuentra el glicerol, aminoácidos, azúcares, ectoína, etc. Estos solutos pueden sintetizarse si están presentes en el medio y pueden ser absorbidos por los organismos (Gontia- Mishra *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2006).

Algunos microorganismos halófilos son capaces de producir proteínas ácidas que pueden llegar a funcionar en ambientes salinos (Yadav *et al.*, 2015).

2.4 COMPUESTOS PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS HALÓFILAS

Las bacterias halófilas son capaces de producir diversos compuestos que son aplicados a diversas áreas de investigación y económicas. Estas son capaces de producir diversos enzimas como: proteasas, lipasas, amilasas, nucleasas; así como pigmentos de diversa naturaleza. Así mismo tienen actividad antimicrobiana y biosurfactante (Ventosa *et al.*, 1998; Yadav *et al.*, 2015; Gontia-Mishra *et al.*, 2017).

Enzimas: Estas se clasifican en tres categorías de acuerdo a las actividades que realizan (Ventosa *et al.*, 1998).

- a) Enzimas intracelulares: No están expuestas a la concentración de sales del medio en el que se encuentre la bacteria, pero distinguen el ambiente

intracelular en su mayoría caracterizado por la presencia de iones y de solutos osmóticos orgánicos.

- b) Enzimas unidas a la membrana: En estas se incluyen las proteínas de transporte que interactúan con el medio interno y externo.
- c) Enzimas extracelulares: Estas están expuestas directamente a la hipersalinidad del medio.

Estas enzimas tienen diversas aplicaciones potenciales en muchas áreas como la alimentaria, industrial, entre otras. Entre ellas se mencionan a las proteasas: estos compuestos podrían tener diversas aplicaciones dada su alta estabilidad a la hipersalinidad y/o tolerancia a solventes orgánicos, las lipasas: estas son de las enzimas hidrolíticas más importantes con gran potencial para su aplicación, se han encontrado en bacterias moderadas y extremas (Yadav *et al.*, 2015).

Proteínas de estrés: Son proteínas que aceleran la división celular, se producen de acuerdo a la concentración de sales del medio de estos microorganismos, si la concentración es baja se inhibe la síntesis de proteínas y la absorción de aminoácidos en los microorganismos (Hipkiss *et al.*, 1980; Ventosa *et al.* 1998).

Pigmentos: Los microorganismos halófilos producen productos naturales como son los pigmentos, los cuales dan colores característicos en ambientes hipersalinos (rojo, naranja), los cuales son producidos por el B- caroteno, salinixantina, bacterioruberina (El-Banna Aa *et al.*, 2012; Jehlicka *et al.*, 2013).

Actividad microbiana: Se han realizado ensayos a partir de extracto crudo de proteínas de las bacterias halófilas y con ellos se demuestra su capacidad de

producir metabolitos con actividad antibacterianos y antifúngicos (Todkar *et al.*, 2012).

Biosurfactantes: Estos son compuestos biológicos de superficie activa, son anfífilos producidos en ocasiones en superficies de células de estos microorganismos o excretados extracelularmente por ellos. La amplia gama de diversidad estructural en biosurfactantes pueden ser usados en las industrias farmacéuticas, alimentarias, cosméticas y en la agricultura (Gontia-Misrha *et al.*, 2017).

2.5 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Las bacterias halófilas han tenido gran impacto dadas las diversas propiedades que poseen y los beneficios que aportan a varias áreas. Las bacterias halófilas tienen un potencial para tratar aguas residuales (Mau *et al.*, 2012); para producción de poli-B- hidroxialcanoatos (PHA), un poliéster que puede dar origen a biopolímeros como posible reemplazo de los plásticos de origen petroquímico (Guzmán *et al.*, 2017).

Así mismo tienen potencial para degradar hidrocarburos convirtiéndose en una alternativa para biorremediar sitios contaminados por los mismos (Selvarajan *et al.*, 2017), también tienen gran impacto en la aceleración de procesos de fermentación (industria biotecnológica), para la producción de enzimas hidrolíticas y usarlas como biocatalizadores (Guo- Qiang and Xiao- Ran, 2018; Ouyang *et al.*, 2018; Coronado-Corral *et al.*, 2018).

Akçay and Kaya (2019) demostraron que las bacterias halófilas son una alternativa para biorremediar ambientes marinos contaminados por compuestos halogenados

que causan toxicidad y recalcitrancia; así como para biorremediar suelos con altas concentraciones de metales pesados (Abdel-Razik *et al.*, 2020).

ARQUEAS

1. AMBIENTES SALINOS

Existen microorganismos que se les denominan extremos por su capacidad de adaptarse, crecer y desarrollarse en ambientes que pudieran no ser los más idóneos para otros organismos y microorganismos. Estos han desarrollado mecanismos específicos para sobrevivir a ambientes, tal es el caso de las arqueas, los cuales son considerados extremos y ancestros de los microorganismos que hoy día conocemos.



Figura 3. Principales hábitats de las arqueas halófilas
(dominioarchaeas.wordpress.com)

Las haloarqueas se desarrollan en ambientes con altas concentraciones de sal haciéndose de este último dependiente para su crecimiento óptimo y su estabilidad

estructural. Las arqueas se encuentran en abundancia en salinas y lagos hipersalinos (Mar Muerto, las Salinas de Santa Paola, etc). Las concentraciones en las que crecen son extremas ya que sobre pasan del 25 o 30% de NaCl (Leal-Ferrández, 2017).

2. DIVERSIDAD MICROBIANA

Los microorganismos que se encuentran dentro del grupo conocidos como halófilos, son las haloarqueas, bacterias, hongos, actinomicetos. Las haloarqueas son los microorganismos menos conocidos que habitan en el suelo y fueron clasificadas por primera vez en 1977 por Woese y Fox y se estableció su dominio en 1990.

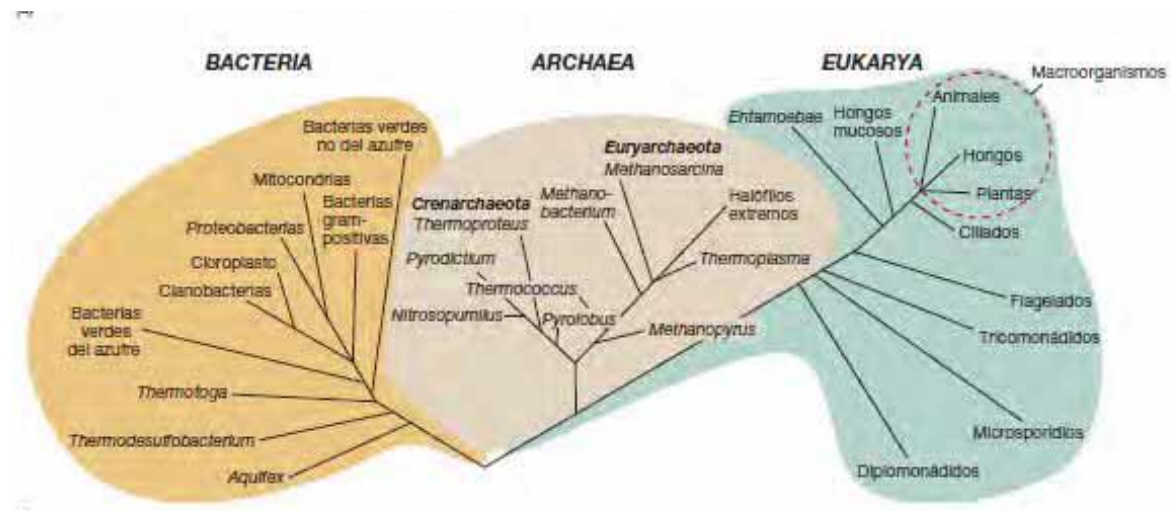


Figura 4. Árbol filogenético de la vida (Madigan *et al.*, 2015)

Las haloarqueas son capaces de tolerar no solo las altas concentraciones de sal, sino también altas temperaturas (poco más de 60°C), el contenido de oxígeno suele ser bajo por la nula solubilidad del mismo en este tipo de medios saturados, sin

embargo, son tan extremas que pueden desarrollarse sin problemas (Montalvo-Rodríguez *et al.*, 2000).

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS HALOARQUEAS

Las arqueas presentan una morfología celular similar a las bacterias, pero no en todos los casos, dado que también se han descrito morfologías totalmente diferentes a las ya conocidas, es decir, formas cuadradas planas o ameboides, las cuales son exclusivas de este dominio (Vargas y Villazante, 2014).

La pared celular de las arqueas está compuesta por una capa superficial paracristalina o también llamada capa S, la cual está formada por un entrelazamiento de proteínas y glicoproteínas, esta capa tiene contacto directo con el medio externo (Madigan *et al.*, 2015). En su pared celular de las arqueas no está presente el peptidoglucano, lo que las hace resistentes a las lisozimas y a la penicilina. Otra diferencia importante de resaltar entre este dominio y las bacterias es la presencia de lípidos de membrana con enlaces éter en vez de éster (Delgado 2015).

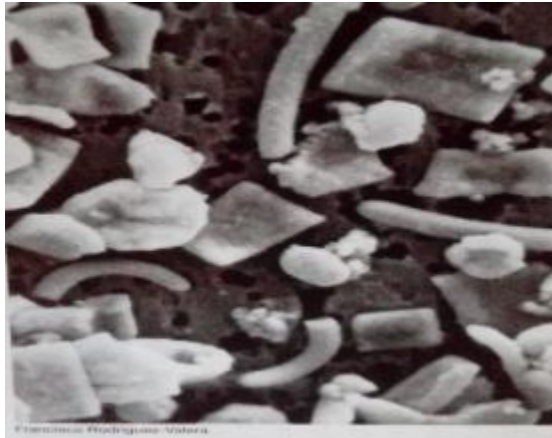


Figura 5. Microfotografía con el microscopio electrónico de barrido que muestra arqueas de forma cuadrada (dominioarchaeas.wordpress.com)

Las haloarqueas producen pigmentos rojizos llamados bacteriorruberinas, debido a los carotenoides que se encuentran en las membranas de estas especies, pero, no todas son pigmentadas, algunas otras se presentan en colonias blanquecinas (Madigan *et al.*, 2015). Estos microorganismos halófilos pertenecen al grupo gram negativos, son aerobias estrictas, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, se reproducen mediante fisión binaria. En cuanto a su ADN, posee un elevado contenido de guanina y citosina, gracias a ello las células se estabilizan aun en presencia de altas concentraciones de cationes en su citoplasma (Garzón-Pinto, 2017).

2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS ARQUEAS

Este dominio está constituido por cinco filos que poseen especies descritas de cepas aisladas. Los filos que poseen mayor número de especies son *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*, pero se han realizado investigaciones las cuales arrojan el

descubrimiento de cepas no cultivadas que presentan características diferentes a las demás (Nunoura *et al.*, 2011).

La clasificación taxonómica de las arqueas se realizó basado en características fenotípicas y con ayuda de herramientas moleculares (gen 16S y otro gen *housekeeping* como el *rpoB*) (De la Haba *et al.*, en prensa). Actualmente las arqueas se dividen en cinco filos: *Thaumarcheota*, *Nanoarcheota*, *Korarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Crenarchaeota*; dentro de estos filos se distinguen cuatro grupos: haloarqueas, arqueas hipertermófilas, acidófilas y metanógenas (Garzón-Pinto, 2017).

2.3 MECANISMOS DE ADAPTACIÓN

Las haloarqueas han desarrollado mecanismos que les permiten crecer y desarrollarse óptimamente. Oren (2008) menciona que las haloarqueas extremas y halotolerantes son capaces de usar energía para excluir iones de Na⁺ (sodio), mantener una equimolaridad osmótica con el exterior.

Una de las estrategias que usan las haloarqueas y por la mayoría de microorganismos halófilos se caracteriza por acumular en su citoplasma solutos compatibles que impiden la pérdida de agua intercelular y evitan efectos perjudiciales a las células, estos son obtenidos del ambiente externo, entre los más conocidos incluyen a la glicina, betaína, ectoína, B-aminoácidos (Oren, 2008; Leal-Fernández, 2017; Amoozegar *et al.*, 2017; Mancinelli, 2005).

La segunda estrategia de adaptación y considerada radical, destaca que iones de K⁺ (potasio) y Na⁺ son acumulados en el citoplasma en concentraciones

equivalentes al medio exterior, a la par que fungen como solutos principales (Mancinelli, 2005; Kletsin, 2007).

2.4 COMPUESTOS PRODUCIDOS POR LAS HALOARQUEAS

Las haloarqueas producen diversos compuestos como enzimas, liposomas, proteínas, entre otros.

Liposomas: Son vesículas compuestas por bicapas lipídicas intercaladas con partes acuosas, estas tienen la capacidad de captar gran variedad de compuestos. Los liposomas tienen aplicaciones biotecnológicas, poseen gran eficiencia para la encapsulación y transportación de diferentes sustancias y principios activos (Cavicchioli, 2006; Pérez, 2014).

Proteínas: Las haloarqueas producen proteínas aplicadas a diversas áreas (médica, alimenticia, bioeléctrica) debido a su capacidad, entre ellas antimicrobiana, existen estudios que corroboran su efectividad para disminuir el crecimiento de la línea celular del cáncer de colon. Algunas otras proteínas son usadas para la fermentación de alimentos, la producción de proteínas recombinantes, la construcción de celdas fotovoltaicas, elaboración de discos de almacenamiento de alta capacidad, procesos de biorremediación, etc (Botella, 2016, de la Haba *et al.*, en prensa; Reyes-Martínez y Zabaleta, 2005; Amoozegar *et al.*, 2017).

Enzimas: Las enzimas producidas por las haloarqueas son denominadas extremoenzimas, dado que pueden estar activas catalíticamente en condiciones extremas (salinidad, pH, presión) y son de gran utilidad para su aplicación en industrias (Alquéres *et al.*, 2007). Las arqueas tienen la capacidad de producir

enzimas hidrolíticas extracelulares frecuentemente son termo- y alcalitolerantes, las cuales pudieran aplicarse a diversas áreas (Enache *et al.*, 2014).

Carotenoides: De acuerdo a la presencia de oxígeno y su estructura orgánica, se dividen en dos grupos: el primero denominados carotenos, están compuestos por compuestos de carbono e hidrógeno (licopeno y B- caroteno). El segundo grupo se denomina xantofilas, se caracterizan por que es su estructura se encuentra presente el oxígeno y pueden contener grupos funcionales carbonilo, epoxi, hidroxilo, metoxi o ácido carboxílico (luteína, cantaxantina, zeaxantina, violxantina, capsorrubina y astantina). Entre sus aplicaciones se resalta su uso como colorantes y diferentes otros ingredientes en la industria alimenticia y cosmética. También tienen actividades antioxidantes que estimulan el sistema inmune, se usan como agentes antitumorales y en la prevención de enfermedades cardíacas (Hosseini and Shariati, 2009; Alvarado *et al.*, 2005; Walter and Strack, 2011; Christaki *et al.*, 2013; Waditee-Sirisattha *et al.*, 2016).

2.5 APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS

Se han reportado que las arqueas halófilas son capaces de producir biosurfactantes en condiciones hipersalinas ya que estas crecen en un medio que va por encima del 15% de NaCl, se reportaron dos cepas que pertenecen al género *Haloarcula* y al género *Halovivax*. Debido a su alta estabilidad de las emulsiones podrían usarse para la movilización de petróleo crudo, control de contaminación del mismo, biorremediación del petróleo/ arena (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009).

En 2012 (Yildiz *et al.*) caracterizaron cepas de arqueas halófilas de una mina de sal en Anatolia (Turquía) mediante un enfoque polifásico y usando el método taxonómico de análisis secuencial del 16S rRNA, se encontró que los aislados pertenecen a los géneros de *Halobacterium*, *Halo-coccus*, *Haloarculay* *Halorubrum*.

Bonfá *et al.*, (2012) reportó dos géneros: *Haloarchaegenus* y *haloferax* con capacidad de degradación de hidrocarburos aromáticos mixtos, por ello se sugiere que el uso de estos microorganismos para la biorremediación de ambientes hipersalinos contaminados es posible

En 2013 se reconoció a una haloarquea aislada de heces fecales, como un nuevo miembro del género *Haloferax*, al cual se le denominó *Haloferax massilensis sp. nov.* Siendo está considerada la primera especie de haloarquea asociada a humanos (Khelaifla and Raoult, 2016).

Se reportaron cepas que pertenecen el género *Natridema* con capacidad de producir compuestos antimicrobianos, debido a que las cepas presentan el gen de codificación de halocina C8, con ello se confirmó que la mayoría de las haloarqueas podría estar influenciada por la producción de este compuesto para competir y sobrevivir en estos ambientes salinos (Quadri *et al.*, 2016).

Wehking *et al.*, (2018) mencionan la presencia de estos microorganismos en el aire, como parte del microbioma atmosférico, se afirma que estos microorganismos podrían ser aplicados como bioaerosoles.

Por otro lado, en la Costa Peninsular de la India, se aisló una cepa de haloarquea caracterizada como *Halomona uthahensis*, esta cepa posee actividad microbiana

significativa contra *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* y *Proteus vulgaris* (Murugan *et al.*, 2018).

CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS Y HALÓFILAS PARA CAPTURAR SODIO *IN VITRO*

La capacidad de las bacterias halófilas para capturar sodio *in vitro* fue evidenciada por Sánchez- Leal y Arguello- Arías (2006), mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica, es el único estudio que se tiene como referencia para evidenciar la capacidad de las bacterias halófilas para capturar iones de sodio *in vitro*. Las cepas evaluadas fueron: *Agrobacterium tumefaciens*, *Flavimona oryzihabitans*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio metschnikovii*, estas se encuentran clasificadas como halófilas débiles. Hasta el momento no se ha registrado algún reporte que cuantifique la captura de sodio por arqueas halófilas.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO, McFARLAND

El crecimiento de los organismos se basa en técnicas de análisis microbiológicos que requieren de tiempo para revitalizar las células y realizar el recuento de las mismas a través de las unidades formadoras de colonias (UFC) en determinado tiempo, esta actividad se lleva a cabo mediante diversas técnicas, una de ellas de manera visual con la escala de McFarland (Fiallos- Núñez, 2017).

La escala de McFarland consiste en una serie de tubos que contienen una suspensión de un precipitado fino que se asemejan a las suspensiones bacterianas en opacidad. La suspensión que los tubos contienen es un precipitado de sulfato de bario que surge de mezclar cloruro de bario y ácido sulfúrico, estos compuestos se mezclan en diferentes cantidades para obtener diez estándares con diferente

turbidez, misma que se relaciona con el número de células de acuerdo a cada estándar (McFarland, 1907; Fiallos- Núñez, 2017).

Estos estándares de McFarland son usados como patrones para la preparación de suspensiones con microorganismos. La turbidez es definida como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de otro compuesto no disuelto. La turbidez puede verse afectada por las sustancias presentes en la muestra que absorban luz (INEN, 2013).

Uno de los primeros usos de esta técnica fue para el cálculo de poblaciones bacterianas al preparar vacunas, estos cálculos se basaron en el fundamento de McFarland el cual indica que en donde la turbidez aproximada de una suspensión bacteriana es equivalente a los recuentos en placa de la suspensión (Becton & Dickinson, 2015).

MÉTODO DE MOHR

1. Fundamento de la técnica

Es considerada una de las técnicas volumétricas más antiguas que involucra la titulación de cloruros y bromuros usando como indicador al cromato de potasio (Chávez, 2006). El método de Mohr se usa Para la determinación de cloruros/sal de mesa (NaCl) en disoluciones neutras y libres de fosfatos, en esta técnica el agente precipitante es AgNO_3 , por lo cual a este tipo de titulación se le conoce como método argento métrico. Con respecto al método visual del punto final, se basa en un viraje o cambio de color y la aparición o desaparición de turbidez en la solución (Pearson, 1976; Monzón, 2014).

Los métodos por titulación incluyen un grupo de métodos analíticos que se basan en determinar la cantidad de reactivo de concentración conocida que requiere para que reaccione completamente el analito en una medición de volumen (Ray, 1998; Molina y Torres, 2008)

De acuerdo a Pearson (1976) los cloruros se determinan mediante una reacción de nitrato de plata AgNO_3 o nitrato de mercurio II $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$. Para realizar el análisis de alimentos, se usa la titulación directa con AgNO_3 y el método visual del punto final (Método de Mohr).

2. Principales usos

La titulación por el método de Mohr se usa para determinar la presencia de cloruros y/o bromuros presentes en agua, alimentos y suelos (Chavéz, 2006; Morzón, 2014; Carrasquero y Castillo, 2002). También es muy común que se use para determinar el contenido de cloruros presentes en los materiales para construcción, con frecuencia lo realizan los laboratorios dedicados al estudio y control de calidad de los materiales de construcción².

ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN POR PLASMA DE ACOPLAMIENTO INDUCTIVO (ICP- OES)

1. Fundamento teórico

La técnica de espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), es una de las técnicas más usadas a nivel mundial (Jiménez *et al.*,

² <http://materconstrucc.revistas.csic.es>

2020). Mediante esta técnica es posible determinar de manera cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a nivel traza a partir de disoluciones acuosas³

La muestra debe estar en forma líquida para ser transportada por medio de una bomba peristáltica hasta un nebulizador en donde será transformada en aerosol con ayuda del gas Argón. De esta forma es conducido a la zona de ionización en donde se encuentra un plasma que llega a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K, en estas condiciones los átomos presentes en las muestras son ionizados, al hacerlo, emiten radiaciones de longitud de onda que es característica de cada elemento (Jiménez *et al.*, 2020).



Figura 6. Equipo de ICP-OES (Laboratorio UNSIJ Oaxaca)

³<https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis/espectroscopia-de-emision-por-plasma-de-acoplamiento-inductivo.html>

1. Principales usos

Esta técnica puede aplicarse en la agricultura (determinación de metales y posibles contaminantes, fertilizantes, material vegetal, alimentos), medicina (determinación de elementos tóxicos en muestras de sangre, orina, heces, leche materna, tejidos), muestras geológicas (análisis de sedimentos y rocas para determinar su procedencia) en agua (determinación de metales y contaminantes en aguas continentales, potables, vertidos, salmueras y aguas de mar) (Jiménez *et al.*, 2020)

Existen diversos reportes en las que se ha aplicado esta técnica. Bezerra *et al.*, (2006) realizó un estudio en una refinería de petróleo en la que determinó la cantidad de trazas de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni y Pb presentes en este sitio.

También se ha usado para determinar la presencia de metales pesados en la industria textil, en petróleo crudo, en geles compuestos de nanopartículas como agentes de extracción de iones de metales pesados del agua (Rezié & Steffan, 2007; Poirier *et al.*, 2016; Kazem *et al.*, 2017). Fathabad *et al.*, (2018) reportó la presencia de metales pesados en frutas procesadas los cuales fueron cuantificados mediante esta técnica.

REFERENCIAS

- Abdel-Razik, M. A., Azmy, A. F., Khairalla, A. S., and AbdelGhani, S. 2020. Metal bioremediation potential of the halophilic bacterium, *Halomonas sp.* Strain WQL9 isolated from Lake Qarun, Egypt. Egyptian Journal of Aquatic Research. 46. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.009>. pp. 19-25.
- Akcay, K., and Kaya, Y. 2019. Isolation, characterization and molecular identification of a halotolerant *Bacillus megaterium* CTBmeg1 able to grow won halogenated compounds. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 33 (1). Doi: 10.1080/13102818.2019.1631717. pp. 945- 953.

- Al- Mailen, D. M., Sorkhoh, N. A., Al- Awadhi, H., *et al.*, 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles*. 14. Doi: 10.1007/s00792-010-0312-9. pp. 321- 328.
- Alquéres SM, Almeida RV, Clementino MM, Vieira RP, Almeida WI, Cardoso AM *et al.* 2007. Exploring the biotechnological applications in the archaeal domain. *Braz J Microbiol.*38(3). pp. 398-405
- Alvarado C, Alvarez P, Jiménez L, *et al.* 2005. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 7: Doi: 10.1089/ars.2005.7.1203. pp.1203–1210.
- Amoozegar MA, Siroosi M, Atashgahi S, Smidt H, Ventosa A. 2017. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes; 163. Doi: 10.1099/mic.0.000.463. pp. 623-645.
- Arahal, D. R., Marquez, M. C., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., and Ventosa, A. 1999. *Bacillus marismortui sp.nov.*, a new moderately halophilic species from Dead Sea. *International Journal Systematic Bacteriology*. 49. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-521>. pp. 521-530.
- Arora, S., Singh, Y. P., Vanza, M., and Sahni, D. 2016. Bio-remediation of saline and sodic soils through halophilic bacteria enhance agricultural production. *Journal of Soil and Water Conservation*. 15 (4). Doi: 10.5958/2455-7145.2016.00027.8. pp. 302-305.
- Becton & Dickinson. 2005. McFarland Turbidity Standard No. 0.5
- Bezerra, M., bruns, R. E., Ferreira, S., L. 2006. Statistical design- principal component análisis optimization of a multiple response procedure using cloud point extraction and simultaneous determination of metals by ICP-OES. *Analytica Chimica Acta* 580. Doi: 10.1016/j.aca.2006.07.056. pp. 251-257.
- Bonete, J. M., bautista, V., Esclapez, J., García- Bonete, M. J., *et al.*, 2015. New uses haloarchaeal species in bioremediation processes. *Open Science.Advances in Bioremediation of water and polluted soil*. Doi: 10.5772/60667. pp. 23- 49
- Bonfá, M. C. L., Grossman, M. J., Mellado, E and Durrant, L. 2012. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. *Chemosphere*. 84. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.005. pp. 1671- 1676
- Botella HJ. 2017. Producción de halocina L8 y estudio de sus posibles aplicaciones biomédicas. Tesis para obtención de grado. Elche: Universidad Miguel Hernández.

- Cadena- Rodríguez, S. 2014. ¿Sabías que existen ambientes hipersalinos? Artículo de Divulgación en Ciencia y Mar. XX (52). pp. 49-53
- Calderón-Cid, C.R. 2015. Estudio del efecto de inoculación de bacterias en un suelo extremadamente Salino. Tesis de grado licenciatura. Universidad de San Carlos, Universidad de Catamarca, Guatemala- Argentina
- Carrasquero, A. y Castillo, P. 2002. Determinación conductimétrica de cloruros en extractos de saturación de suelos. *Agronomía Tropical*. 52(4). pp. 555-563.
- Castro-Piña. L., Flores-Gallegos, A., Rodríguez-Vidal, A., Aguilar-González, M., Aguilar-González1, C y Rodríguez-Herrera, R. 2011. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3: 33-43. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/divulgacionAQM.html>
- Cavicchioli, R. 2006. *Archaea: molecular and cellular biology*. 1ª ed. Washington, DC: ASM Press.
- Chávez, G. 2006. Revisión experimental del intervalo de pH para la determinación de cloruros por el método de Mohr. *Revista Boliviana de Química*. 23(1). pp. 26- 26.
- Christaki E, Bonos E, Giannenas I, et al. 2013 Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food Agriculture* 93: 5–11 Doi:10.1002/jsfa.5902
- Coronado- Corral, J. C., De los Santos Villalobos, S., Prado-Barragán, L. A., Buenrostro, J., Vásquez- Murrieta, M, *et al.*, 2018. Isolation of moderately halophilic bacteria in saline environments of Sonora State searching for proteolytic hydrolases. *Open Agriculture*. 3. <https://doi.org/10.1515/opag-2018-0021> pp. 207-213
- De la Haba RR, Sánchez-Porro C, Ventosa A. En prensa. Capítulo 20: Dominio Archaea. En: Martín-González A, Bejar V, Gutierrez JC, Llagostera M y Quesada E, editores. *Microbiología Esencial*. Editorial Panamericana; en prensa (pendiente publicación).
- Delgado, H. P. 2015. Lípidos: estructura a la función en un contexto biológico. En: Muñoz V, coordinadora. *Lecturas de apoyo para comprender mejor la química*. 1ª ed. México: Prensas de ciencias. p.117-127
- El-Banna AaE-R, El-Razek AM A and El- Mahdy AR. 2012. Isolation, identification and screening of carotenoid-producing strains of *Rhodotorula glutinis*. *Food Nutrition Sciences (Roma)*. 3(5). Doi: 10.4236/fns.2012.35086 627 33
- Enache, M., Neagu, S., and Cojoc, R. 2013. Halophilic microorganisms from Romanian Saline environments as a source of extracellular enzymes with

- potential in agricultural economy. Munich Personal RePEc Archive. pp. 1-6.
- Fatehabad, S. E., Shariatifar, N., Moazzen, M., Nazmara, S. *et al.* 2018. Determination of heavy metal content of processed fruit products from Tehran's market using ICP-OES: A risk assessment study. *Food and Chemical Toxicology*. 115. Doi: 10.1016/j.fct.2018.03.044. pp. 436- 446.
- Fernando- Courel, 2019. Selos salinos y sódicos. Cátedra de Edafología. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad nacional de Tucumán. pp. 1- 8.
- Fiallos- Núñez, J. E. 2017. Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el crecimiento de *Escherichia Colli*. Tesis para obtención de grado. Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos. Ambato, Ecuador. pp. 1-40.
- Garzón- Pinto, 2017. Filogenia de los seres vivos: Dominio Archaea. Revisión Bibliográfica. Facultad de farmacia. Universidad de Sevilla.
- Gontia- Mishra, I., Sapre, S., & Tieari, S. 2017. Diversity of halophilic bacteria and actinobacteria from India and their biotechnological applications. *Indian Journal of Geo Marine Science*. 46 (08). pp. 1575- 1587
- Guo- Qiang, C., and Xiao- Ran, J. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 50. Doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.016. pp. 94- 100.
- Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., and Prakash, V. 2014. Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology*. 7 (2). Doi: 10.5958/2230-732x.2014.00258.7. pp. 371- 380.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., and Casos, I. 2017. Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch. *Scientia Agropecuaria*. 8 (2). Doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.02.03. pp. 109- 118
- Hipkiss, A. P., D. W. Armstrong, and D. J. Kushner. 1980. Protein turnover in a moderately halophilic bacterium. *Can. Journal Microbiology*. 26: Doi: 10.1139/m80-030. pp.196–203
- Hosseini T. A., and Shariati M. 2009. *Dunaliella* Biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol* 107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>. pp. 14–35.
- Hua, P., Hamza- Chaffai, A., Vreeland, R. H., Isoda, H. and Naganuma, T. 2008. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65693-0>. pp. 2409. 2414.

- INEN. 2013. Calidad del agua- Determinación de turbiedad (IDT). Norma técnica Ecuatoriana.
- Jehlicka J, Edwards H G and Oren A. 2013. Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: a Raman spectroscopic study. *Spectrochim Acta. A Mol. Biomol.* Doi: 10.1016/j.ssa.2012.12081.
- Jiménez, M. A., Grijalva, A. M., y Ponce, H. X. 2020. Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP- OES). *Recimundo.* 4 (4). [http://doi.org/10.26820/recimundo/4\(4\).octubre2020.4-12](http://doi.org/10.26820/recimundo/4(4).octubre2020.4-12). pp. 5- 12.
- Kaleem, M., Azam, I., Iqbal, T. 2015. Biology and applications of halophilic bacterias and archaea: A Review. *Electronic journal of biology.* 11 (3). pp.98- 103.
- Kanekar, P.P., Kanekar, S. P., Kelkar, A. S and Dhakephalkar (2012). Halophiles- Taxonomy, diversity, physiology and applications. Chapter 1 Microbial Sciences Division, MACS-Agharkar Research Institute, G. G. Agarkar Road. Maharashtra, India. Doi: 10.1007/978-94-007-2229-3_1.
- Kazem, M., Jamshidi, S., Seidi, S. and Saleh, A, 2017. A bucky gel consisting of Fe₃O₄ nanoparticles, graphene oxide and ionic liquid as an efficient sorbent for extraction of heavy metals ions froms wáter prior to their determination by ICP-OES. *Microchim Acta* 184. Doi: 10.1007/s00604-017-2370-5. pp. 3425- 3432.
- Kearl, J., McNary, C., Scott, J., Mei, C., Aanderud, Z. T., Smith, S. T., West, J., *et al.* 2019. Salt- Tolerant halophyte rhizosphere bacteria stimulate growth of alfalfa in salty soil. *Frontiers in Microbiology.*10. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01849>. pp.1-11
- Kabbouche-Gana, S. A., Gana, L.M., Khemili, S., Fazowane-Naomi., Bouanane, N. A., Pennink and Hacene, H. 2009. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36. Doi: 10.1007/s10295-009-0545-8. pp. 727-738
- Khelaifla, S. and Raoult, D. 2016. *Haloferax massiliensis* sp. nov., the first human- associated halophilic archaea. *New Microbe and New infected.* 12. Doi: 10.1016/j.nmni.2016.05.07. pp. 96-98
- Kletsin, A. 2007. General characteristics and important model organisms. En: *Archaea, Molecular and celular biology.* Ed. Cavicchioli, R. ASM Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.1128/9781555815516.ch2>. pp. 523
- Kochba, M., Ritvo, G. and Avnimelech Y. 2004. The effect of municipal solid waste compost (msw) on the replacement of sodium in sodic soil models. *Soil Science.* 169(8). Doi: 10.1097/01.ss.0000138417.37793.7b. pp.567-572

- Kumar, R. R., and Jadeja, V. S. 2018. Characterization and partial purification of a bacterial agent from halophilic actinomycetes *Kocuria* sp. Strain rsk4. Published online Bioimpacts. 8 (4). Doi: 10.15171/bi.2018.28. pp. 253-261
- Kushner, D. J. 1978. Vida Microbiana en Ambientes Extremos. Londres: Academic Press, 317-368
- Kushner, D.J. 1985. *The halobacteriaceae. En: The bacteria*, vol. VIII. Ed. Woese, C.R. y Wolfe, R.S., Academic press, New York pp. 171-214
- Leal- Ferrández, M.F. 2017. Producción de Halocina L3 y estudio de sus posibles aplicaciones médicas. Tesis de grado licenciatura. Universitas Miguel Hernández. Alicante- España
- Madigan, M. T., Martinko J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H, Stahl, D.A. 2015. Brock: biología de los microorganismos. 14ª ed. Madrid: Pearson.
- Mahadevaswamy and yalavarthi, N. 2018. Role of halophilic microorganisms in agriculture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 7 (3). pp. 1063- 1071.
- Manam, R. R., Teysan, S, White, D. J., Nicholson, B., Grodberg, J., et al. 2005. Lajollamycin, a Nitro-tetraene Spiro- β - lactone, β - lactam Antibiotic from the Marine Actinomycete *Streptomyces nodosus*. Journal of Natural Products. 68 (2). <https://doi.org/10.1021/np049725x>. pp. 240- 243
- Mancinelli, R. L. 2005. Microbial life in Brines, evaporites and saline sediments: The search for life on Mars. In: Water on Mars and Life. Ed: Tetsuya Tokano. Advances in Astrobiology and Biogeophysics. pp.277- 297.
- Mancinelli, R. L., Ladheim, R., Sánchez- Porro, C., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., et al. 2009. Halorubrum chaoviator sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59. Doi: 10.1099/ijs.0.000463-0. pp. 1908-1913.
- Mau, S., Veá, K., y Sánchez. 2012. Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Tropical Journal of Environmental Sciences. 42 (2). <http://dx.doi.org/10.15359/rca.42-2.4>. pp. 45- 52.
- McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association XIVi. Doi: 10.1001/jama.1907.25320140022001f. pp. 1176- 1178.
- Messenger, I. 2004. Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. Ciencia e Investigación. VII (2). <https://doi.org/10.15381/ci.v7i2.3363>. pp. 13- 17

- Millet, O. 2011. Química y vida en ambientes de salinidad extrema. Investigación Química. Real Sociedad Española de Química. An. Quím. 107 (4). pp. 304-309
- Molina, W. L y Torres, K, E. 2008. Propuesta de actualización en el desarrollo didáctico del programa de análisis químico cuantitativo. Tesis para obtención de grado. Facultad de Química y Farmacia. Universidad del Salvador.
- Montalvo-Rodríguez, R., López Garriga, J., Vreeland, R.H., Oren, A., Ventosa, A., Kamekura, M. 2000. Haloterrigena thermotolerans sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology. 3. Doi: 10.1099/00207713-50-3-1065. pp.1065-1071
- Monzón, M. M. 2014. Cloruro de sodio y estandarización de sales, calidad y centrifugación. Tesis para obtención de grado. Facultad de Ingeniería de procesos. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.
- Mueller, T. G., Mijatovic, B., Sears, B. G., Pusuluri, N. and Stombaugh, T. S. 2004. Soil electrical conductivity map quality. Soil Science. 169(12). pp. 841-851.
- Murugan, S., Subha, T. and Asha K. R. T. 2018. Isolation and characterization of haloarchaeal strain from Puthalam Salt Pan located in the Southern Peninsular Coast of India. Journal of Microbial & Biochemical Technology. 10 (3). Doi: 10.4172/1948-5948.1000400. pp. 87-95
- Nethaji- Mariappan, V. E., Selvaraj, T., Vadivel, N. 2015. Soil salinity perspectives, approaches and strategies. Journal of Advanced Research in Civil and Environmental Engineering. pp. 33- 39
- Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J, Kazama H et al. 2011 Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. Nucleic Acids Res.;39(8). Doi: 10.1093/nar/gkq1228. pp. 3204-23.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Systems. 4 (2). Doi: 10.1186/1746-1448-4-2. pp. 1-13
- Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). En Brazilian journal of microbiology 47. Brasil. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.201604.001>. pp. 621–627
- Ouyang, P., Wang, H., Hajnal, I., Wu, Q., and Guo, Y. 2018. Increasing oxygen availability for improving poly (3- hydroxybutyrate) production by *Halomonas*. Metabolic Engineering. 45. Doi: 10.1016/j.ymben.2017.11.006. pp. 20- 31.

- Pearson, 1976. Técnicas de Laboratorio para el análisis de los Alimentos. pp. 238-245.
- Pecher, W. T., Maddadha, M. E., DasSarma, P., Ekulona, F., Schott, E. J., *et al.*, 2019. Effects of road salt on microbial communities: Halophiles as biomarkers of road salt pollution. PLoS ONE. 14 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221355>. pp. 1- 15
- Pérez, M. A. 2014. Microorganismos halófilos en ambientes salinos de Andalucía: Estudio taxonómico numérico y molecular. Granada: Universidad de Granada
- Poirier, L., Nelson, J., Leog, D., Berhane, L., Hajdu, P and Lopez-Linares, F. 2016. Application of ICP-MS and ICP-OES on the determination of nickel, vanadium, iron and calcium in petroleum crude oils via direct dilution. Energy&Fuels. 30. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02997>. pp. 3783- 3790.
- Quadri, I., Hassani, I. I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H and Jebbar, M. 2016. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. Microbial Research. 186-187. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.003>. pp. 119-131
- Ramírez, N., Sandoval, A. H., y Serrano, J. A. 2004. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones tecnológicas. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 24. pp. 12-23
- Ramírez, N., Serrano J. A., Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas., **37**: pp. 56-71
- Ray, U. B. 1998. Análisis cuantitativo. Editorial CECSA, México.
- Reyes-Martínez M. A., and Zavaleta A.I. 2005. Bacteriorrodopsina: una molécula peculiar. UNMSM.;8(1): pp.48-58.
- Rezié, I. and Steffani, I. 2007. ICP- OES determination of metals present in textile materials. Microchemical Journal. 85. <http://dx.doi.org/101155/2015/640271>. pp. 46- 51
- Robles P., C.; M. Bautista R. y A. Maldonado O. 1999. Distrito de riego No. 19 de Tehuantepec, Oaxaca. 1. Evaluación del ensalitramiento de los suelos. Avances en Ciencia y Tecnología. 3. pp. 50-60
- Roohi, A., Ahmed, I., Iqbal M. and Jamil, M. 2012. Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of karak, Pakistan. Pakistan Journal of Botany. **44**: pp. 365-370.
- Rosas, J. R. 2017. Identificación de bacterias halófilas tolerantes a metales pesados. Tesis para obtención de Grado de Maestro. Universidad Autónoma del Estado de México.

- Sánchez- Bernal, E., Ortega, H., Sandoval, G., Hernández., V., Estrada, C. 2012. Lavado de sales en suelos aluviales Costeros de Oaxaca, México, con aguas residuales Municipales tratadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **28**. pp. 343-360.
- Sánchez-Leal, C. L., y Arguello-Arías, H. 2006. Capacidad de bacterias halófilas para capturar Sodio *in vitro* y su posible aplicación para la biorremediación de suelos salinos-sódicos. *4 (6)*. pp. 19-32
- Sánchez- Porro, C., Martín, S., Mellado, E., and Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal Applied Microbiology*. 94. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x. pp. 295- 300.
- Selvarajan, R., Sibanda, T., Tekere, M., Nyoni, H., and Meddows- Taylor. 2017. Diversity análisis and bioresource characterization of halophilic bacteria isolated from a South Agrican Saltpan. *Molecules*. 22. Doi: 10.3390/molecules22040657. pp. 1-20
- Sharma, D. K. and Singh, A. 2017. Current Trends and emerging Challenges in Sustainable Management os Salt- Affected Soils: A Critical Appraisal. In book: *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*. S. Arora *et al.* (Eds)
- Sharma, R., Manda, R., Gupta, S., Kumar & Kumar, V. 2012. Isolation and characterization of osmotolerant bacteria from Thar Desert of Western Rajasthan (India). *Revista de Biología Tropical* 61 (4). Doi: 10.15517/rbt.v61i4.12790. pp. 1551-1562.
- Shukla, M. K., Lal, R. and Ebinger, M. 2004: Soil quality indicators for the north appalachian experimental watersheds in coshocton ohio. *Soil Science*. 169(3). Doi: 10.1097/01.ss.0000122523.03492.79. pp.195-205.
- Simon, H. M., Jahn, C., Bergerud, L. T., Sliwinski, M. K., Weimer, P. J., *et al.*, 2005. Cultivation of mesophilic soil *Crenarchaeota* in enrichment cultures from Plant Roots. *Applied and Enviromental Microbiology*. Doi: 10.1128/AEM.71.8.4751-4760.2005. pp. 4751- 4760
- Taffner, J., Bergna, A., Cernava, T., and Berg, G. 2020. Tomato-associated archaea show a cultivar-specific rhizosphere effect but an unspecific transmission by sedes. *Phytobiomas Journal*.4. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-20-0017-r>. pp. 133- 141
- Taffner, J., Erlancher, A., Bragina, A., Berg, C., Moissl- Eichinger and Berg, G. 2018. What is the role of archaea in plants? New insights from the vegetation of Alpine Bogs. *Host- Microbe Biology*. 3. Doi: 10.1128/mSphere.00122-18. pp. 1-14
- Támez, P. 2009. Diversidad filogenética de arqueas halófilas extremas cultivables de Exportadora de sal, S. A., Guerrero Negro. Tesis para

- obtener el Grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones del Noroeste, S. C. La Paz B.C.S. 1-119
- Timonen, S., & Bomberg, M. 2009. Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry Reviews*. Doi: 10.1007/s11101-009-9137-5. pp. 505-518.
- Todkar S, Todkar R, Kowale L, Karmarkar K and Kulkarni A. 2012. Isolation and Screening of Antibiotic producing Halophiles from Ratnagiri coastal area, State of Maharashtra. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2. pp. 2250- 3153.
- Vargas T. F., y Villazante L. G. 2014. Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 44. pp. 2309-2313
- Ventosa, A. 2010. Microbiología de ambientes acuáticos hipersalinos. Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla. SEM. Microbiología de las aguas. pp. 24- 26
- Ventosa, A. 2014. Por fin una autentica bacteria halófila moderada *Spiribacter salinus*. *Semaforo* .57. pp. 27- 29
- Ventosa, A., De la Haba, R., and Sánchez- Porro, C.2019. *Haloarcula*. In *Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria*. Doi: 10.1002/9781118960608.gbm00481.pub2. pp. 1-12
- Ventosa, A., De la Haba, R., Sánchez- Porro, C. and Papke, R. 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*. 25: 80 -87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002>. www.sciencedirect.com
- Ventosa, A., Joaquín, J. N., and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Rev.*, 62. Doi: 10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998. pp. 504- 544
- Waditee- Sirisattha, R., Kageyama, H., Takabe, T. 2016. Review. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology*. 2 (1). Doi: 10.3934/microbiol.2016.1.42. pp. 42-54
- Walter MH, Strack D 2011 Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Products Reports*. 28. pp. 663–692
- Wehking, J., Pickersgill, D. A., Bowers, R. M., Teschner, D. and Pöschl, U. 2018. Community composition and seasonal changes of archaea in coarse and fine air particulate matter. *Biogeosciences*. 15. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4205-2018>. pp. 4025- 4214
- Woese C., Fox G. 1977 Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74(11). Doi: 10.1073/pnas.74.11.5088. pp. 5088-5090

- Yadav, A. N., & Saxena, A. K. 2018. Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 6 (1). Doi: 10.7324/JABB.2018.60109. pp. 48- 55
- Yadav, A. N., Verma, P., Kaushik, R., Sign, H., and Saxena, A. K. 2017. Archaea Endowed with plant growth promoting attributes. *EC Microbiology*. Case Report. pp. 294- 298
- Yadav, D., Singh, A. and Mathur, N. 2015. Halophiles- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4 (12). pp. 616-629
- Yildiz, E., Ozcan, B. and Caliskan, M. 2012. Isolation, characterization and phylogenetic análisis of halophilic Archaea from a Salt Mine in Central Anatolia (Turkey). *Polish Journal of Microbiology*. 61 (2). pp. 111-117
- Zhou, J., Xia, B., Huang, H., Treves, D. S., Hauser, L. J., Mural & Tiedje, J. M. 2003. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00124-X). pp. 915- 924

CAPITULO II.

Caracterización e identificación de arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl *in vitro*.

RESUMEN

Las arqueas halófilas se clasifican como microorganismos extremos o poliextremófilos debido a que crecen y se desarrollan en ambientes salinos (> 30 % de NaCl) y en altas temperaturas (> 50 °C). Las propiedades biológicas y metabólicas de las arqueas se han utilizado con éxito en el área médica, alimenticia, petrolera y últimamente en el sector agrícola. El objetivo de esta investigación fue caracterizar e identificar arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl en medio de cultivo líquido con 25% de NaCl. Las arqueas se aislaron de sedimento sólido y salmueras recolectados de Salinas del Marqués, Oaxaca, en 2018. Se obtuvieron 10 aislados fenotípicamente diferentes. Se evaluó su capacidad para capturar iones Na⁺ y NaCl en medios de cultivo líquidos empleando las técnicas de espectroscopía de emisión óptica (ICP) y el método de Mohr, respectivamente. Las mediciones se hicieron a las 0 y 72 h por triplicado. Mediante ICP se demostró que tres cepas de arqueas lograron capturar en su interior entre 2.0 a 2.3 % de NaCl después de permanecer 72 h en el medio de cultivo líquido. Mediante el método de Mohr se demostró que tres cepas capturaron más del 3.0 % de NaCl después de permanecer 72 en el medio de cultivo líquido. Las tres cepas de arqueas que tuvieron mejor efecto en ICP se identificaron molecularmente. Las tres cepas pertenecen al grupo de las Gram negativas. Molecularmente se identificaron como *Halorubrum distributum* (dos cepas) y *H. chaviator*. Esta investigación reporta por primera vez para México a la especie de *H. distributum*. Así mismo, este trabajo

constituye el primer reporte donde se evidencia que *H.distributum* y *H. chaviator* son especies de arqueas capaces de capturar NaCl *in vitro*; estos microorganismos pueden constituir una alternativa viable para estudios futuros de desalinización de suelos agrícolas.

Palabras clave: Arqueas halófilas, *Halorubrum distributum*, *H. chaviator*, Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP- OES), Método de Mohr.

INTRODUCCIÓN

Las arqueas se consideran microorganismos extremos o poliextremófilos dado que pueden crecer y desarrollarse adecuadamente en ambientes hipersalinos (> 30 % de NaCl) con altas temperaturas (> 50 °C) y baja concentración de oxígeno (Leal-Ferrández, 2017; Madigan *et al.*, 2017; Garzón-Pinto, 2017).

La clasificación de arqueas se ha realizado principalmente mediante análisis moleculares del gen ARNr16S y otros genes *housekeeping* como el rpoB. Las arqueas se agrupan en cinco filos, dentro de los cuales se resaltan cuatro: halófilas, hipertermófilas, metanógenas y acidófilas (De la Haba *et al.*, en prensa; Garzón-Pinto, 2017).

La presente investigación se enfoca al estudio de arqueas halófilas por lo que se resaltarán la importancia de éstas. Las haloarqueas pueden presentar una morfología similar a las bacterias, aunque en ocasiones presentan formas ameboides, cuadradas o planas las cuales son exclusivas de este dominio (Vargas y Villazante, 2014). En la pared celular de las arqueas no se encuentra presente el

peptidoglucano, razón por la cual son resistentes a las lisozimas y a la penicilina (Delgado, 2015). Todas las arqueas son Gram negativos y aerobias estrictas. En cuanto a su ADN, posee un elevado contenido de guanina y citosina, gracias a ello las células se estabilizan aun en presencia de altas concentraciones de cationes en su citoplasma (Garzón-Pinto, 2017).

Diversos géneros de arqueas halófilas se han aislado de diferentes partes del mundo, por ejemplo, el género *Natronobacterium* se aisló en Kenya (Mwatha, and Grant, 1993), *Halobacterium* en Antártica (Franzmann *et al.*, 1988), *Haloarcula* en Japón (Takashina *et al.*, 1990), *Halobacterium* en el Mar Muerto (Oren, 1983) y *Halorhabdus* en EEUU (Wainø *et al.*, 2000).

El interés por estudiar las arqueas halófilas, se debe principalmente a la diversidad de compuestos que producen: enzimas, proteínas, lípidos, carotenoides, etc. (Alquéres *et al.*, 2007, 2009; Botella, 2017; Hosseini and Shariati). Estos compuestos se han empleado en diferentes áreas petrolera, médica, industrial, alimenticia y agrícola (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009; Murugan *et al.*, 2018, Bonfá *et al.*, 2012).

Se ha reportado que el género *Halobacterium* es capaz de producir proteasas para hidrolizar proteínas con potencial para el área alimenticia (Singh and Kumar-Singh, 2018). Kaur *et al.*, (2006) evaluó las estrategias de adaptación de *Halobacterium* en ambientes con altas concentraciones de metales pesados (Mn, Co, Fe, Ni, Cu y Zn) como posibles biorremediadores de ambientes con esta problemática. Por su parte Abbas *et al.*, (2013) extrajo carotenoides del género *Halobacterium halobium*

para evaluarlos y comprobar sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, inductoras de apoptosis y antiproliferativas.

Las arqueas del género *Haloferax*, *Halobacterium*, y *Halococcus* son capaces de biodegradar carburos por lo que podrían contribuir a la biorremediación de ambientes contaminados por petróleo (Al-Mailen *et al.*, 2010); son capaces de metabolizar compuestos aromáticos para su potencial uso en la biorremediación (Cuadros-Orellana *et al.*, 2006). Las arqueas podrían ser aplicadas al área biomédica por su capacidad de producir halocina L3 para inhibir el crecimiento de células cancerígenas (Leal-Ferrández, 2017).

En cuanto al área agrícola, Bonete *et al.*, (2015); Yadav *et al.*, (2017); afirman que por su capacidad de tolerar ambientes extremos las arqueas del género *Haloferax* son buenos agentes para el tratamiento de aguas residuales. Las arqueas de los géneros *Natrialba*, *Halolamina*, *Halosarcina*, *Natrinema*, *Haloarcula*, *Halostagnicola*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloterrígena*, *Natronoarchaeum*, *Halococcus* poseen potencial para la biorremediación de suelos salinizados, debido a la producción de ácidos orgánicos que consiguen solubilizar fosfatos y disminuyen el nivel de pH. Taffner *et al.*, (2018) reportaron que las arqueas halófilas tienen potencial para interactuar con plantas y aportar diferentes beneficios tales como: la promoción de crecimiento vegetal, el suministro de nutrientes, protección contra el estrés abiótico (sobre todo osmótico) e incluido el proceso de fijación de N y CO₂.

En el estado de Oaxaca, existen dos regiones con alto potencial en la producción agrícola; estas son el Istmo de Tehuantepec y la Costa. Sin embargo, debido al uso agua inadecuada para riego, extensas áreas agrícolas y de pastoreo de estas

regiones se han vuelto salino-sódicos (Robles *et al*, 1999; Sánchez- Bernal, 2012) por lo que han dejado de útiles para el área agropecuaria. En este contexto, sin duda es importante intervenir con estrategias factibles para recuperar su fertilidad.

Por otro lado, en el estado de Oaxaca existen ambientes hipersalinos, tal es el caso de las lagunas-salineras ubicadas en Salinas del Marques (95°12'33" W, 16°11', 11" N) Salina Cruz, Oaxaca., donde habitan arqueas halófilas que pueden tener propiedades biotecnológicas referidas a la disminución de sales en el sustrato que se coloquen; esta propiedad se puede aprovechar para la biorremediación de suelos salinos. Hasta el momento no se hay reportes sobre el hallazgo de arqueas halófilas en ambientes hipersalinos del estado de Oaxaca.

En México solo existe un estudio sobre arqueas halófilas; en este se reportaron los géneros de *Halogeometricum*, *Halobacterium* y *Haloarcula* aislados de la Salinera de Guerrero Negro en Baja California; sin embargo, no se estudiaron sus propiedades biotecnológicas (Támez, 2009). En el mundo no existen estudios que documenten la capacidad de las arqueas para capturar NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar e identificar arqueas halófilas para determinar su capacidad para capturar NaCl *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y colecta de muestras.

El trabajo de campo se realizó en el área salinera de la localidad de Salinas del Marqués (N 15° 53' 49", O 96° 56' 16" y 15.897 msnm) perteneciente al Municipio

de Salina Cruz, Oaxaca, México, en 2018. En este sitio se seleccionaron tres lagunas-salineras siguiendo un patrón de muestreo en triángulo, cada laguna representó un vértice y entre cada una hubo una distancia promedio de 1.0 km. Las lagunas seleccionadas fueron: El Playón (16°09'53" N 95°13'49" W, altitud 1.95 m), El Cristalino (16°10'11" N 95°13'39" W, altitud 2 m) y Las Carmelitas (16°10'04" N, 95°13'34" W, altitud 1.95 m) (Figura 1).

En cada laguna se seleccionaron cinco puntos de muestreo siguiendo un patrón en zig-zag; en cada punto primeramente se eliminó la capa superficial constituida de sal compactada de aproximadamente 5 cm de espesor; debajo de ésta se encontró un estrato de residuos sólidos (localmente denominado zapatilla) combinado con agua salina (salmuera). En cada uno de los cinco puntos se tomó una muestra de 1.0 kg de sustrato sólido y 500 ml de salmuera.

Finalmente, las cinco muestras de residuos sólidos se mezclaron perfectamente y de ahí se tomó una muestra compuesta de 1.0 kg. El mismo procedimiento se realizó para las sub-muestras de salmuera. Las muestras finales se guardaron en frascos de plástico transparente y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología del CIIDIR Unidad Oaxaca – IPN en una hielera a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). En todos los sitios muestreados se midió el pH, conductividad eléctrica y temperatura con un pH-metro Hanna, Instruments HI98130.



Figura 1 Recolecta de sedimento sólido y salmuera en tres lagunas de Salinas del Marqués, Mpio. de Salina Cruz, Oaxaca; México; 2018.

Aislamiento de arqueas halófilas

Se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Hoben y Somasegaran (1982). Se tomó 1.0 g de sedimento sólido y se colocó en 9 mL de agua destilada estéril; a partir de esta solución madre se realizaron diluciones seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} . Para el aislamiento en la salmuera se usó el mismo procedimiento (1.0 mL de salmuera en 9 mL de agua destilada estéril) de cada dilución se tomaron 100 μ l y se inoculó sobre medio de cultivo nutritivo sólido adicionado con 25% de NaCl (Leal-Ferrández, 2017) (Anexo 2). Este procedimiento se hizo por triplicado.

Todas las colonias de arqueas aisladas se cultivaron en medio de cultivo sólido concentrado a 25 % de NaCl y se incubaron a una temperatura de 42 °C durante 48 h. Las colonias que crecieron bajo estas condiciones se agruparon de acuerdo a sus características fenotípicas (diferencia en color, tamaño, forma y velocidad de crecimiento de la colonia en la placa).

La purificación de colonias seleccionadas se realizó mediante la técnica de estriado fino sobre medio de cultivo sólido con 25 % de NaCl e incubándolas a 42 ± 1 °C durante 24 h (Leal-Ferrández, 2017) (Figura 2). Las colonias resultantes se conservaron en viales con glicerol.

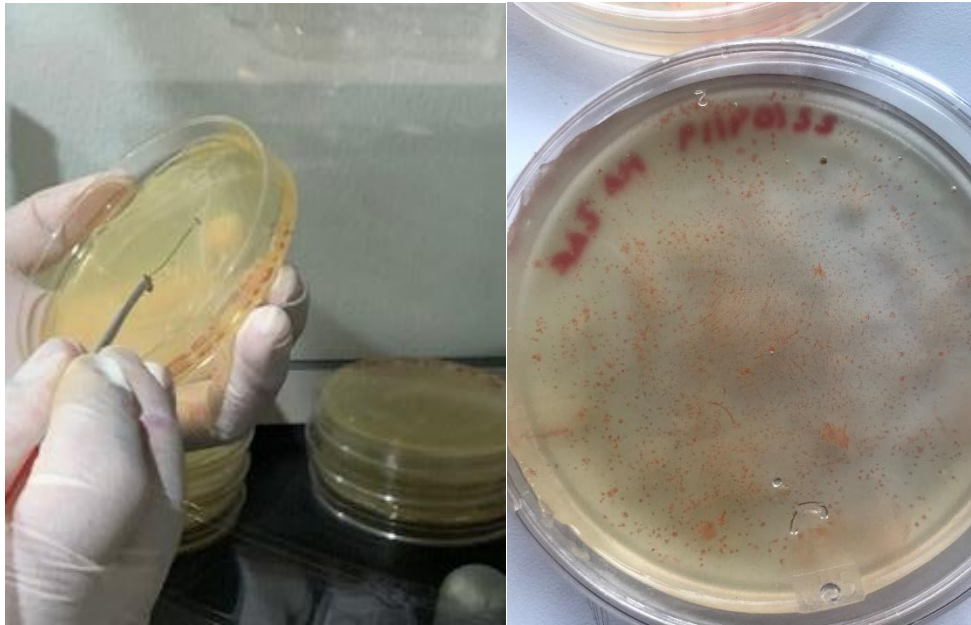


Figura 2 Siembra y purificación de arqueas mediante la técnica de rayado fino sobre medio de cultivo nutritivo sólido adicionado con 25 % de NaCl.

Evaluación de la eficiencia de las arqueas halófilas para capturar NaCl.

Bioensayos *in vitro*

Método de Mohr

Para este bioensayo se consideraron dos tratamientos para cada una de las 10 cepas de arqueas a evaluar; cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Tratamiento 1 (T1): En 10 mL de medio de cultivo nutritivo líquido concentrado a 25 % de NaCl, contenido en un tubo de ensayo 15 mL, se inocularon 300×10^6 cél/mL de una cepa

de arquea; inmediatamente después del proceso de inoculación (tiempo cero) el medio líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min en una centrifuga marca Hermle Benchmark Z-206-A. El sobrenadante se conservó y la fase solida (pellet de las arqueas) se desechó. Tratamiento 2 (T2): Se diseñó de manera similar al T1, la diferencia radicó en que las arqueas inoculadas permanecieron en el medio de cultivo líquido durante 72 h a 42 °C y oscuridad constante.

La titulación por precipitación se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Skoog *et al.*, (2014). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 5 mL del

$$\%NaCl = \left[\frac{(PM NaCl)(M AgNO^3)(mL de AgNO^3 gastados en blanco - mL de AgNO^3 gastados en muestra)}{2} \right] \times 100$$

medio de cultivo líquido centrifugado y se le agregaron 2.0 mL de cromato de potasio al 0.5 % (compuesto que actuó como indicador) (Fig. 3A) y una solución de nitrato de plata a 0.2 N que fue el agente titulante (Fig. 3B). Al mismo tiempo, una bureta de 25 mL se llenó con la solución de nitrato de plata 0.2 N, la solución se fue liberando y agregando al contenido del matraz Erlenmeyer (Fig. 3C); el proceso se detuvo una vez que se logró el vire de color de la solución a titular que pasó de amarillo (color original del medio) a rojo ladrillo (Fig. 3D). Se registró la cantidad (mL) de la solución de nitrato de plata para lograr el vire. El porcentaje de NaCl en el medio de cultivo experimental se estimó mediante la ecuación:

De donde:

PM NaCl: Peso molecular de NaCl

M AgNO³: Molaridad de la solución de nitrato de plata

El experimento descrito se realizó en el Laboratorio de Química, de la Benemérita Universidad de Puebla (BUAP).

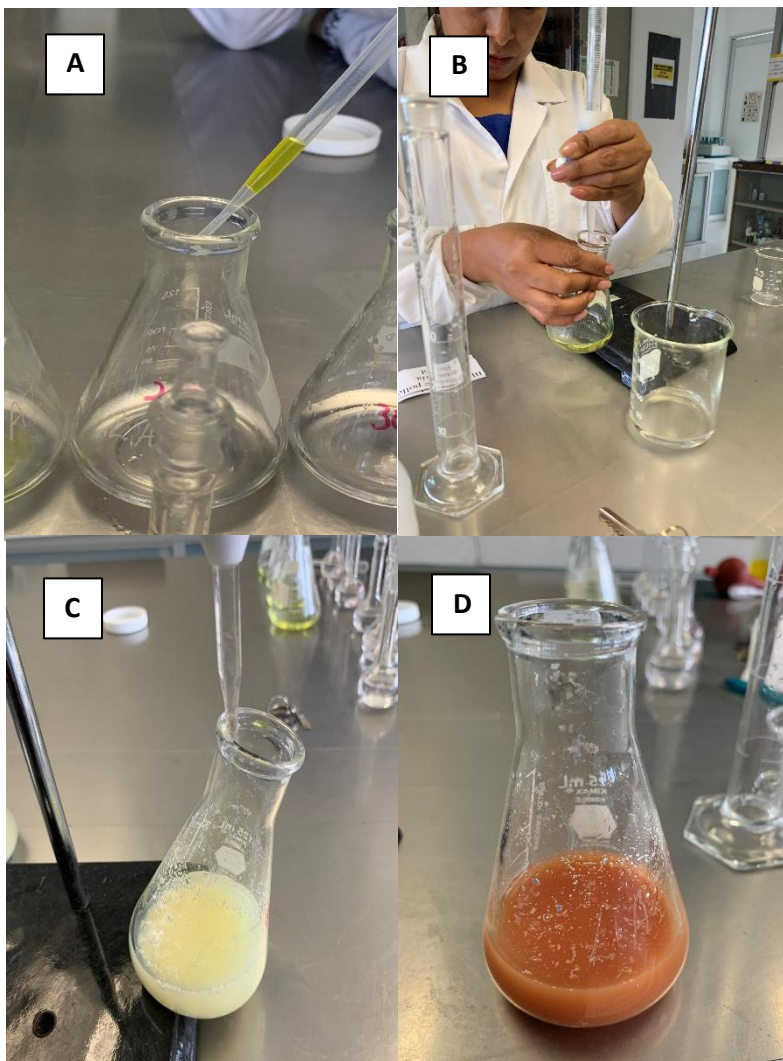


Figura 3. Técnica Método de Mohr. A) Adición de cromato de potasio a la muestra a titular. B) Agregación de la solución de nitrato de plata para la titulación de la muestra. C) Formación de flóculos conforme la adición de la solución de nitrato de plata. D) Titulación completa con el vire a rojo ladrillo

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias Tukey ($P < 0.05$) mediante un diseño completamente aleatorio. Se utilizó el paquete estadístico SAS versión 9.0.

Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

Para este bioensayo se consideraron dos tratamientos para cada cepa a evaluar, cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Tratamiento 1 (T1): En 10 mL de medio de cultivo nutritivo líquido, concentrado a 25 % de NaCl, contenido dentro de un tubo de 15 mL se inocularon 600×10^6 cél/mL de una cepa de arquea; inmediatamente después del proceso de inoculación (tiempo cero) el medio líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min en una centrifuga Hermle Benchmark Z-206-A. El sobrenadante se desechó y la fase sólida (pellet de arqueas) se conservó. Tratamiento 2 (T2): Se diseñó de manera similar al T1, la diferencia radicó en que las arqueas inoculadas permanecieron en el medio de cultivo líquido durante 72 h a 42°C y oscuridad constante. Posteriormente se estimó la cantidad de cél/mL mediante la escala de McFarland. El pellet de cada cepa se colocó en un matraz de bola y se mezcló con 4.0 mL de ácido nítrico, 4 mL de ácido sulfúrico, 1.0 mL de ácido clorhídrico y 1.0 mL de peróxido; inmediatamente después, el matraz se colocó en una parrilla de biodigestión donde estuvo durante 25 min a una temperatura de 35 °C (Figura 4A y 4B).

Posterior a este proceso, se agregaron 5 mL de agua desionizada para obtener un volumen total de 10 mL en cada tubo por cada cepa. La cuantificación de iones Na^+

presentes en la solución se realizó con el equipo ICP Perkin Elmer OPTIMA 7000 DV (Fig. 4D); mediante un capilar del equipo, se tomó una muestra de cada tubo hasta que el equipo detectó los iones y la computadora completó el registro de cada lectura, los datos registrados fueron adimensionales (Fig. 4E). El resultado de este experimento sirvió para seleccionar tres cepas que mostraron mayor eficiencia en la captura de iones Na^+ en medio de cultivo nutritivo líquido; las cepas seleccionadas se caracterizaron bioquímica y molecularmente.

Este experimento se realizó en el Laboratorio Ambiental de la Universidad de la Sierra Juárez del estado de Oaxaca (UNSIJ).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de medias Tukey ($P < 0.05$) mediante un diseño experimental factorial aleatorio, donde el factor A fue el tiempo, y el factor B las cepas. Se usó el paquete estadístico SAS versión 9.0.

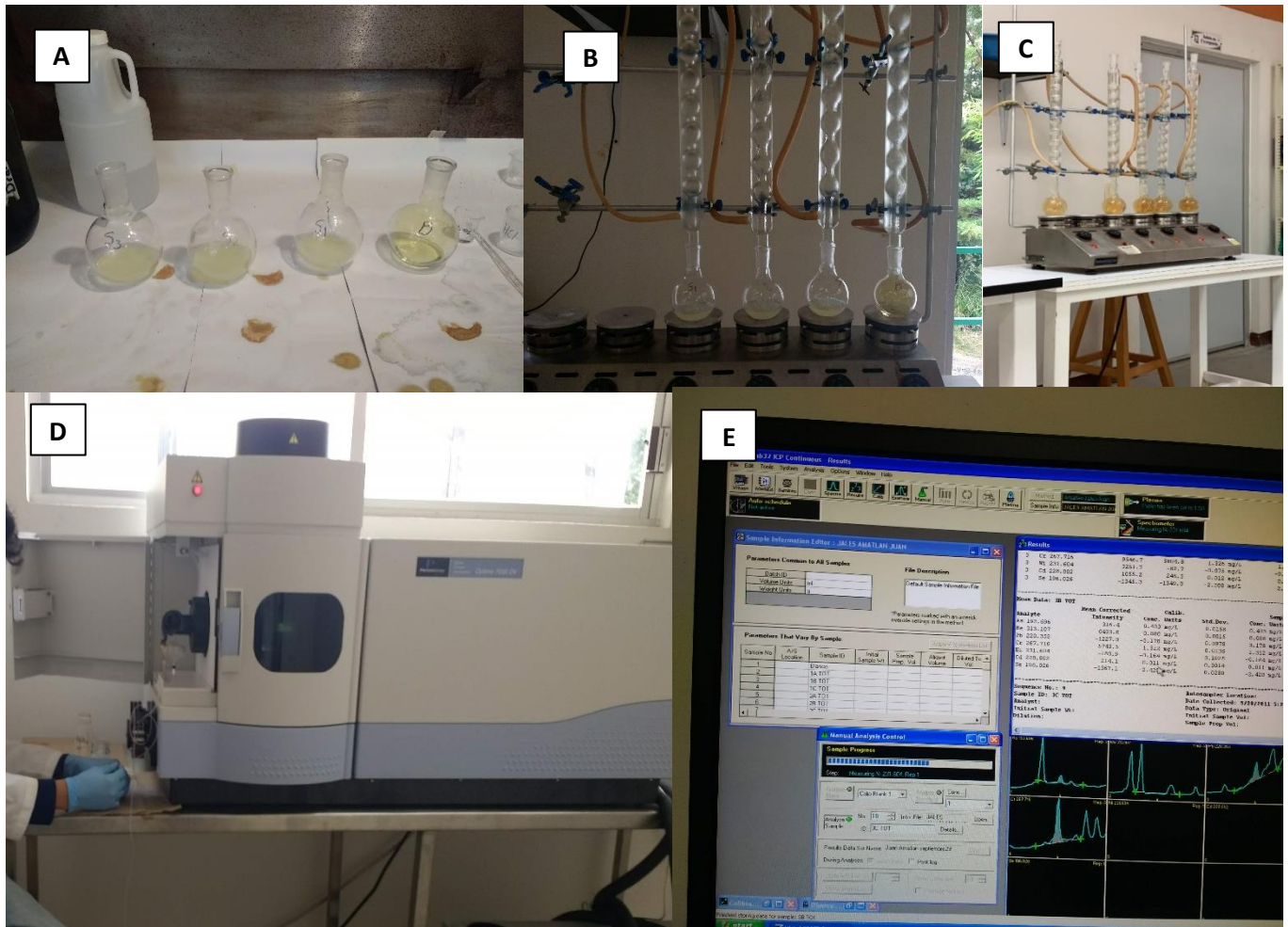


Figura 4. Técnica de espectroscopía de emisión por plasma. A) Preparación de las muestras con los ácidos y peróxido. B y C) Biodigestión de las muestras en la parrilla. D) Lectura de las muestras en el equipo de ICP. E) Captura de datos de las lecturas de iones Na^+ capturados

Caracterización de arqueas halófilas

Cinética de crecimiento

La cinética del crecimiento de arqueas se realizó mediante la técnica usada por Jurado - Gámez y Guzmán - Insuasty (2015). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 40 mL de medio de cultivo nutritivo líquido concentrado a 25 % de NaCl; este sustrato se inoculó con 150×10^6 cél/mL de una cepa de arquea; y se incubó a 42 °C durante 24 h en oscuridad constante. Posteriormente se tomaron 4.0 mL de esa solución, se pusieron en otro matraz con la misma cantidad de medio (40 mL) y se incubó en las mismas condiciones que el primero (Jurado-Gámez y Guzmán- Insuasty, 2015).

De la última solución, se tomó 1.0 mL y se colocó en una celda para espectrofotometría; la celda se introdujo en un espectrofotómetro de doble haz Zuzi modelo 4260/50, UV-Vis 190-1100 nm donde se registraron datos de absorbancia a una longitud de onda de 580 nm. Con los datos obtenidos se pudo observar el comportamiento de las arqueas halófilas en un medio salino con 25 % de NaCl y se generaron las respectivas curvas de crecimiento de cada cepa.

Caracterización bioquímica

Tinción de Gram

Sobre un portaobjetos se colocó una gota de colorante primario cristal violeta y se agregó una muestra de una cepa de una arquea. Luego se agregó una gota de lugol, se flameó con ayuda de un mechero, se agregó una gota de una mezcla de alcohol-acetona, se lavó con agua corriente y se adicionó safranina para teñir a las arqueas

que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo (López- Jácome *et al.*, 2014).

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas que se realizaron de acuerdo a Fernández- Jeri *et al.*, (2007):

- a) Prueba de fermentación: Se usó un medio de cultivo base de acuerdo a Hugh y Leifson (1953) (Anexo 3a). Dentro de tubos de ensayo se prepararon 10 mL de medio de cultivo estéril, se dejó solidificar durante 2 h y posteriormente se inoculó una muestra de una cepa de una arquea; el procedimiento se hizo por triplicado. La evidencia si hubo o no fermentación se observó con el cambio de color del medio a amarillo dando lugar a un resultado positivo; si no hubo cambio de color del medio denotó un resultado negativo.
- b) Fermentación de Carbohidratos: Se usó el medio caldo base rojo de fenol líquido (Anexo 3b), en cuanto a los carbohidratos se usaron: dextrosa, sacarosa, manitol y lactosa. Se preparó medio de cultivo líquido en tubos de 15 mL, tres repeticiones por cada carbohidrato usado, se dejó enfriar el medio durante 3 h y luego se agregó a cada tubo 150×10^6 cél/mL de cada cepa; los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C. Para su interpretación se observó si el medio cambio de color de rojo a amarillo, el cambio de color correspondió a una prueba positiva, los tubos con un color rojo rosado dieron lugar a una prueba negativa.
- c) Hidrolisis de almidón: El medio de cultivo (anexo 3c) se colocó en pico de flauta durante 2 h para dejarlo solidificar y posteriormente con ayuda de un

asa bacteriológica se procedió a barrer el cultivo de cada cepa en los tubos e incubarlo 24 h a 37°C, posterior a la incubación a cada tubo se le agregó gotas de lugol para denotar si fue positiva o negativa; si la coloración café desaparecía sobre el barrido de la cepa en el medio la prueba era positiva, pero si no desaparecía y se mantenía la prueba era negativa.

d) Agar Mc Conkey: Se preparo agar Mc Conkey comercial (anexo 3d), se dejó solidificar durante 3 h y luego las cepas fueron estriadas por triplicado. Su interpretación se basó en la coloración de las colonias, si estas aparecían incoloras la prueba se denotó negativa y si aparecen con coloración rosa la prueba se denotó positiva.

Caracterización molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados de arqueas purificados se realizó mediante la técnica de Fenol-Cloroformo (Sambrook & Russell, 2001) la cual se describe a continuación:

Las colonias de arqueas se suspendieron en 500 µl de tampón de extracción precalentado a 65 °C; al momento de la extracción se adicionó 0.2 % de B-mercaptoetanol y 50 µg de proteinasa K y se incubó a 60 °C por 30 min agitándolo ocasionalmente. Después se agregó un volumen de fenol-cloroformo-AIA (25:24:1) y se mezcló por inversión para formar una emulsión; se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C; y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente a la fase acuosa transferida se le adicionó isopropanol frío al 100 % (2/3 volúmenes),

se mezcló por inversión y se conservó a -20 °C por 2 h; después se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C, se descartó el isopropanol y el sedimento se lavó con 2 mL de tampón de lavado (dos veces) y se resuspendió. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4 °C después de cada lavado, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Luego el ADN se resuspendió en 500 µl de tampón TE.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del fragmento del gen 16s rARN se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el par de cebadores específicos para arqueas (Bahram *et al.*, 2019): SSU1ArF 5'- TCCGGTTGATCCYGCBRG -3' y 806rB 5'- GGACTACNVGGGTWTCTAAT -3'.

El amplicón generado fue de 806 pb, el volumen final de la reacción que se usó para realizar la PCR se indica en el cuadro 1; la amplificación se realizó en un termociclador marca BioRad con las condiciones indicadas en el cuadro 2 (Taméz, 2009). El marcador de peso molecular fue 1Kb+ (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA), la mezcla de reacción sin ADN fue usado como blanco. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa a 1.0 %, la electroforesis se corrió a 80 V / 400 mA durante 40 minutos (Taméz, 2009). Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciación con la empresa Macrogen (Geumcheon-gu, Seoul, Korea).

Cuadro 1. Volumen final de reacción para realizar la PCR

Compuesto	μL
Amortiguador	2.5
MgCl ₂	3.0
H ₂ O	16.4
dNTP's	0.5
Primer delantero	0.2
Primer reverso	0.2
Taq	0.2
ADN	2
Volumen final	25

Cuadro 2. Condiciones de para realizar la PCR

95°C	3 min	}	1 ciclo
95°C	40 s		30 ciclos
55°C	40 s		
72°C	2 min		
72°C	6 min		1 ciclo

Análisis de secuencias

Con los resultados de las secuencias, se procedió a comparar las mismas en el banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se analizaron mediante el programa BLAST, el cual encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas y las comparó con las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos existentes y calculó la importancia estadística para determinar el género y especie al que pertenecen los aislados de arqueas.

RESULTADOS

Parámetros químicos del sedimento sólido muestreado en las salineras

Los valores de pH, temperatura, CE y parámetros químicos del sedimento sólido recolectado en tres lagunas salineras se muestran en el cuadro 3.

Aislamiento de arqueas halófilas

De los tres sitios muestreados (lagunas- salineras) se obtuvo un total de 194 colonias, las cuales se aislaron de sedimento sólido y salmuera, en el Cuadro 4 se muestra el número de colonias aisladas por laguna y por tipo de muestra.

Primer criterio de selección de colonias de arqueas

De las 194 colonias de arqueas que se cultivaron en medio de cultivo nutritivo sólido adicionado con 25 % de NaCl sólo se desarrollaron 125 colonias. Éstas pasaron al segundo criterio de selección.

Segundo criterio de selección

Las 125 colonias de arqueas se concentraron en 5 en grupos de acuerdo a sus características fenotípicas (Cuadro 5). De cada grupo se eligieron dos cepas para los bioensayos posteriores. Las cepas se denominaron como A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 y A10.

Cuadro 3. Valores de pH, temperatura, CE y parámetros químicos del sedimento sólido recolectado en tres lagunas de Salinas del Marqués, Oaxaca.

Sitio	pH	T°	CE mmhos/cm ⁻¹ (dSm ⁻¹)	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ^{-**}	SO ₄ ²⁻ ***	K ⁺	meq/L (cmoles/L ⁻¹)		Na ⁺	RAS	PSI	Sales solubles (dSm ⁻¹)
										Ca ²⁺	Mg ²⁺				
Carmelitas	7.6	55	78	T	6.4	4982.9	0.4	970.2	109	61	962	4826	213	76	779
Cristalino	7.1	53	89	T	6.4	5536.5	0.8	667.0	203	20	1717	4270	145	68	890
Playón	7.4	56	95	T	9.1	4982.9	0.7	145.2	177	37	2136	2786	84	55	946

*** Diferencia entre suma de cationes y aniones. CE Conductividad eléctrica. T° Temperatura. T Alto contenido de carbonatos. CO₃²⁻ Carbonatos, HCO₃⁻ Bicarbonatos. Cl⁻ Cloruro. NO₃⁻ Nitratos. SO₄²⁻ Sulfatos. K⁺ potasio. Ca²⁺ Cation calcio, Na⁺ Sodio. RAS Relación de adsorción de sodio. PSI Porcentaje de sodio intercambiable.

Cuadro 4. Número de colonias de arqueas aisladas del sedimento sólido y salmuera de tres lagunas-salineras ubicadas en Salina Cruz, Oaxaca.

Sitio (laguna)	No. de colonias aisladas de sedimento	No. de colonias aisladas de salmuera
El Playón	23	24
El Cristalino	41	35
Las Carmelitas	35	36
Total	99	95
Total	194	

Cuadro 5. Colonias de arqueas halófilas agrupadas de acuerdo a sus características fenotípicas

Características de las colonias						
Grupo	Color	Tam (cm)	Forma	Elevación	Sup	Borde
1	Rojo	0.5	Irregular	Plana	Rugosa	Ondulado
2	Naranja	0.2	Circular	Plana	Lisa	Entero
3	Rojo claro	0.7	Irregular	Plana	Lisa	Ondulado
4	Naranja claro	0.55	Irregular	Plana	Rugosa	Ondulado
5	Vino	0.4	Circular	Plana	Lisa	Entero

Tam: tamaño. Sup: Textura de la superficie de la colonia

Eficiencia de las arqueas halófilas para capturar NaCl. Bioensayos *in vitro*.

Titulación por precipitación por el método de Mohr

Las cepas A1, A2 y A8 fueron las que capturaron mayor porcentaje de NaCl después de 72 h; después de ese tiempo, las cepas lograron disminuir el porcentaje de NaCl en 3.3 % con respecto a la hora cero. Las cepas A1, A2 y A8 estadísticamente fueron iguales ($p < 0.05$), pero se diferenciaron estadísticamente ($p < 0.05$) con el resto de las cepas que disminuyeron la cantidad de sal en el medio de cultivo en un intervalo de 2.5 a 2.9 % (Cuadro 6 y 7; Figura 5). La R^2 que indica el análisis denota que el modelo se ajusta en un 95%, y el valor de coeficiente de variación (9.31) indica que la dispersión de los datos es baja.

Cuadro 6. NaCl (medido en porcentaje) en medio de cultivo nutritivo líquido (inicialmente con 25 % de NaCl) inoculado con cepas de arqueas halófilas. Las estimaciones se realizaron mediante el método de Mohr a las cero y 72 h después de la inoculación.

Cepa	NaCl a las cero h (%)	NaCl a las 72 h (%)	Porcentaje reducido (%)
A1	25	21.69	3.3
A2	25	21.69	3.3
A3	25	22.08	2.9
A4	25	22.27	2.7
A5	25	22.08	2.9
A6	25	22.08	2.9
A7	25	22.08	2.9
A8	25	21.69	3.3
A9	25	22.46	2.5
A10	25	22.46	2.5

Cuadro 7. ANOVA referente a la cantidad de NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido (inicialmente con 25 % de NaCl) inoculado con cepas de arqueas halófilas.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	10	26.02984091	2.60298409	41.83	<.0001
Error	22	1.36890000	0.06222273		
Total corregido	32	27.39874091			

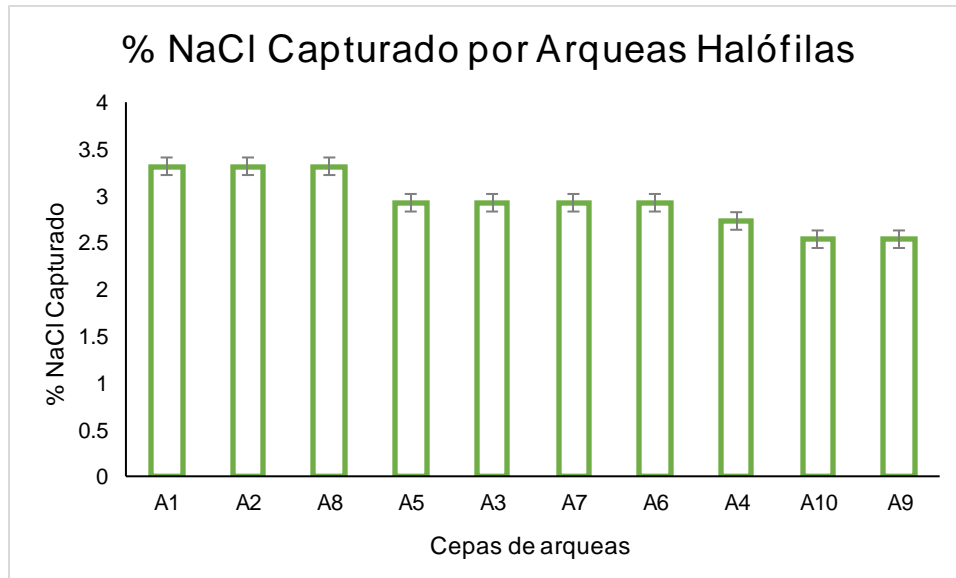


Figura 5. Comparación de medias (Tukey, 0.05) de la cantidad de NaCl presente en medio de cultivo nutritivo líquido a las 72 h después de haber sido inoculado con cepas de arqueas halófilas. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa (Tukey, 0.05).

Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

Las arqueas que mayor cantidad de iones Na^+ capturaron del medio de cultivo nutritivo líquido fueron las cepas A3 y A9 con una captura promedio de 22,776 y 22,036 ppm de Na^+ respectivamente después de 72 h. Estas cepas consiguieron disminuir mayor porcentaje de Na^+ en comparación con las demás cepas. El análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa entre las 10 cepas de arqueas ($p > 0.05$) (cuadro 8 y figura 6).

Cuadro 8. ANOVA de la captura de Na⁺ al interior de las arqueas halófilas a las cero y 72 h.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	0.11502415	0.01278046	0.79	0.6284
Error	20	0.32329917	0.01616496		
Total corregido	29	0.43832332			

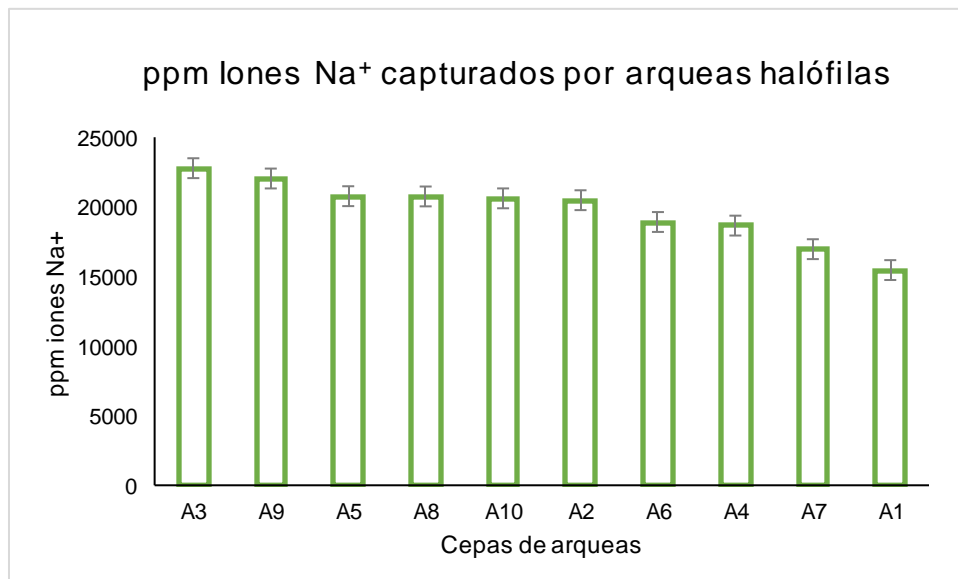


Figura 6. Comparación de medias (Tukey, 0.052) de las ppm de Na⁺ presentes en el interior de las arqueas a las 72 h después de haber sido inoculadas en medio líquido. Letras iguales sobre las barras indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (Tukey, 0.05).

Cuadro 9. Iones Na⁺ (ppm) cuantificados al interior de las arqueas halófilas. Las estimaciones se realizaron mediante la técnica de ICP-OES a las cero y 72 h después de la inoculación.

Cepa	Na ⁺ a las cero h (ppm)	Na ⁺ a las 72 h (ppm)	Na ⁺ reducido (ppm)
A1	20506.25	15457.70	-5048.5
A2	11976.79	20477.39	8500.6
A3	17750.98	22775.59	5024.6
A4	19365.66	18652.78	-712.8
A5	18342.57	20765.48	2422.9
A6	15885.77	18911.04	3025.2
A7	19020.29	16959.56	-2060.7
A8	18309.06	20746.89	2437.8
A9	16805.15	22035.99	5230.8
A10	18245.93	20611.19	2365.2

Los datos biológicos que arrojó la técnica ICP- OES (cuadro 10) se tomaron en cuenta para seleccionar las tres cepas con mayor efecto biológico para caracterizarlas bioquímica y molecularmente.

Caracterización de arqueas halófilas

Cinética de crecimiento

Cepa A2. La fase de latencia se observó durante las 2 primeras h; posteriormente inicio la fase exponencial que duró 13 h; la fase estacionaria inicio después de las 16 h (Figura 7A).

Cepa A3. Se observa que su fase exponencial inicio en la h 2, su fase estacionaria inicia 10 horas después y se mantiene casi constante su crecimiento en las siguientes horas de lectura. (Figura 7B).

Cepa A9. La fase exponencial de la cepa inicia a la hora 2, y se mantiene así durante las siguientes 14 h restantes (Figura 7C).

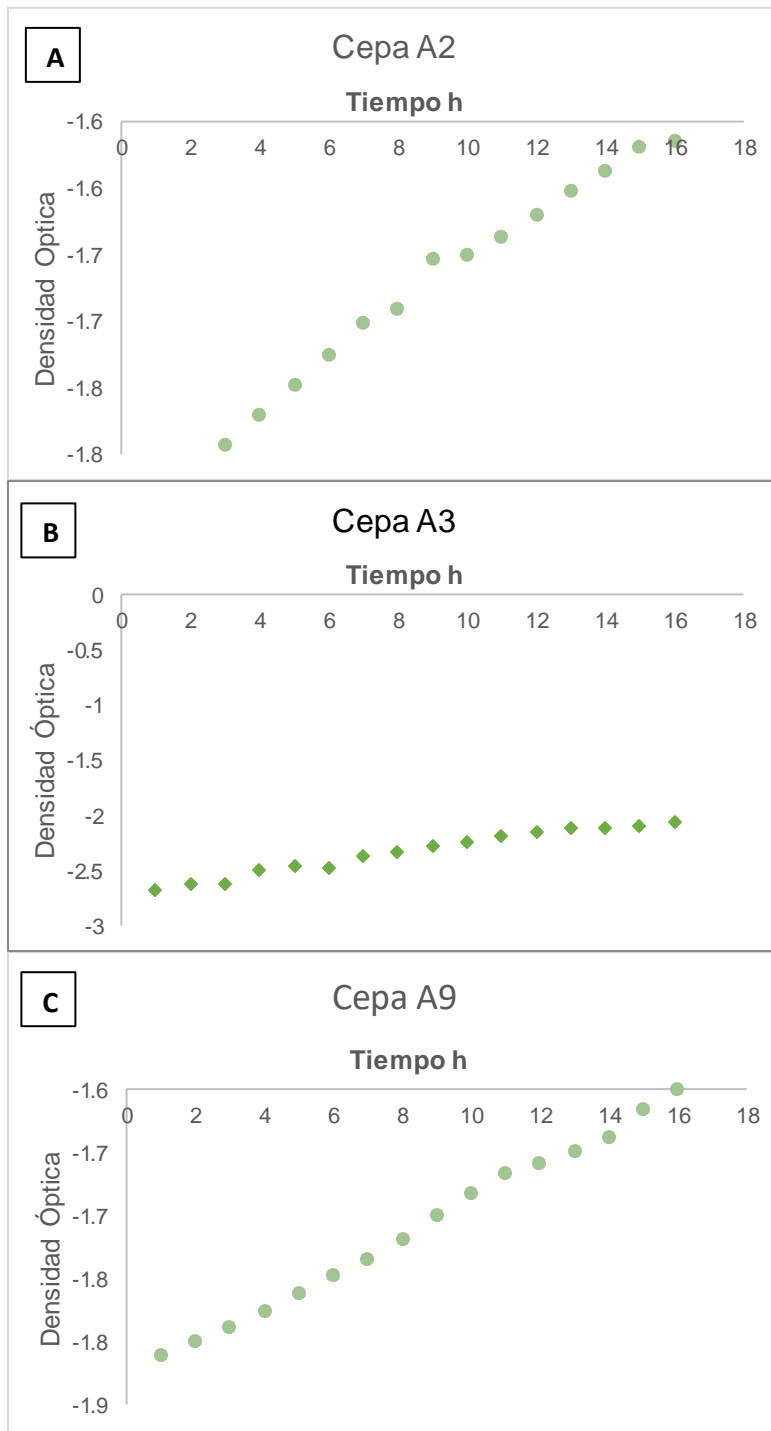


Figura 7. Cinética de crecimiento de tres cepas de arqueas halófilas.

A) Cepa A2. B) Cepa A3. C) Cepa A9

Caracterización Bioquímica

Tinción de Gram y pruebas bioquímicas

De acuerdo a la prueba de tinción de Gram las cepas A2, A3 y A9 fueron gramnegativas. Referente a las pruebas bioquímicas las cepas A2 y A9 presentan similitud en su respuesta a agar MacConkey y en la fermentación de carbohidratos, específicamente sacarosa, lactosa y manitol. La cepa A3 mostró una respuesta diferente a las otras dos cepas en las pruebas. En la prueba que coincidieron las tres cepas fue en la de óxido-fermentación ya que no presentaron crecimiento aun después de haberlas dejado incubadas por 20 días más (Cuadro 11).

Cuadro 11. Caracterización bioquímica de tres cepas de arqueas halófilas.

Pruebas bioquímicas	CEPAS		
	A2	A3	A9
Tinción de Gram	-	-	-
Reacción de la catalasa	-	-	+
Agar MacConkey	+	-	+
Hidrólisis de almidón	-	+	-
Oxidación-fermentación			
Sellados (tapa)	/	/	/
Sellados (cera)	/	/	/
Fermentación de carbohidratos			
Dextrosa	+	-	-
Sacarosa	+	-	+
Lactosa	+	-	+
Manitol	+	-	+

+ Positivo. – Negativo. / No hubo respuesta

Caracterización molecular

Las cepas A2 y A9 fueron identificadas como *Halorubrum distributum*; las secuencias analizadas tuvieron una similitud de 97.54 % con la secuencia de *H.*

distributum con número de acceso HM179196.1 (649 pb) depositada en el NCBI. La cepa A3 se identificó como a *H. chaviator*, las secuencias analizadas tuvieron una similitud de 99.86 % con la secuencia de *H. chaviator* con número de acceso MF150842.1 (694 pb) (figura 8).

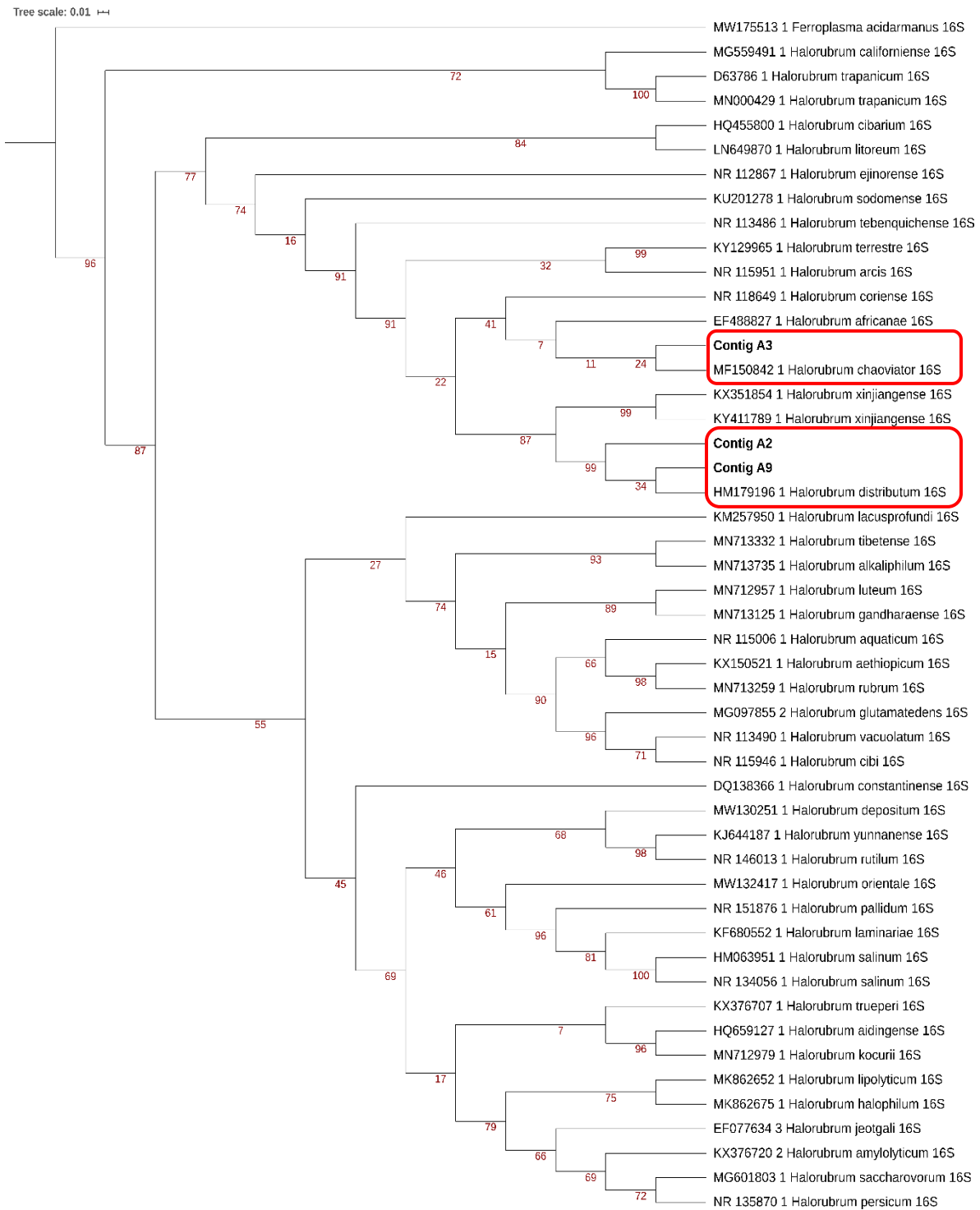


Figura 8. Árbol filogenético de consenso basado en inferencia bayesiana de *Halorubrum* con distancias genéticas. Escala= 0.01

DISCUSIÓN

De las muestras de suelo de las lagunas- salineras, en cuanto a la CIC (Capacidad de intercambio catiónico), valor que hace referencia a la capacidad de retención de nutrientes, es decir, un indicador directo de la fertilidad de suelos, se observó que las tres muestras de suelo analizadas no presentan alta CIC, lo cual indica que su capacidad de retención de nutrientes es muy baja y por tanto su nivel de fertilidad es bastante bajo (Millet, 2011). Referente al contenido total de sales presentes en las muestras de los sitios, los análisis reflejaron que todas las muestras de suelo, debido a sus valores de pH, CE, PSI pertenecen al grupo de suelos salinos-sódicos.

A partir de las muestras de las lagunas-salineras de las Salinas del Marqués, se aislaron cepas de arqueas halófilas que de acuerdo con la clasificación realizada por Kushner (1985) pertenecen al grupo de las halófilas extremas por crecer óptimamente en concentraciones >25% de NaCl.

Con respecto a la cuantificación de sodio que son capaces de reducir en el medio de cultivo líquido, Sánchez-Leal y Arguello-Arias (2006) utilizaron la técnica de espectroscopia de absorción atómica para cuantificar el sodio capturado por bacterias. Es importante destacar que este es el primer reporte sobre la capacidad de arqueas para capturar sodio y NaCl *in vitro*.

En esta investigación se usaron dos técnicas: Método de Mohr y la técnica de Espectroscopia de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP- OES). Cabe destacar que ambas técnicas realizadas no se han reportado para la cuantificación de captura NaCl y tampoco para cuantificar iones sodio en medios de cultivo líquido.

Con el método de Mohr los resultados biológicos arrojaron que las cepas A1, A2 y

A8 capturaron 3.3% de NaCl, seguidas de las cepas A3, A5, A6 y A7 con un porcentaje de captura de 2.9% de NaCl.

La técnica de Espectroscopia de emisión por plasma de acoplamiento inductivo que las cepas A3 y A9 fueron las cepas que estadísticamente capturaron mayor porcentaje de Na⁺ al interior de sus células, aunque el análisis estadístico de las cepas de arqueas mostró que no hubo diferencias en la eficiencia de captura de Na⁺ entre las cepas evaluadas, los resultados biológicos mostraron que si hubo diferencias en la captura de este elemento químico. Es importante mencionar que aun cuando se tuvieron resultados negativos, es decir, la captura de iones fue mayor a las cero horas que a las 72 horas, esto debido a que no todas las arqueas son capaces de capturar sodio, es decir, solo lo utilizan para mantener su equilibrio osmótico y sobrevivir (Oren, 1994). Con estos resultados obtenidos se podría pensar en su posible uso para biorremediar suelos salinizados. Las cepas seleccionadas para la caracterización bioquímica y moléculas se eligieron mediante la técnica de ICP- OES, dado que se consideró de las dos técnicas la más exacta, por ello las cepas seleccionadas fueron A2, A3 y A9.

Referente a las cinéticas de crecimiento, en las figuras presentadas, se puede observar que las cepas A2 y A9 presentan una cinética similar, esto por que pertenecen a la misma especie de *H. distributum* de acuerdo a la caracterización molecular, por otro lado, la cepa A3 presenta un aumento de biomasa más lento que las otras dos cepas. Taméz (2009) en su estudio de arqueas halófilas obtuvo cinéticas similares a la cepa A3, y algunas con poca estabilidad en el aumento de

biomasa con respecto al tiempo, dado que subían y bajaban las lecturas de la densidad óptica.

Con respecto a la caracterización bioquímica, la tinción de Gram corrobora que, en efecto, todas las cepas se encuentran dentro del grupo de Gram negativas (Garzón-Pinto, 2017; Leal- Ferrández, 2017). Las pruebas bioquímicas realizadas se descartaron los resultados obtenidos, debido a que, de acuerdo a investigaciones anteriores, las arqueas solo se identifican mediante el uso de marcadores moleculares, por tanto, aun cuando se hayan obtenido resultados no se podrían comparar con investigaciones o alguna base de datos establecida puesto que no existen. (Támez, 2009; Garzón- Pinto, 2017; Leal- Ferrández, 2017).

La caracterización molecular de las cepas A2, A3 y A9 se llevó a cabo usando la subunidad pequeña del gen 16S ribosomal, mediante el cual se confirmó que las cepas pertenecen al *Dominio Archaea*. Este análisis molecular mostró que las cepas pertenecen al género *Halorubrum*, este género ya ha sido reportado en México (Baja California), al igual que en suelos y lagos salinos de Rusia (Zvyagintseva & Tarasov, 1987) Australia, Naxos y Grecia (Mancinelli *et al.*, 2009); lo que lleva a pensar que las Salinas del Marqués sigue siendo un sitio con mucha diversidad que ofrecer.

En cuanto a la caracterización molecular, dicho análisis demostró que las cepas A2 y A9 pertenecen al género *Halorubrum distributum* el cual se caracteriza por ser considerada como un microorganismo extremo, en 1987 (Oren *et al.*) Zvyagintseva y Tarasov describieron un nuevo tipo de arquea halófila extrema aislada de suelo salino ruso, la cual fue considerada miembro de la familia *Halobacteriaceae* y una nueva especie *Halobacterium distributus*.

En 1995 Kamekura y Dyall-Smith determinaron las secuencias completas de genes que codifican ARNr 16S, y mediante los análisis realizados proponen dos géneros nuevos entre ellos *Halorubrobacterium distributum*. Un año más tarde Oren y Ventosa (1996) reportan que en una reunión abierta el subcomité de taxonomía de Halobacteriaceae propusieron que *Halorubrobacterium distributum* se reclasificara como *Halorubrum distributum comb. nov.* En 1997 (Oren *et al.*,) se confirmó la designación de *Halorubrum distributum*. Infante-Domínguez *et al.*, (2020) en un estudio comparativo reciente entre cuatro especies de *Halorubrum* (*distributum*, *terrestre*, *arcis* y *litoreum*) mediante un análisis filogenético las cuatro cepas pertenecientes al género *Halorubrum* demostró que pertenecen a la misma especie, por lo cual se propuso una descripción modificada de *H. distributum* incluidas las características de las otras especies

Con respecto a la cepa A3, esta pertenece al género *Halorubrum chaviator*, Tomlinson y Hochstein (1976) con su estudio muestran diversas propiedades de este microorganismo extremo, sugieren se designe como una nueva especie *Halobacterium saccharovororum*. Este género fue propuesto para acomodar las especies de *Halobacterium saccharovororum*, *sodomense*, *trapanicum* y *lacusprofundi* (McGenity y Gran, 1995). Se ha aislado de Baja California, México, Australia, Naxos y Grecia (Mancinelli *et al.*, 2009), recientemente fue asignado a la familia *Halorubraceae* la cual no hace mucho se encuentra descrita dentro de los *Haloferacales* (Dominio Archaea; Gupta *et al.*, 2016).

REFERENCIAS

- Abbes, M., Baati, H., Guerhazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., and Ammar, E. 2013. Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from Tunisia solar saltern. 13 (255). pp. 1-8.
- Al-Mailen, D. M., Sorkhoh, N. A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., and Radwan, S. S. 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles*. 14. DOI 10.1007/s00792-010-0312-9. pp. 321-328.
- Alquéres SM, Almeida RV, Clementino MM, Vieira RP, Almeida WI, Cardoso AM et al. 2007. Exploring the biotechnological applications in the archaeal domain. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(3). pp. 398-405
- Amoozegar MA, Siroosi M, Atashgahi S, Smidt H, Ventosa A. 2017 Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. 163. Doi: 10.1099/mic.0.000.463. pp. 623-645.
- Bahram M., Anslan S., Hildebrand F., Bork P., Tedersoo L. 2019. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Environ. Microbiol. Reports*. 11:487-494.
- Bonete, J. M., bautista, V., Esclapez, J., García- Bonete, M. J., et al., 2015. New uses haloarchaeal species in bioremediation processes. *Open Science.Advances in Bioremediation of water and polluted soil*. Doi: 10.5772/60667. pp. 23- 49
- Bonfá, M. C. L., Grossman, M. J., Mellado, E and Durrant, L. 2012. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarcehaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced wáter. *Chemosphere*. 84. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.005. pp. 1671- 1676.
- Botella, H. J. 2017. Producción de halocina L8 y estudio de sus posibles aplicaciones biomédicas. Elche: Universidad Miguel Hernández
- Cuadros-Orellana, S., Pohlshroder, M., and Durrant, L. R. 2006. Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 57. DOI: 10.1016/j.ibiod.2005.04.005. pp. 151-154.
- De la Haba RR, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2018. Capítulo 20: Dominio Archaea. En: Martín-González A, Bejar V, Gutierrez JC, Llagostera M y Quesada E, editores. *Microbiología Esencial*. Editorial Panamericana; en prensa (pendiente publicación).

- Delgado, H. P. 2015. Lípidos: estructura a la función en un contexto biológico. En: Muñoz V, coordinadora. Lecturas de apoyo para comprender mejor la química. 1ª ed. México: Prensas de ciencias. p.117-127
- Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., and Oren, A. 2004. Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20. DOI: 10.1007/s11274-004-4515-z. pp. 719-725.
- Fernández- Jeri, Y., Zavaleta, A. I., and Arahál, D. R. 2007. Bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha- Ayacucho. *Ciencia e investigación*. 10 (2). pp. 59-63.
- Fernández- Jeri, Y., Zavaleta, A. I., and Arahál, D. R. 2007. Bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha- Ayacucho. *Ciencia e investigación*. 10 (2). pp. 59-63.
- Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeekin, T. A., and Burton, H. R. 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. Nov., a Halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*. 11. pp. 20-17. DOI: 10.1016/s0723-2020(88)80044-4.
- Garzón- Pinto, 2017. Filogenia de los seres vivos: Dominio Archaea. Revisión Bibliográfica. Facultad de farmacia. Universidad de Sevilla
- Gupta, R. S., Naushad, S., Fabros, R., and Adeolu, M. 2016. A phylogenomic reappraisal of family- level divisions within the class halobacterium: Proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. Nov. And *Halococcaceae* fam. Nov. And the order *Haloferacales* into the families *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam. Nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 109. pp. 565- 587.
- Hoben, H. J., Somasegaran, P. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium spp.* In inoculates made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (5). pp. 1246-1247.
- Hosseini T. A., and Shariati M. 2009. *Dunaliella* Biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol* 107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>. pp. 14–35.
- Infante- Domínguez, C., De la Haba, R., Corral, P., Sánchez-Porro, C., Arahál, D and Ventosa, A. 2020. Genome-based analyses reveal a synonymy among *Halorubrum distributum* Zvyagintseva and Tarasov 1989; Oren and Ventosa 1996, *Halorubrum terrestre* Ventosa et al. 2004, *Halorubrum arcis* Xu et al. 2007 and *Halorubrum litoreum* Cui et al. 2007. Emended description of *Halorubrum distributum* Zvyagintseva and Tarasov 1989; Oren and Ventosa 1996. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70. pp. 1698-1705

- Jurado- Gámez, H. y Gúzman-Insuasty, M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Revista Médica Veterinaria Zootecnista. 62 (2). pp. 23-19.
- Kamekura, M., & Dyll-Smith, M. L. 1995. Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. The Journal of General and Applied Microbiology. 41 (4). Doi: 10.2323/jgam.41.333. pp. 333-350.
- Kaur, A., Pan, M., Meislin, M., Facciotti, M. T., El- Gewely, R and Baliga, N. S. 2006. A systems view of haloarchaeal strategies to withstand stress from transition metals. Genome Research. 16. Doi: 10.1101/gr.5189606. pp. 841- 854.
- Kebbouche-Gana, S., Gana, L.M., Khemili, S., Fazouane-Naimi., Bouanane, N. A., Pennincky and Hacene, H. 2009. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. J Ind Microbiol Biotechnol. 36. Doi: 10.1007/s10295-009-0545-8. pp. 727-738.
- Kletsin, A. 2007. General characteristics and important model organisms. En: Archaea, Molecular and cellular biology. Ed. Cavicchioli, R. ASM Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.1128/9781555815516.ch2>. pp. 523
- Kochba, M., Ritvo, G. and Avnimelech Y. 2004. The effect of municipal solid waste compost (msw) on the replacement of sodium in sodic soil models. Soil Science. 169(8). Doi: 10.1097/01.ss.0000138417.37793.7b. pp. 567-572.
- Kushner, D.J. 1985. *The halobacteriaceae*. En: *The bacteria*, vol. VIII. Ed. Woese, C.R. y Wolfe, R.S., pp. 171-214. Academic press, New York
- Leal- Ferrández, M.F. 2017. Producción de Halocina L3 y estudio de sus posibles aplicaciones médicas. Tesis de grado licenciatura. Universitas Miguel Hernández. Alicante- España
- López- Jacome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S, Cerón-González, G y Franco-Cendejas, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en discapacidad. Artículo de revisión. 3 (1). pp. 10-18.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. 2015. Brock: biología de los microorganismos. 14ª ed. Madrid: Pearson
- Mahadevaswamy and Yalavarthi, N. 2018. Role of halophilic microorganisms in agriculture. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 7 (3). pp. 1063- 1071

- Mancinelli, R. L. 2005. Microbial life in Brines, evaporites and saline sediments: The search for life on Mars. En: Water on Mars and Life. Ed: Tetsuya Tokano. *Advances in Astrobiology and Biogeophysics*. pp.277- 297
- Mancinelli, R. L., Ladheim, R., and Sánchez- Porro, C. 2009. Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., *et al.* 2009. *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000463-0>. pp. 1908-1913.
- McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*, XLIX (14). Doi: 10.1001/jama.1907.25320140022001f. pp.1176-1178
- McGenity, T. J., and Grant, W. D. 1995. Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC34041 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. Nov. *System Applied of Microbiology*. 18. pp.237-324
- Millet, O. 2011. Química y vida en ambientes de salinidad extrema. *Investigación Química*. Real Sociedad Española de Química. An. Quím. 107 (4). pp. 304-309
- Mueller, T. G., Mijatovic, B., Sears, B. G., Pusuluri, N. and Stombaugh, T. S. 2004. Soil electrical conductivity map quality. *Soil Science*. 169(12). pp. 841-851.
- Murugan, S., Subha, T. and Asha K. R. T. 2018. Isolation and characterization of haloarchaeal strain from Puthalam Salt Pan located in the Southern Peninsular Coast of India. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 10 (3). Doi: 10.4172/1948-5948.1000400. pp. 87-95
- Mwatha, W. E., and Grant, W. D. 1993. *Natronobacterium vacuolata* sp. Nov., a Haloalkaliphilic Archaeon isolated from Lake Magadi, Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43 (3). Pp. 401-404.
- Oren, A. 1983. *Halobacterium sodomense* sp. Nov., a Dead Sea Halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33 (2). pp. 381-386.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Sal. Syst.* 4 (2). pp. 1-13
- Oren, A. and Ventosa, A. 1996. A Proposal for the Transfer of *Halorubrobacterium distributum* and *Halorubrobacterium coriense* to the Genus *Halorubrum* as *Halorubrum distributum* comb. nov. and *Halorubrum*

- coriense comb. nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46 (4). pp. 1180.
- Oren, A., Kamekura, M., and Ventosa, A. 1997. Confirmation of Strain VKM B-1733 as the Type Strain of *Halorubrum distributum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47 (1). pp. 231- 232.
- Robinson, J. L., Pyzyna, B., Atrasz, R., Henderson, C., Morril, K *et al.*, 2005. Growth kinetics of extremely halophilic Archaea (Family *Halobacteriaceae*) as revealed by Arrhenius Plots. *Journal of Bacteriology*. pp. 923- 929
- Robles P., C.; M. Bautista R. y A. Maldonado O. 1999. Distrito de riego No. 19 de Tehuantepec, Oaxaca. 1. Evaluación del ensalitramiento de los suelos. *Avances en Ciencia y Tecnología*. 3. pp. 50-60
- Sambrook J., Russell D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Edit. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1:1.116-1.118.
- Sánchez- Bernal, E., Ortega, H., Sandoval, G., Hernández, V., Estrada, C. 2012. Lavado de sales en suelos aluviales Costeros de Oaxaca, México, con aguas residuales Municipales tratadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28. pp. 343-360.
- Sánchez-Leal, L. G., y Arguello-Arias, H. 2006. Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio *in vitro* y su posible aplicación en biorremediación en suelos salinos-sódicos. *Nova Publicación Científica*. 4 (6). pp. 19-32
- Shukla, M. K., Lal, R. and Ebinger, M. 2004. Soil quality indicators for the north appalachian experimental watersheds in coshocton ohio. *Soil Science*. 169(3). Doi: 10.1097/01.ss.0000122523.03492.79. pp. 195-205.
- Singh, A., and Kumar-Singh, A. 2018. Isolation and characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of western India. *3 Biotech*. 8 (45). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1072-3>. Pp. 1-15.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. 2014. *Fundamentos de Química analítica*. CENGAGE LEARNING. Novena ed. ISBN: 978-0-495-55828-6.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., and Rambaut, A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. 4 (1). Doi: 10.1093/ve/vey016. pp. 1-5.
- Taffner, J., Erlanher, A., Bragina, A., Berg, C., Moissl- Eichinger and Berg, G. 2018. What is the role of archaea in plants? New insights from the vegetation of Alpine Bogs. *Host- Microbe Biology*. 3. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00122-18>. pp. 1-14
- Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W. D., Horikoshi, K. 1990. *Haloarcula japonica* sp. Nov., a new triangular halophilic Archaeobacterium. *Systematic and Applied Microbiology*. 13. pp. 177-181.

- Taméz, P. 2009. Diversidad filogenética de arqueas halófilas extremas cultivables de Exportadora de sal, S. A., Guerrero Negro. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones del Noroeste, S. C. La Paz B.C.S. 1-119
- Tomlinson, G. A. and L. I. Hochstein. 1976. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiology*. 22 (4). pp.
- Vargas T. F., y Villazante L. G. 2014. Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 44. pp. 2309-2313
- Vora, J. U., Jain, N. K., and Modi, H. A. 2014. Extraction, Characterization and Application studies of red pigment of halophile *Serratia marcescens* KH1R KM035849 isolated from Kharaghoda soil. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. India. 2: 160-168. ISSN: 2320 – 7051
- Wainø, M., Tindall, B. J., and Ingvorsen, K. 2000. *Halorhabdus utahensis* gen nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50. pp. 183-190.
- Yadav, A. N., Verma, P., Kaushik, R., Sigh, H., and Saxena, A. K. 2017. Arcahea Endowed with plant growth promoting attributes. *EC Microbiology*. Case Report. pp. 294- 298
- Zvyagintseva, I. S & Tarasov A, L. 1987. Extreme halophilic bacteria from saline soils. *Mikrobiologiya* 56. pp. 839-844. (In Russian).

CAPITULO III.

Caracterización e identificación de bacterias halófilas con capacidad para capturar NaCl *in vitro*

RESUMEN

Entre las propiedades de las bacterias halófilas se encuentra la capacidad para reducir la cantidad de sales presentes en su hábitat; esta propiedad se puede aprovechar para biorremediar suelos agrícolas salinos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar e identificar bacterias halófilas para determinar su capacidad para capturar NaCl *in vitro*. En la localidad de Salinas del Marques, Oaxaca en 2019, se recolectaron muestras de sedimento sólido y salmuera. Las bacterias se aislaron en medios de cultivo nutritivos a una concentración del 20% de NaCl; se incubaron a 35°C durante 6 días, en oscuridad constante. Se seleccionaron 10 cepas que fueron evaluadas mediante espectroscopia de emisión óptica y el método de Mohr en medios de cultivo líquidos con 20% de NaCl de concentración inicial, en ambas técnicas se evaluaron a las cero y 72 h. Las cepas bacterianas que tuvieron mayor efecto en la captura de iones sodio al interior de sus células fueron: la bacteria B2 con 2639.09 ppm, B7 con 22616.95 ppm y B9 con 20.561.60 ppm. Las cepas que tuvieron mayor efecto para capturar NaCl del medio de cultivo líquido fueron: la bacteria B4 con un porcentaje de 4.53%, seguida de la cepa B5 con el mismo porcentaje y la cepa B6 con 4.27%. Las tres cepas que tuvieron mayor efecto en la técnica de espectroscopía de emisión óptica se analizaron molecularmente mediante el gen 16S, los resultados de estos análisis mostraron que las cepas pertenecen al mismo género, pero diferente especie. La cepa B2 y B9 pertenecen a la especie de *Virgibacillus marismortui* y la cepa B7 pertenece a la especie *V. salarius*. Las especies encontradas no han sido reportadas en México.

Palabras clave: Bacterias halófilas, *V. marismortui*, *V. salarius*, espectroscopía de emisión óptica, método de Mohr.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias halófilas son microorganismos que habitan y se desarrollan en ambientes con altas concentraciones de sales (NaCl, KCl, MgCl, MgSO₄) y temperaturas que oscilan entre los -5°C a 35°C (Ali *et al.*, 2016). En 1987, Doon J. Kushner a quien se considera padre de la clasificación de microorganismos halófilos, los clasificó de acuerdo al nivel de tolerancia al NaCl y las categorizó como: halotolerantes (1-5% NaCl), moderados (6-15% NaCl) y extremos (15- 30% NaCl) (Yadav *et al.*, 2015).

El dominio Bacteria está actualmente subdividido en 28 filos que agrupa bacterias halófilas moderadas y extremas (De la Haba *et al.*, 2011) aisladas de lagos y suelos salados. Por citar algunos estudios; en Holanda se reportó a *Halomona elongata* (Vreeland *et al.*, 1980), en Nauru, *Bacillus halophilus* (Onishi *et al.*, 1983); en España se reportaron géneros pertenecientes a: *Halomonas*, *Salibacillus*, *Chromohalobacter*, *Bacillus*, *Marinococcus* y *Salinivibrio*. (Sanchez-Porro *et al.*, 2003); en Irán se reportaron géneros como *Virgibacillus*, *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, *Bacillu*, *Oceanobacillus*, *Halobacillus*, *Thalasobacillus*, *Gracilibacillus*, *Piscibacillus* y *Salinococcus* (Rohban *et al*, 2009).

En México se han aislado bacterias halófilas del género *Bacillus* en Sonora (Coronado *et al*, 2018), los géneros *Salinicoccus*, *Halomonas* y *Nocardiopsis* en el Edo. De México (Rosas-Ramírez, 2017) y el género *Halomona* en Coahuila (Castro-Piña *et al*, 2011).

Diversos estudios destacan la importancia de las bacterias halófilas. Estos microorganismos producen gran diversidad de enzimas, proteínas, biosurfactantes,

pigmentos, solutos, etc., que tienen aplicación práctica en el área: farmacéutica, cosmética, petrolera, alimenticia y agrícola (Yadav *et al.*, 2015; Gontia- Misrha *et al.*, 2017; Yadav, 2018; Ramírez *et al.*, 2006).

En el área petrolera se han usado para acelerar y aumentar la eficiencia de bioprocesos permitiendo un ahorro de energía y agua (Chen and Jiang, 2018); en la industria biotecnológica las bacterias halófilas se usan para acelerar procesos de fermentación (Outyang *et al.*, 2018) y para el tratamiento de aguas residuales (Mau *et al.*, 2011). Se ha comprobado la capacidad de algunas cepas halófilas (*Kokuria sp*, *Kurthia sp* y *Halococcus sp*) para producir biosurfactantes (Sarafin *et al.*, 2014). Por otro lado, Selvarajan *et al.*, (2017) afirman que las bacterias halófilas tienen potencial para degradar hidrocarburos y su capacidad para producir poli-B-hidroxialcanoatos (PHA) lo que podría convertirse en un reemplazo de los plásticos de origen petroquímico (Guzmán *et al.*, 2017).

En cuanto al área agrícola, Orhan (2016), Kearl *et al.*, (2019) y Rodríguez *et al.*, (2019) afirman que las bacterias halófilas de las especies de *Z. halotolerans*, *S. succinus*, *B. gibsonii*, *O. oncorhynchi*, *Thalossobacillus sp*, *Halomonas sp* y *Bacillus sp*, *Salinivibrio sp*, *Pseudomonas halófila*, *Marinococcus sp* y *Salinococcus sp* tienen propiedades que podrían contribuir a reducir la concentración de sal del suelo en presencia de 1% de NaCl (Kearl *et al.*, 2019) y 200mM de NaCl (Orhan, 2016) así como una reducción de la CE del suelo del 5.2 dS/m a valores menores a >0.1 dS/m (Rodríguez *et al.*, 2019), por tanto, proponen que podrían ser usadas para recuperar suelos salinizados ya que también promueven el crecimiento vegetal.

En el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, existen dos regiones con alto potencial en la producción agrícola, una de ellas es el Istmo de Tehuantepec y la otra la Costa. Sin embargo, debido al uso de agua inadecuada para riego, extensas áreas de estas regiones se han vuelto salino-sódicas (Robles *et al*, 1999; Sánchez- Bernal, 2012).

En este contexto, sin duda es importante intervenir con estrategias factibles para recuperar su fertilidad. Por otro lado, en Oaxaca existen ambientes hipersalinos, tal es el caso de las lagunas-salineras ubicadas en Salinas del Marques (95°12'33" W, 16°11', 11" N) Salina Cruz, Oaxaca., donde habitan bacterias halófilas que pueden tener propiedades biotecnológicas referidas a la disminución de sales en el sustrato que se coloquen; esta propiedad se puede aprovechar para la biorremediación de suelos salinos. Hasta el momento no se hay reportes sobre el hallazgo de bacterias halófilas en ambientes hipersalinos del estado de Oaxaca.

La mayoría de estudios realizados en México se han enfocado al aislamiento y caracterización de bacterias encontradas en ambientes salinos (Castro-Piña *et al.*, 2011; Delgado-García *et al.*, 2013; González- Hernández y Peña, 2002), otros más están enfocados a los compuestos que producen y a las posibles áreas de aplicación (Coronado *et al.*, 2018, Rosas, 2017).

Sánchez y Arguello (2006) realizaron un estudio en el que evaluaron la capacidad de las bacterias para capturar sodio *in vitro* mediante la técnica de absorción atómica. Hasta el momento no hay reportes sobre el uso de las técnicas propuestas en la presente investigación. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar e identificar bacterias halófilas para determinar su capacidad para capturar NaCl *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y recolección de muestras.

El trabajo de campo se realizó en el área salinera de la localidad de Salinas del Marqués (N 15° 53' 49", O 96° 56' 16" y altitud 15 msnm) perteneciente al Municipio de Salina Cruz, Oaxaca, México, en 2018. En este sitio se seleccionaron tres lagunas-salineras siguiendo un patrón de muestreo en triángulo, cada laguna representó un vértice y entre cada una hubo una distancia promedio de 1.0 km. Las lagunas seleccionadas fueron: El Playón (16°09'53" N 95°13'49" W, altitud 1.95 m), El Cristalino (16°10'11" N 95°13'39" W, altitud 2 m) y Las Carmelitas (16°10'04" N, 95°13'34" W, altitud 1.95 m) (Figura 1).



Figura 1 Recolección de sedimento sólido y salmuera en las lagunas salineras de Salina Cruz, Oaxaca; 2018.

Al interior de cada laguna se seleccionaron cinco puntos de sub- muestreo siguiendo un patrón en W. En cada punto se eliminó una capa superficial de aproximadamente 5 cm de espesor, constituida de sal compactada; debajo de ésta se encontró un

estrato de residuos sólidos (localmente denominado zapatilla) combinado con agua salina (salmuera). En cada uno de los cinco puntos se tomó una muestra de 1.0 kg de sustrato sólido y 500 ml de agua salina.

Finalmente, las cinco muestras de residuos sólidos se mezclaron perfectamente y de ahí se tomó una muestra compuesta de 1.0 kg. El mismo procedimiento se realizó para las muestras de agua salina. Las muestras finales se guardaron en frascos de plástico transparente y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología del CIIDIR Unidad Oaxaca – IPN en una hielera a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$).

En todos los sitios muestreados se midió el pH, conductividad eléctrica y temperatura con un pH-metro Hanna, Instruments HI98130 (Figura 2).



Figura 2 Registro de pH, CE y temperatura de la salmuera en los puntos de muestreo en las lagunas salineras

Aislamiento de bacterias halófilas

Se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Hoben y Somasegaran (1982); para lo cual se tomó 1.0 g de sedimento sólido y se colocó en 9 mL de agua

destilada estéril; a partir de esta solución madre se realizaron diluciones seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} . Para el aislamiento en la salmuera se usó el mismo procedimiento (1.0 mL de salmuera en 9 mL de agua destilada estéril) de cada dilución se tomaron 100 μ l y se inoculó sobre medio de cultivo nutritivo sólido adicionado con 20% de NaCl (Meyer) (Castro-Piña *et al*, 2011) (Anexo 1). Este procedimiento se hizo por triplicado.

Del universo de colonias bacterianas que se desarrollaron sobre el medio de cultivo se aislaron aquellas que se diferenciaron fenotípicamente (diferencia en color, tamaño, forma y velocidad de crecimiento de la colonia), estas se sometieron a una segunda selección que consistió en cultivarlas en medio de cultivo sólido concentrado al 20% de NaCl; se conservaron solo aquellas que crecieron y se desarrollaron en este sustrato.

La purificación de colonias seleccionadas se realizó mediante la técnica de estriado fino sobre medio de cultivo sólido con 20% de NaCl e incubándolas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h (Castro-Piña *et al.*, 2011). Las colonias resultantes se conservaron en viales con glicerol.

Evaluación de la eficiencia de las bacterias halófilas para capturar NaCl. Bioensayos *in vitro*.

Titulación por precipitación por el método de Mohr

Para este bioensayo se consideraron dos tratamientos para cada una de las 10 cepas bacterianas a evaluar; cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Tratamiento 1 (T1): En 10 mL de medio de cultivo nutritivo líquido concentrado al 20% de NaCl, contenido en un tubo de ensayo de 15 mL, se inocularon 300×10^6 cel/mL de una

cepa bacteriana; inmediatamente después del proceso de inoculación (tiempo cero) el medio líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min en una centrifuga marca Hermle Benchmark Z-206-A. El sobrenadante se conservó y la fase sólida (pellet bacteriano) se desechó. Tratamiento 2 (T2): Se diseñó de manera similar al T1, la diferencia radica en que las bacterias inoculadas permanecieron en el medio de cultivo líquido durante 72 h a 42°C y oscuridad constante.

La titulación por precipitación se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Skoog *et al.*, (2014). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 5 mL del medio de cultivo líquido centrifugado y se le agregaron 2.0 mL de cromato de potasio al 0.5% compuesto que actuó como indicador y una solución de nitrato de plata a 0.2 N que fue el agente titulante (Fig. 3A). Al mismo tiempo, en una bureta de 25 mL se llenó con la solución de nitrato de plata 0.2 N (Fig. 3B), esta se fue liberando y agregando el contenido del matraz Erlenmeyer (Fig. 3C), el proceso se detuvo una vez que se logró el vire, del color de la solución a titular que paso de amarillo (color original del medio) a rojo ladrillo (Fig. 3D). Se registro la cantidad (mL) de la solución de nitrato de plata para lograr el vire. El porcentaje de NaCl en el medio de cultivo experimental se estimó mediante la ecuación:

$$\%NaCl = \left[\frac{(PM NaCl)(M AgNO_3)(mL de AgNO_3 gastados en blanco - mL de AgNO_3 gastados en muestra)}{2} \right] \times 100$$

De donde:

PM NaCl: Peso molecular de NaCl

M AgNO₃: Molaridad de la solución de nitrato de plata

El experimento descrito se realizó en el Laboratorio de Química, de la Benemérita Universidad de Puebla (BUAP).

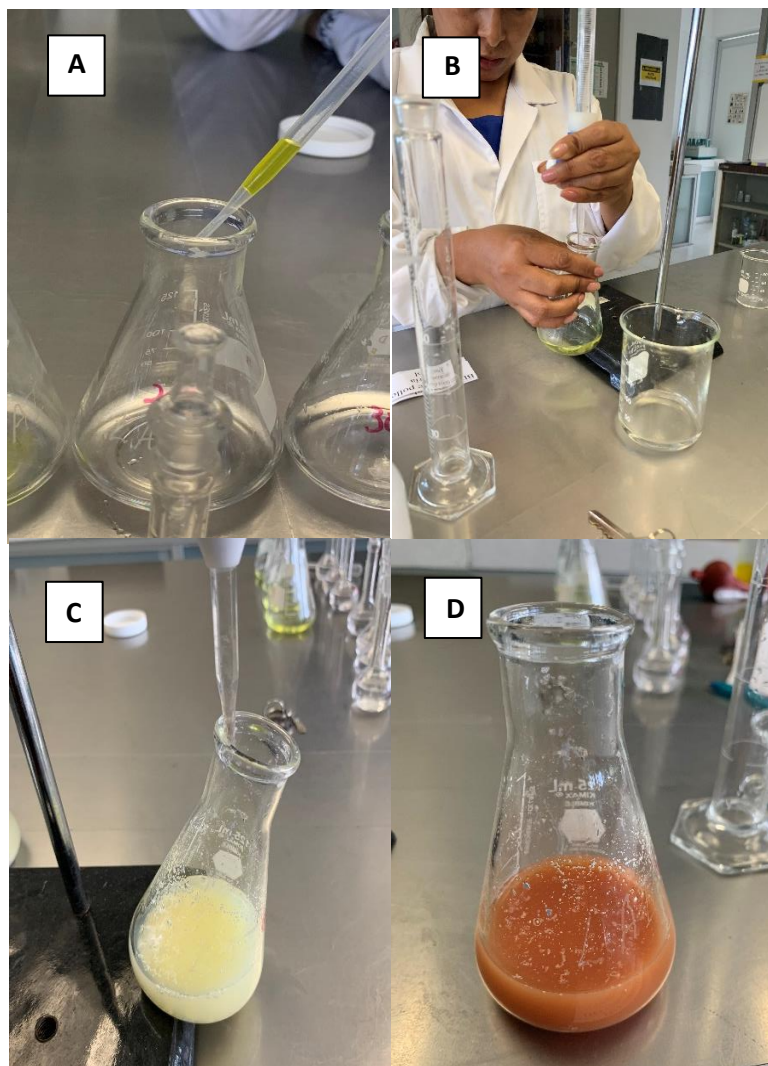


Figura 3. Técnica Método de Mohr. A) Adición de cromato de potasio a la muestra a titular. B) Agregación de la solución de nitrato de plata para la titulación de la muestra. C) Formación de flóculos conforme se añadió la solución de nitrato de plata. D) Titulación completa con el vire a rojo ladrillo

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias Tukey ($P < 0.05$) mediante un diseño experimental completamente aleatorio. Se usó el paquete estadístico SAS versión 9.0.

Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

Para este bioensayo se consideraron dos tratamientos para cada cepa a evaluar, cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Tratamiento 1 (T1): En 10 mL de medio de cultivo nutritivo líquido, concentrado a 20% de NaCl, contenido dentro de un tubo de 15 mL se inocularon 600×10^6 cel/mL de una cepa bacteriana; inmediatamente después del proceso de inoculación (tiempo cero) el medio líquido se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min en una centrifuga Hermle Benchmark Z-206-A. El sobrenadante se desechó y la fase sólida (pellet bacteriano) se conservó. Tratamiento 2 (T2): Se diseñó de manera similar al T1, la diferencia radicó en que las bacterias inoculadas permanecieron en el medio de cultivo líquido durante 72 h a 42°C y oscuridad constante. Posteriormente se estimó la cantidad de cel/mL mediante la escala de McFarland. El pellet bacteriano de cada cepa del medio líquido se colocó en un matraz de bola y se mezcló con 4 mL de ácido nítrico, 4 mL de ácido sulfúrico, 1.0 mL de ácido clorhídrico y 1.0 mL de peróxido (Fig. 4A), inmediatamente después, el matraz se colocó en una parrilla durante un lapso de 25 min a una temperatura de 35°C (Fig. 4B, 4C).

Posterior a este proceso, se agregaron 5 mL de agua desionizada para obtener un volumen total de 10 mL en cada tubo por cada cepa. La cuantificación de los iones se realizó con el equipo ICP Perkin Elmer OPTIMA 7000 DV (Fig. 4D), mediante un delgado conducto del mismo, se tomó una muestra de cada tubo hasta que el equipo detectó los iones y la computadora completó el registro de cada lectura, los datos registrados fueron adimensionales (Fig. 4E). El resultado de este experimento sirvió para seleccionar tres cepas que mostraron mayor eficiencia en la captura de iones Na^+ en medio de cultivo nutritivo líquido; las cepas seleccionadas se caracterizaron bioquímica y molecularmente.

Este experimento se realizó en el Laboratorio Ambiental de la Universidad de la Sierra Juárez del estado de Oaxaca (UNSIJ).

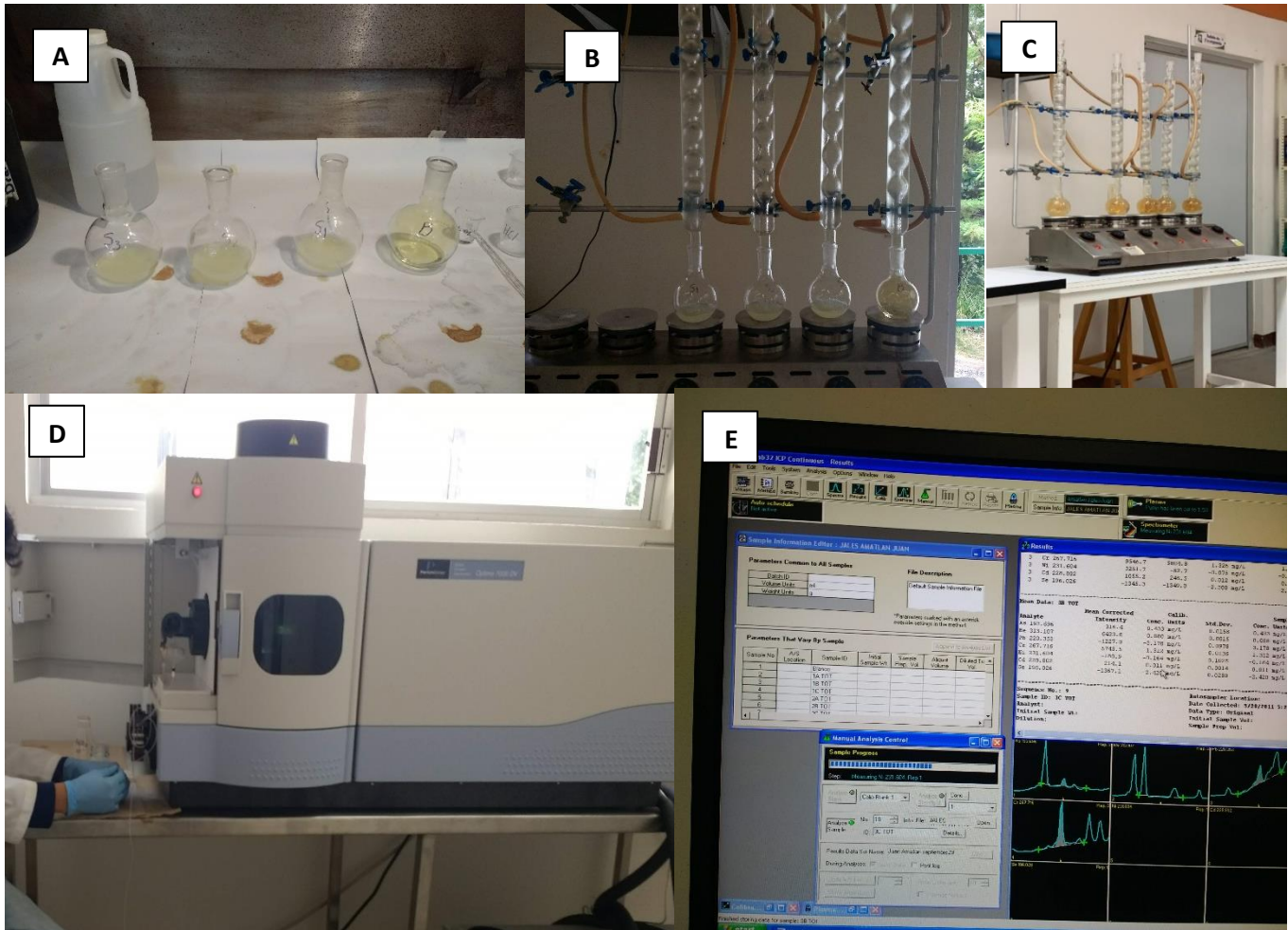


Figura 4. Técnica de espectroscopía de emisión por plasma. A) Preparación de las muestras con los ácidos y peróxido. B y C) Biodigestión de las muestras en la parrilla. D) Lectura de las muestras en el equipo de ICP. E) Captura de datos de las lecturas de iones Na capturados

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de medias Tukey ($P < 0.05$) mediante un diseño experimental factorial

aleatorio, donde el factor A fue el tiempo, y el factor B las cepas. Se usó el paquete estadístico SAS versión 9.0.

Caracterización de las bacterias halófilas

Cinética de crecimiento

La cinética del crecimiento bacteriano se determinó siguiendo la técnica usada por Jurado- Gámez y Guzmán- Insuasty (2015). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 40 mL de medio de cultivo nutritivo líquido concentrado a 20% de NaCl; en este sustrato se inocularon 150×10^6 cél/mL de una cepa bacteriana de 24 h de edad; y se incubó a 42°C durante 24 h en oscuridad constante. Posteriormente se tomaron 4.0 mL de esa solución, se pusieron en otro matraz con la misma cantidad de medio (40 mL) y se incubaron en las mismas condiciones que el primero (Jurado- Gámez y Guzmán- Insuasty, 2015).

De la última solución, se tomó 1.0 mL y se colocó en una celda para espectrofotometría; la celda se introdujo en un espectrofotómetro de doble haz UV-Vis, modelo 4260/50 marca Zuzi. El equipo se programó para leer la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 625 nm de acuerdo a Jurado- Gámez y Guzmán- Insuasty (2015). Con los datos obtenidos se construyeron curvas de crecimiento de cada cepa.

Caracterización bioquímica

Tinción de Gram

Se agregó una gota del colorante primario cristal violeta sobre un portaobjetos, posteriormente, se tomó una muestra de la cepa bacteriana y con ayuda de un asa

bacteriológica se montó sobre el colorante. Luego se agregó lugol, inmediatamente después se flameó con ayuda de un mechero, en seguida, se agregó una mezcla de alcohol-acetona sobre la muestra, se lavó con agua corriente y luego se colocó safranina para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo (López- Jácome *et al.*, 2014).

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas que se realizaron de acuerdo a Ferrández- Jeri *et al.*, (2007) fueron:

- a) Prueba de fermentación: Se usó un medio de cultivo base de acuerdo a Hugh y Leifson (1953) (Anexo 1a). Se preparó medio sólido en tubos de 15 mL con 10 mL de medio por tubo, el cual se dejó solidificar durante 2 h y posteriormente se usaron. Con un asa bacteriológica se tomó una muestra y se punzó el medio para colocar la muestra de cada cepa, se realizó por triplicado. La evidencia si hubo o no fermentación se observó con el cambio de color del medio a amarillo dando lugar a un resultado positivo, si el color permanecía se denotó como negativo el resultado.
- b) Fermentación de Carbohidratos: Se usó el medio caldo base rojo de fenol líquido (Anexo 1b), en cuanto a los carbohidratos se usaron: dextrosa, sacarosa, manitol y lactosa. Se preparó medio de cultivo líquido en tubos de 15 mL, tres repeticiones por cada carbohidrato usado, se dejó enfriar el medio durante 3 h y luego se agregó a cada tubo 150×10^6 cél/mL de cada cepa; los tubos se incubaron durante 24 h a 37°C. Para su interpretación se observó si el medio cambio de color de rojo a amarillo, el cambio de color correspondió

a una prueba positiva, los tubos con un color rojo rosado dieron lugar a una prueba negativa.

- c) Hidrolisis de almidón: El medio de cultivo (anexo 1c) se colocó en pico de flauta durante 2 h para dejarlo solidificar y posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica se procedió a barrer el cultivo de cada cepa en los tubos e incubarlo 24 h a 37°C, posterior a la incubación a cada tubo se le agregó gotas de lugol para denotar si fue positiva o negativa; si la coloración café desaparecía sobre el barrido de la cepa en el medio la prueba era positiva, pero si no desaparecía y se mantenía la prueba era negativa.
- d) Agar Mc Conkey: Se preparo agar Mc Conkey comercial (anexo 1d), se dejó solidificar durante 3 h y luego las cepas fueron estriadas por triplicado. Su interpretación se basó en la coloración de las colonias, si estas aparecían incoloras la prueba se denotó negativa y si aparecen con coloración rosa la prueba se denotó positiva.

Caracterización molecular

Extracción de ADN

Para realizar la extracción del ADN de las bacterias se usó el kit Dynabeads DNA DIRECT Universal Kit (Invitrogen, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las cuales indican lo siguiente:

Se agregó 1 unidad (200 μ l) de Dynabeads DNA Direct Universal completamente suspendido en una sola acción de pipeteo rápido, después se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, para la lisis de la muestra y formación del complejo ADN/

Dynabeads. Con un imán se retiró el lisado y se añaden 200 µl de tampón de lavado. Se lavó dos veces con el imán para eliminar los contaminantes que inhiben la PCR, se eliminó todo el tampón entre cada lavado. Por último, se resuspendió el complejo DNA / Dynabeads en 20-40 µl de resuspensión de tampón.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del fragmento del gen 16s rARN se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando el siguiente par de cebadores específicos para bacterias:

fD1 5' - CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'

rD1 5' - CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'

El amplicón generado fue de 1500 pb, el volumen final de la reacción que se usó para realizar la PCR se indica en el cuadro 1 (Irshad *et al.*, 2014); la amplificación se realizó en un termociclador marca BioRad con las condiciones indicadas en el cuadro 2 (Roohi *et al.*, 2012). El marcador de peso molecular fue 1Kb+ (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA), la mezcla de reacción sin ADN fue usado como blanco. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa de 1.0%, la electroforesis se corrió a 80 V/ 400 mA durante 40 minutos (Támez, 2009). Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciación con la empresa **Macrogen** (Geumcheon-gu, Seoul, Korea).

Cuadro 1. Volumen final de
reacción para
PCR

Compuesto	μL
Tampón 10X	2.5
DMSO al 100%	2.0
H ₂ O	16.4
dNTP's	2.0
Primer delantero	0.2
Primer reverso	0.2
Taq	0.25
ADN	1
Volumen final	25

Cuadro 2. Condiciones de reacción para
PCR

94°C	2 min	1 ciclo
94°C	1 min	} 30 ciclos
72°C	1.5 min	
72°C	5 min	1 ciclo

Análisis de secuencias

Con los resultados de las secuencias, se procedió a comparar las mismas en el banco de genes **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) y se analizaron mediante el programa **BLAST**, el cual encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas y las comparó con las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos existentes y calculó la importancia estadística para determinar el género y especie al que pertenecen los aislados bacterianos.

Parámetros físico- químicos de los suelos colectados

Salineras

El suelo colectado de las lagunas- salineras, se envió a analizar al **Colegio de Postgraduados**, los parámetros considerados para el análisis de los suelos fueron: la capacidad de intercambio catiónico (CIC), pH, CE, porcentaje de sodio intercambiable, relación absorción de sodio y sales totales presentes en el suelo. Con ello se determinó el nivel de salinidad que poseen las lagunas-salineras y se determinó el grupo de suelo al cual pertenece (Kochba *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2004).

RESULTADOS

Características de las lagunas muestreadas

Las lagunas salineras presentaron pH neutro y temperaturas mayores a 50°C al momento de realizar la recolección de muestras (Cuadro 3).

Aislamiento de las bacterias halófilas

Delos tres sitios muestreados (Lagunas-salineras) se obtuvieron 124 colonias bacterianas, las cuales se aislaron de sedimento sólido y salmuera, en el cuadro 4 se muestra el número de colonias aisladas por laguna y por tipo de muestra.

Primer criterio de selección de colonias bacterianas

Las 124 colonias bacterianas se concentraron en 10 en grupos de acuerdo a sus características morfológicas indicadas en el cuadro 5.

Segundo criterio de selección

De cada grupo se eligió una colonia tipo y se cultivaron en medio de cultivo nutritivo sólido adicionado con 20% de NaCl, con ello se verificó que las colonias crecieran sin problemas en la concentración antes mencionada. Las 10 cepas elegidas fueron denotadas como B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 y B10.

Cuadro 3. Valores de pH, temperatura, CE y parámetros químicos del sedimento sólido recolectado en tres lagunas de Salinas del Marqués, Oaxaca.

Sitio	pH	T°	CE mmhos/cm ¹ (dSm ⁻¹)	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ^{-**}	SO ₄ ²⁻ ***	K ⁺	meq/L (cmoles/L ⁻¹)		Na ⁺	RAS	PSI	Sales solubles (dSm ⁻¹)
										Ca ²⁺	Mg ²⁺				
Carmelitas	7.6	55	78	T	6.4	4982.9	0.4	970.2	109	61	962	4826	213	76	779
Cristalino	7.1	53	89	T	6.4	5536.5	0.8	667.0	203	20	1717	4270	145	68	890
Playón	7.4	56	95	T	9.1	4982.9	0.7	145.2	177	37	2136	2786	84	55	946

Cuadro 4. Número de colonias de arqueas aisladas del sedimento sólido y salmuera de tres lagunas-salineras ubicadas en Salina Cruz, Oaxaca.

Sitio (laguna)	No. de colonias aisladas de sedimento	No. de colonias aisladas de salmuera
El Playón	22	11
El Cristalino	31	18
Las Carmelitas	33	9
Total	86	38
Total	124	

Cuadro 5. Número de colonias de bacterias halófilas aisladas del sedimento sólido y salmuera de tres lagunas-salineras ubicadas en Salina Cruz, Oaxaca.

Características de las colonias						
Grupo	Color	Tam (cm)	Forma	Elevación	Sup	Borde
1	Blanco	0.35	Irregular	Convexa	Rugosa	Ondulado
2	Crema	0.2	Irregular	Plana	Lisa	Ondulado
3	Rosa	0.5	Irregular	Convexa	Lisa	Ondulado
4	Naranja	0.4	Irregular	Convexa	Rugosa	Ondulado
5	Crema	0.4	Circular	Plana	Lisa	Entero
6	Blanco	0.5	Circular	Plana	Lisa	Entero
7	Amarillo	0.2	Circular	Convexa	Rugosa	Entero
8	Amarillo	0.6	Irregular	Plana	Rugosa	Entero
9	Blan/Crem	0.25	Circular	Plana	Lisa	Entero
10	Naranja	0.1	Circular	Convexa	Lisa	Entero

Tam: tamaño. Sup: Textura de la superficie de la colonia

Evaluación de la eficiencia de las bacterias halófilas para capturar NaCl.

Bioensayos *in vitro*.

Titulación por precipitación por el método de Mohr

Los resultados obtenidos muestran que las cepas B4, B5 disminuyeron 4.53% respecto a la hora cero (cuadro 6). Sin embargo estas cepas fueron estadísticamente iguales ($p>0.05$) con las demás cepas que disminuyeron un intervalo de 3.6 a 3.9% (cuadro 7 y figura 5).

La R^2 que indica el análisis denota que el modelo se ajusta en un 91%, y el valor de coeficiente de variación (12.13) indica que la dispersión de los datos evaluados es considerable.

Cuadro 6. Cantidad de NaCl (medido en porcentaje) en medio de cultivo nutritivo líquido (inicialmente con 20 % de NaCl) inoculado con cepas de bacterias halófilas. Las estimaciones se realizaron mediante el método de Mohr a las cero y 72 h después de la inoculación.

Cepa	Porcentaje (%) de NaCl a las cero h	Porcentaje (%) de NaCl a las 72 h después de la inoculación	Porcentaje (%) reducido
B1	20	16.32	3.68
B2	20	16.6	3.40
B3	20	16.32	3.68
B4	20	15.47	4.53
B5	20	15.47	4.53
B6	20	15.73	4.27
B7	20	16.03	3.97
B8	20	16.32	3.68
B9	20	15.75	4.25
B10	20	15.75	4.25

Cuadro 7. ANOVA referente a la cantidad de NaCl en medio de cultivo nutritivo líquido (inicialmente con 20 % de NaCl) inoculado con cepas bacterianas halófilas.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	4.23866667	0.47096296	2.17	0.0712
Error	20	4.33500000	0.21675000		
Total	29	8.57366667			
Modelo corregido					
Modelo	9	4.23866667			

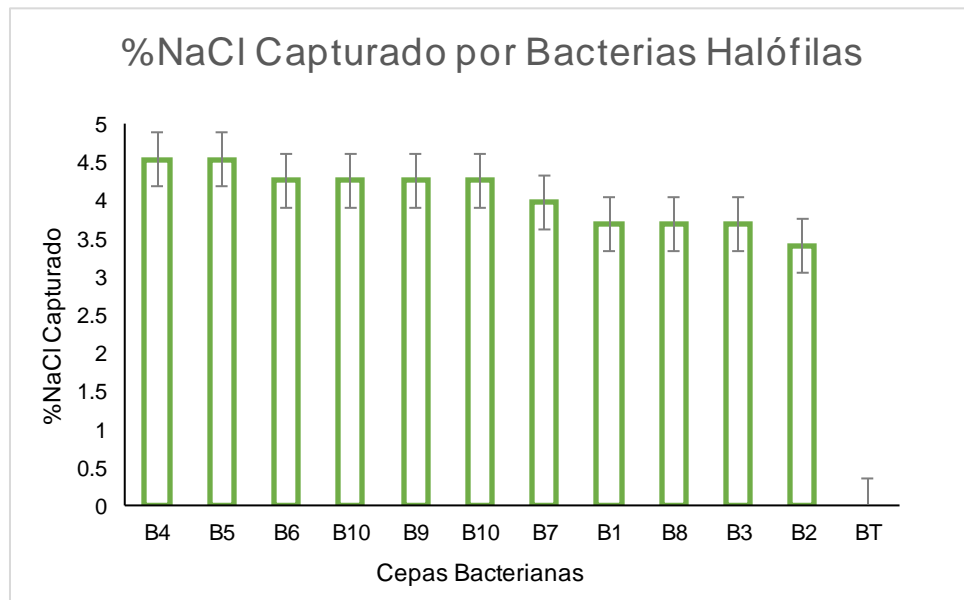


Figura 5. Comparación de medias (Tukey, 0.05) de la cantidad de NaCl presente en medio de cultivo nutritivo líquido a las 72 h después de haber sido inoculado con cepas de bacterias halófilas. Letras iguales sobre las barras indican que no existe diferencia significativa (Tukey, 0.05).

Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

Las bacterias que mayor cantidad de iones Na^+ capturaron del medio de cultivo nutritivo líquido fueron las cepas B2 y B4 con una captura promedio de 26,398 y 25,281 ppm de Na^+ respectivamente después de 72 h. Estas cepas consiguieron disminuir mayor porcentaje de Na^+ en comparación con las demás cepas. El análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa entre las 10 cepas de arqueas ($p > 0.05$) (cuadro 8 y figura 6).

La R^2 obtenida denota que el modelo solo se ajusta en un 58% y el coeficiente de variación (17.89) indica una dispersión de datos considerada.

Cuadro 8. ANOVA de la captura de Na^+ al interior de las bacterias halófilas a las cero y 72 h.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	169202277.5	18800253.1	2.15	0.0742
Error	20	175051430.3	8752571.5		
Total corregido	29	344253707.8			

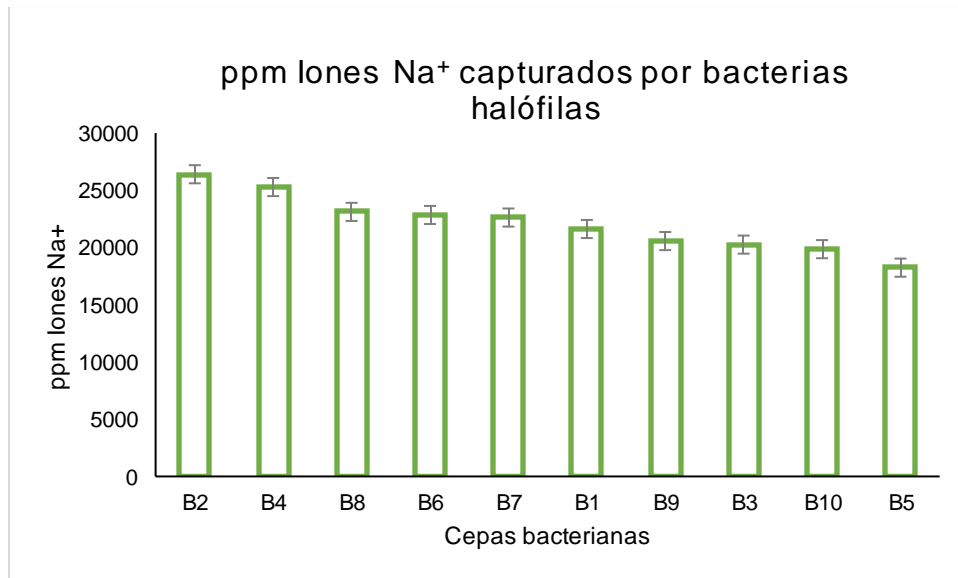


Figura 6. Comparación de medias (Tukey, 0.05) de las ppm de Na⁺ presentes al interior de las bacterias halófilas a las 72 h. Letras iguales sobre las barras indican que no existe diferencia significativa (Tukey, 0.05).

Con los datos biológicos que arrojó la técnica de ICP-OES (cuadro 9) se eligieron las cepas B2, B7 y B9 para continuar con el proceso de caracterización de las mismas, dado que los análisis estadísticos no fueron significativos.

Cuadro 9. Iones Na⁺ (ppm) cuantificados al interior de las arqueas halófilas. Las estimaciones se realizaron mediante la técnica de ICP-OES a las cero y 72 h después de la inoculación.

Cepa	Na ⁺ a las cero h (ppm)	Na ⁺ a las 72 h (ppm)	Na ⁺ reducido (ppm)
B1	18328.96	21614.86	3285.90
B2	19209.56	26398.09	7188.53
B3	21578.94	20251.80	-1327.14
B4	21423.91	25281.35	3857.44
B5	21013.88	18238.06	-2775.82
B6	22544.94	22840.34	295.40
B7	17258.00	22616.95	5358.95
B8	19496.03	23110.98	3614.95
B9	16656.80	20561.60	3904.80
B10	20404.58	19854.64	-549.95

Caracterización de bacterias halófilas

Cinética de crecimiento

La cepa B2 a la hora uno salió de su fase de latencia, de la hora 2 inició su fase exponencial y se mantuvo así durante 12 horas más (figura 7A). La cepa B7 en la hora uno inició su fase exponencial de manera inestable la cual la mantuvo así por 14 horas (figura 7B). Con respecto a la cepa B9 su fase de latencia se dio durante 4 horas, posteriormente a la hora 5 inició con la fase exponencial la cual se extendió durante 11 horas (figura 7C).

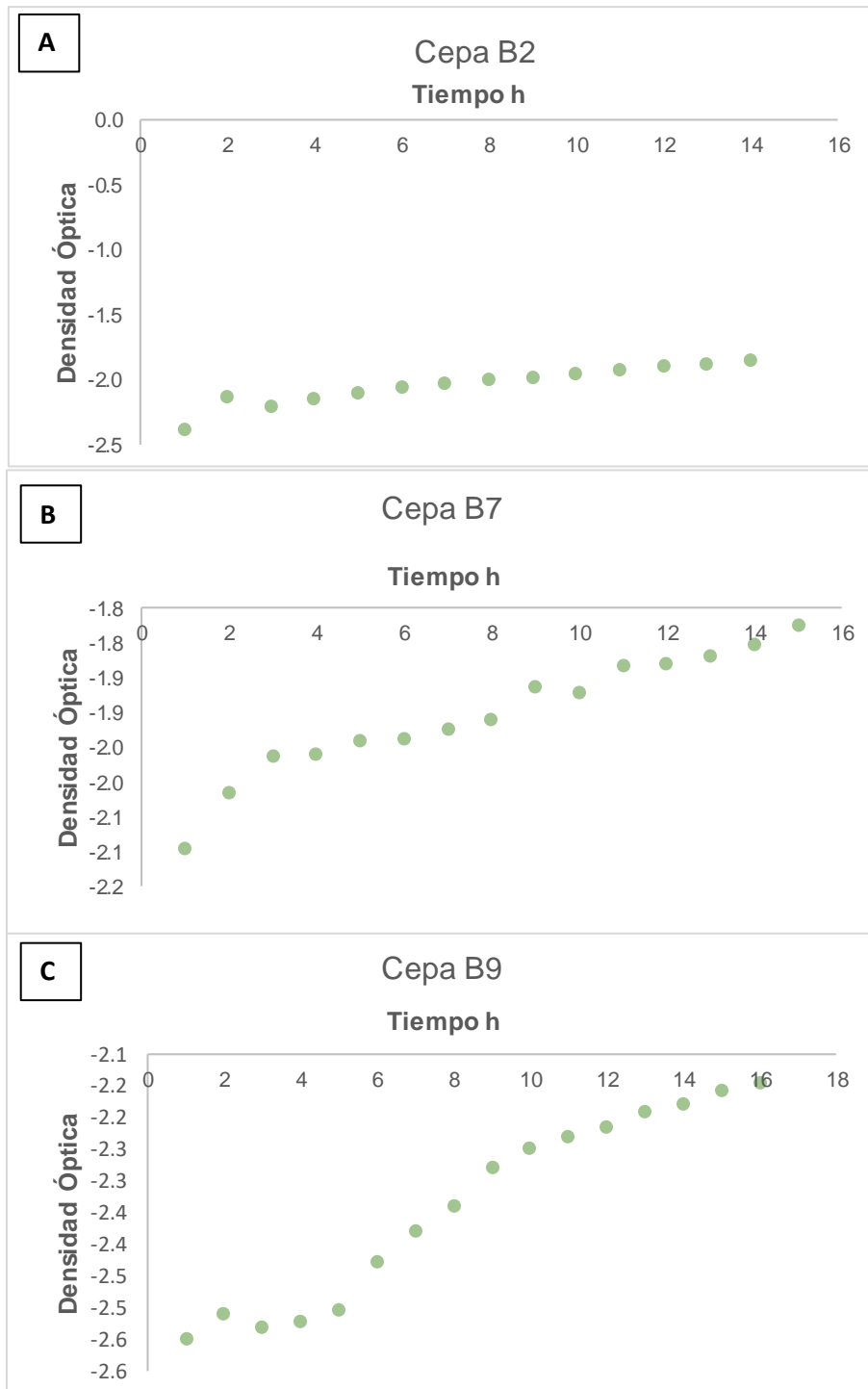


Figura 7. Cinética de crecimiento de tres cepas bacterianas halófilas. A) Ceba B2. B) Ceba B7. C) Ceba B9.

Caracterización bioquímica

Tinción de Gram y pruebas bioquímicas

La tinción de gram mostró que las tres cepas B2, B7 y B9 fueron gram positivas. Con respecto a las pruebas bioquímicas las tres cepas presentan similitud en su respuesta a agar MacConkey, en la fermentación de los carbohidratos: dextrosa, y lactosa; también en la prueba de oxidación fermentación las tres cepas no presentaron crecimiento aun después de dejarlas por 22 días más (cuadro 11)

Cuadro 11. Caracterización bioquímica de tres cepas de arqueas halófilas.

Pruebas bioquímicas	CEPAS		
	B2	B7	B9
Tinción de Gram	+	+	+
Reacción de la catalasa	+	-	+
Agar MacConkey	+	+	+
Hidrólisis de almidón	-	+	+
Oxidación-fermentación			
Sellados (tapa)	/	/	/
Sellados (cera)	/	/	/
Fermentación de carbohidratos			
Dextrosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	-
Lactosa	+	+	+
Manitol	+	+	-

+ Positivo. - Negativo. / No hubo respuesta

Caracterización molecular

La cepa B2 fue identificada como *Virgibacillus marismortui*, las secuencias analizadas tuvieron una similitud de 99.73% con la secuencia de *V. marismortui* con número de acceso MF183245.1 (1563 pb). La cepa B7 fue identificada como *V. salarius*, las secuencias tuvieron una similitud de 95.42% con la secuencia de *V. salarius* con número de acceso MN148621.1 (1505 pb) (figura 8).

La cepa B9 presentó dificultades para determinar a qué especie del género *Virgibacillus* pertenece, debido a que las distancias genéticas entre las secuencias problema y las secuencia de *Virgibacillus salarius* y *Virgibacillus marismortui* son semejantes. Para ello se realizó un análisis con inferencia bayesiana, de máxima parsimonia y máxima verosimilitud en diferentes ocasiones (no adjuntos), sin embargo, ningún método permitió la determinación de la especie a la que pertenece. Con el objetivo de encontrar otra alternativa, se realizó un análisis de sustitución de nucleótidos encontrando que las secuencias en estudios y las secuencias depositadas en la base de datos de NCBI son exactamente iguales para la región de amplificación, a excepción de *Virgibacillus olivae* que tiene una base que la diferencia. Se realizó un análisis de las secuencias completas (Figura 9) y existe la posibilidad de diferenciar con ampliaciones con mayor cobertura para 16S o buscar algún gen diferente.

tree scale: 0.01

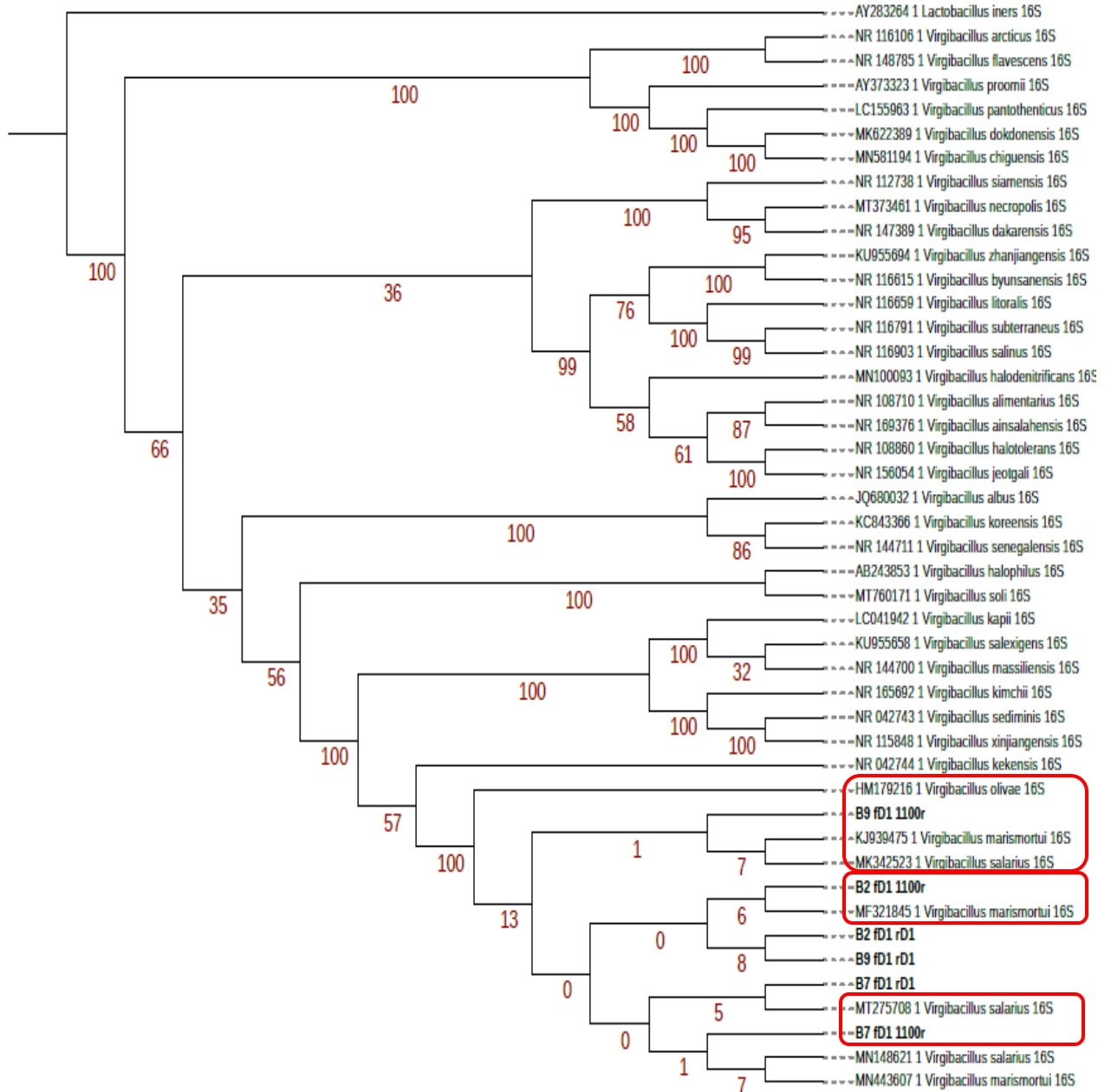


Figura 8. Árbol filogenético de consenso basado en inferencia bayesiana de *Virgibacillus* con distancias genéticas y análisis de sustitución de nucleótidos. Escala= 0.01.

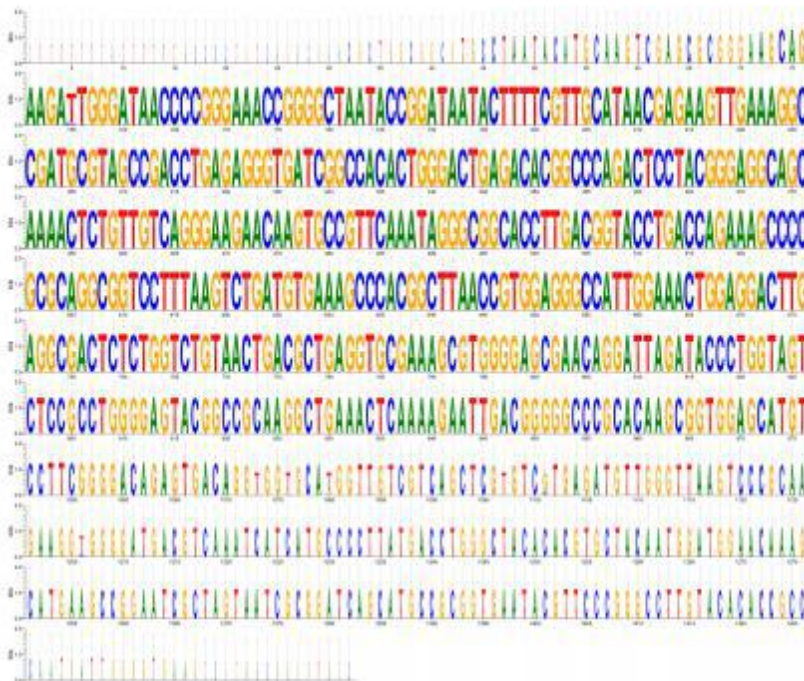


Figura 9. Análisis de sustitución para identificar diferencias.

DISCUSIÓN

De las muestras de suelo de las lagunas- salineras, en cuanto a la CIC (Capacidad de intercambio catiónico), valor que hace referencia a la capacidad de retención de nutrientes, es decir, un indicador directo de la fertilidad de suelos, se observó que las tres muestras de suelo analizadas no presentan alta CIC, lo cual indica que su capacidad de retención de nutrientes es muy baja y por tanto su nivel de fertilidad es bastante bajo (Millet, 2011). Referente al contenido total de sales presentes en las muestras de los sitios, los análisis reflejaron que todas las muestras de suelo, debido a sus valores de pH, CE, PSI pertenecen al grupo de suelos salinos-sódicos.

A partir de las muestras de las lagunas-salinas de las Salinas del Marqués, se aislaron cepas bacterianas halófilas que de acuerdo con la clasificación realizada por Kushner (1987) pertenecen al grupo de las halófilas moderadas por crecer óptimamente en 20% de NaCl.

Referente a la cuantificación de sodio que son capaces de capturar en medio de cultivo líquido, Sánchez-Leal y Arguello-Arias (2006) utilizaron la técnica de espectroscopia de absorción atómica. Para esta investigación, se usaron dos métodos para cuantificar la captura de NaCl por parte de las cepas halófilas, el método de Mohr y la espectroscopía de emisión por plasma. En cuanto al empleo de las técnicas usadas en esta investigación, no se tiene ningún reporte sobre su uso para cuantificar la captura de NaCl por parte de microorganismos.

Con el método de Mohr se obtuvieron dos cepas que biológicamente tuvieron mayor efecto que las demás, la cepa B4 y B5 ambas con una captura de 4.53% seguidas de la cepa B6 con una captura de 4.27% de NaCl. Por otro lado, con la técnica de Espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) las cepas B2 y B4 tuvieron estadísticamente mayor efecto para capturar Na⁺ en su interior después de 72 h, con respecto a las otras cepas. Cabe destacar que en el estudio de Sánchez-Leal y Arguello-Arias (2006) se evaluaron cepas bacterianas consideradas como halófilas débiles, en esta investigación se evaluaron cepas halófilas moderadas que toleran un 20% de NaCl.

Con los resultados biológicos de ICP-OES se comprueba la capacidad que tienen las bacterias halófilas para capturar sodio, aunque biológicamente se obtuvieron resultados muy prometedores con las cepas B2, B7 y B9, también se obtuvieron

resultados que muestran que las cepas no son eficientes para capturar Na^+ , como es el caso de B3, B5 y B10, las cuales no pudieron capturar iones como se esperaba, esto debido a que muchos de estos microorganismos (bacteris y arqueas) solo usan la salinidad para su equilibrio osmótico (Oren, 1994). Con estos resultados conllevan a creerr en su uso potencial para biorremediar suelos salinizados.

Con respecto a las cinéticas de crecimiento, en los gráficos mostrados se puede observar que las bacterias no tienen el mismo comportamiento en cuanto al incremento de biomasa con respecto al tiempo. En cuanto a la diferenciación de sus fases de latencia y exponencial se observaron en las cepas B7 y B9, pero con un comportamiento poco estable, de acuerdo con Pérez (2018) y Flores e Idrogo (2015) coinciden en sus investigaciones que el comportamiento de estas bacterias es poco estable, aunado a que su crecimiento es lento, en sus investigaciones reflejan datos de densidad óptica tomados en lapsos de tiempo que abarcan de las 0 h a 30 h.

En cuanto a la caracterización bioquímica de los aislados, se observa que las cepas pertenecen al grupo de los gram positivos. Las pruebas bioquímicas se realizaron de acuerdo a Fernández- Jeri *et al.*, (2007). Los resultados de las pruebas bioquímicas comparadas con Mata *et al.*, (2002); Fernández-Jeri *et al* (2007) y Azhar *et al.*, (2014) coinciden en que podrían tratarse de cepas pertenecientes al género *Halomonas* aunque otras referencias coinciden en algunos de los resultados presentados y pudieran diferir en que pertenezcan a este género (Privank *et al.*, 2011), sin embargo, aun con la comparación de los resultados no coincidió con la caracterización molecular, ya que las cepas pertenecen a otro género diferente.

La caracterización molecular de las tres cepas B2, B7 y B9 se realizó usando la subunidad pequeña del gen 16S ribosomal, lo cual permitió confirmar que pertenecen al *Dominio Bacteria*. El análisis filogenético indicó que las cepas pertenecen al género de *Virgibacillus*. Este género ya se ha reportado en otros sitios salinos como el Mar Muerto (Arahal *et al.*, 1999), el lago Shariano (Hua *et al.*, 2008) y en suelos salinos de la India (Khotari *et al.*, 2013). Estas referencias permiten intuir que las salinas del Marqués es un ecosistema que contiene resguardada gran diversidad microbiológica aún por descubrir.

Respecto a la especie de *V. marismortui* fue aislada por primera vez del mar muerto e identificada como una bacteria moderadamente halófila y clasificada dentro del género *Bacillus marismortui sp* por Arahal *et al.*, en 1999. Un año más tarde fue reclasificada como *Salibacillus marismortui* (Arahal *et al.*, 2000). La última reclasificación que tuvo fue en el 2003 junto con otras especies, en la cual fue clasificada hasta ahora como *Virgibacillus marismortui*. (Hyerman *et al.*, 2003). Cabe destacar que fue encontrada en el mar muerto, no se tiene algún otro reporte de esta especie que haya sido encontrada en México. Por tanto, podría asegurarse que las Salinas del Marqués es hogar de muchas especies conocidas y otras más quizá desconocidas.

Referente a *V. Salarius* el primer registro que se tiene de esta especie fue en 2008, aislada de un lago Sahariano por Hua *et al.*, e identificada en base a una taxonomía polifásica. Es importante destacar que esta especie en particular se encuentra relacionada estrechamente con *V. marismortui* y *Olivae* en un 99.7 y 99.4%. Sin embargo, se discreparon las dudas debido a características fenotípicas y la relación

ADN- ADN. Kothari *et al.*, (2013) aisló a *V. Salarius* de suelos salinos de Khambhat, India con la finalidad de determinar los compuestos que esta especie y otras más eran capaces de producir.

Con la cepa B9 hubo problema para caracterizarla debido a que al comparar las secuencias con la base de datos del NCBI existe cierta confusión para determinar si esta cepa pertenece a *Virgibacillus marismortui*, *salarius* u *olivae*. Para discernir las dudas se requeriría amplificar otra región más conservada que posea mayor información para determinar de forma definitiva a que especie del género *Virgibacillus* corresponde.

REFERENCIAS

- Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., and Ammar, E. 2013. Biological properties of carotenoides extracted from *Halobacterium halobium* isolated from Tunisian solar saltern. 13 (255). pp. 1-8.
- Ali, I., Prasongsuk, S., Akbar, A., Aslam, M., Lotrakul, P., *et al.* 2016. Review. Hypersaline habitats and halophilic microorganisms. Maejo International Journal of Science and Technology. 10 (03). pp. 330- 345.
- Al-Mailen, D. M., Sorkhoh, N. A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., and Radwan, S. S. 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. Extremophiles. 14. DOI 10.1007/s00792-010-0312-9. pp. 321-328.
- Arahal, D. R., Cortez, M., Volcani, B. E., Schleifer, K. H. 1999. *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. International Journal of Systematic Bacteriology. 49. Doi: 10.1099/00207713-49-2-521. pp. 521-30.
- Arahal, D. R., Cortez, M., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., and Ventosa, A. 2000. Reclassification of *Bacillus marismortui* as *Salibacillus marismortui* comb. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50. Doi: 10.1099/00207713-50-4-1501. pp. 1501-3
- Arora, S., Singh, Y. P., Vanza, M., and Sahni, D. 2016. Bio-remediation of saline and sodic soils through halophilic bacteria to enhance agricultural production. Journal of Soil and Water Conservation. 15 (4). pp. 302-305.

- Azhar, M., Uniyal, V., Chauhan, N., and Singh, D. 2014. Isolation and biochemical characterization of halophiles from Sahastradhara region, Dehradun, India. *International Journal of current microbiology and Applied Sciences*. 3 (12). pp. 753-760.
- Biswas, J and Paul, A. K. 2013. Production of extracellular enzymes by halophilic bacteria isolated from solar salterns. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 4(4). pp.30-36
- Castro- Piña. L., Flores- Gallegos, A., Rodríguez-Vidal, A., Aguilar-González, M., Aguilar-González, C y Rodríguez-Herrera, R. 2011. Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3: 33-43.
- Chen, G., -Q & Jiang, X. -R. 2018. Next generation industrial biotechnology base don extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 50. Doi: 10.1016/copbio.2017.11.016. pp. 94-100.
- Coronado- Corral, J. C., De los Santos Villalobos, S., Prado-Barragàn, L. A., Buenrostro, J., Vásquez- Murrieta, M. S.m Estrada, M. I. and Cira, L. A. 2018. Isolation of moderately halophilic bacteria in saline enviroments of Sonora State searching for proteolytic hydrolases. *Open Agriculture*. 3. <https://doi.org/10.1515/opag-2018-0021> pp. 207-213.
- Cuadros-Orellana, S., Pohlshroder, M., and Durrant, L. R. 2006. Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 57. DOI: 10.1016/j.ibiod.2005.04.005. pp. 151-154.
- Dang, H., Zhu, H., Wang, J. and Li, T. 2009. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25. pp. 71- 779.
- Delgado- García, M., De la Garza-Rodriguez, I., Cruz-Hernandez, M. A., Balagurusamy, N., Aguilar, C., and Rodríguez-Herrera, R. 2013. Charcaterization and selection of halophilic microorganisms isolated from Mexican soils. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science*. 8(6). pp. 457- 464.
- Elevi, R., Assa, P., Birbir, M., Ogan, A., and Oren, A. 2004. Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from the Ayvalik Saltern, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20. pp. 719-725.
- Fernández- Jeri, Y., Zavaleta, A. I., and Arahall, D. R. 2007. Bacterias halófilas moderadas aisladas de las minas salinas de Atacocha- Ayacucho. *Ciencia e investigación*. 10 (2). pp. 59-63.

- Flores, A. P. y Idrogo, E. 2015. Rendimiento de polihidroxicanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas se suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambeyeque. Tesis para la obtención de grado. Perú.
- Flores, M. L., Zavaleta, A. I., Zambrano, Y., Cervantes, L. y Izaguirre, V. Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*. 13 (1). pp. 42- 46
- Franzamman, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeekin, T. A., and Burton, H. R. 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. Nov., a Halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*. 11. pp. 20-17. DOI: 10.1016/s0723-2020(88)80044-4.
- Gontia- Mishra, I., sapre, S., & Tieari, S. 2017. Diversity of halophilic bacteria and actinobacteria from India and their biotechnological applications. *Indian Journal of Geo Marine Science*. 46 (08). pp. 1575- 1587.
- Gonzalez- Hernandez, J. C., y Peña, A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hanseii* (Levadura halofila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 44 (3-4). pp. 137- 156.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., and Casos, I. 2017. Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch. *Scientia Agropecuaria*. 8 (2). Doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.02.03. pp. 109- 118
- Hoben, H. J., Somasegaran, P. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium spp.* In inoculates made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (5). pp. 1246-1247.
- Hua, P., Hamza- Chaffai, A., Vreeland, R. H., Isoda, H. and Naganuma, T. 2008. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65693-0>. pp. 2409. 2414
- Hyerman, J., Logan, N. A., Busse, H. -J., Balcaen, A., et al., 2003. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53. Doi. 10.1099/ijs.0.02371-0. pp. 501- 511.
- Jurado- Gámez, H. y Gúzman-Insuasty, M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus*

- agalactiae* y *Escherichia coli*. Revista Médica Veterinaria Zootecnista. 62 (2). pp. 23-19.
- Jurado- Gámez, H., y Guzmán- Insuasty, M. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Revista Medica Veterinaria Zootecnista. 62 (2). pp. 23- 39
- Kearl, J., McNary, C., Scott, J., Mei, C., Aanderud, Z. T., Smith, S. T., West, J., Colton, E., Hamson, M., and Nielsen, B. 2019. Salt- Tolerant halophyte rhizosphere bacteria stimulate growth of alfalfa in salty soil. *Frontiers in Microbiology*.10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01849>. pp.1-11
- Kochba, M., Ritvo, G. and Avnimelech Y. 2004. The effect of municipal solid waste compost (msw) on the replacement of sodium in sodic soil models. *Soil Science*. 169(8). Doi: 10.1097/01.ss.0000138417.37793.7b. pp. 567-572.
- Kothari, V., Panchal, M. and Srivastava. 2013. Presence of Catechol Metabolizing Enzymes in *Virgibacillus Salarius*. In *Journal of enviromental Conservation Reseach*. 1(2). pp. 29-36.
- Kushner, D.J. 1985. *The halobacteriaceae. En: The bacteria*, vol. VIII. Ed. Woese, C.R. y Wolfe, R.S., pp. 171-214. Academic press, New York
- López- Jacome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña,S., Cerón-González, G y Franco-Cendejas, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad. Artículo de revisión*. 3 (1). pp. 10-18.
- Mata, J. A., Martínez- Canovas, M. J., Quesada, E. and Bejar, V. A. 2002. Detailed phenotypic characterization of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol*. 25. pp. 360-375.
- Mau, S., Veá, K., y Sánchez. 2012. Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Tropical Journal of Enviromental Sciences*. 42 (2). <http://dx.doi.org/10.15359/rca.42-2.4>. pp. 45- 52.
- McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*, XLIX (14). Doi: 10.1001/jama.1907.25320140022001f. pp. 1176-1178.
- Millet, O. 2011. Química y vida en ambientes de salinidad extrema. *Investigación Química. Real Sociedad Española de Química. An. Quím.* 107 (4). pp. 304-309
- Moreno, M. L., Piubeli, F., Bonfá, M. R., García, M. T. Durrant, L., Rand, M. E. 2012. Analysis and characterization of cultivable extremophilic hydrolytic

- bacterial community in heavy-metal-contaminated soils from the Atacama Desert and their biotechnological potentials. *Journal Applied Microbiology*. 113. pp. 550- 559
- Mueller, T. G., Mijatovic, B., Sears, B. G., Pusuluri, N. and Stombaugh, T. S. 2004. Soil electrical conductivity map quality. *Soil Science*. 169(12). pp. 841-851
- Mwatha, W. E., and Grant, W. D. 1993. *Natronobacterium vacuolata* sp. Nov., a Haloalkaliphilic Archaeon isolated from Lake Magadi, Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43 (3). Pp. 401-404.
- Onshi, H., Mori, T., Takeuchi, S., Tani, K., Kobayashi, T., and Kamekura, M. 1983. Halophilic nuclease of a moderately Halophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(1). pp. 24- 30.
- Oren, A. 1983. *Halobacterium sodomense* sp. Nov., a Dead Sea Halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33 (2). pp. 381-386.
- Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *En Brazilian journal of microbiology* 47. Brasil. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.201604.001>. pp. 621–627.
- Ouyang, P., Wang, H., Hajnal, I., Wu, Q., and Guo, Y. 2018. Increasing oxygen availability for improving poly (3- hydroxybutyrate) production by *Halomonas*. *Metabolic Engineering*. 45. Doi: 10.1016/j.ymben.2017.11.006. pp. 20- 31.
- Pérez, S. 2018. Estudio de la cinética de bacterias halófilas presentes en la maduración de *Engraulis anchoita* involucradas en la transformación de histidina/ histamina. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Privank, A, P., Sumitra, C. and Ravi, R. K. 2011. Isolation, Biochemical Characterization and Molecular Identification of Halophiles from Coastal Region of Okha and Porbandar. Conference paper
- Ramírez, N., Serrano J. A., Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*, 37. pp. 56-71
- Robles P., C.; M. Bautista R. y A. Maldonado O. 1999. Distrito de riego No. 19 de Tehuantepec, Oaxaca. 1. Evaluación del ensalitramiento de los suelos. *Avances en Ciencia y Tecnología*. 3. pp. 50-60.
- Rodríguez, M. A., Higuera, N. C., & Sanjuanleo, D. W. 2019. Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica-Boyacárafia 2, Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 67 (3). Pp. 621-632.

- Rodriguez, M. A., Higuera-Mora, N. C., & Sanjuelo, D. W. 2019. Bacterias halófilas con potencial para la recuperación de suelos salinizados en Sáchica- Boyacá, Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 67 (3). pp. 621-632.
- Rohban, R., Amoozegar, M. and Ventosa, A. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolysis from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal Industrial Microbiol Biotechnol*. 36. Doi: 10.1007/s110295-008-0500-0. pp. 333- 340.
- Sánchez- Bernal, E., Ortega, H., Sandoval, G., Hernández., V., Estrada, C. 2012. Lavado de sales en suelos aluviales Costeros de Oaxaca, México, con aguas residuales Municipales tratadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28. pp. 343-360.
- Sánchez- Porro, C., Martín, S., Mellado, E., and Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal Applied Microbiology*. 94. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x. pp. 295- 300.
- Sánchez-Leal, L. G., y Arguello-Arias, H. 2006. Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio *in vitro* y su posible aplicación en bioremediación en suelos salinos-sódicos. *Nova Publicación Científica*. 4 (6). pp. 19-32.
- Sarafin, Y., Donio, M. B. S., Velmurugan, S., Michaelbabu, M., & Citarasu, T. 2014. *Kokuria marina* BS-15 a biosurfactant producig halophiic bacteria isolated from Solar salt works in India. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21 (6). Doi: 10.1016/j.sjbs.2014.01.001. pp. 511- 519.
- Shukla, M. K., Lal, R. and Ebinger, M. 2004. Soil quality indicators for the north appalachian experimental watersheds in coshocton ohio. *Soil Science*. 169(3). Doi: 10.1097/01.ss.0000122523.03492.79. pp. 195-205.
- Singh, A., and Kumar-Singh, A. 2018. Isolation and characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of western India. 3 *Biotech*. 8 (45). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1072-3>. Pp. 1-15.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. 2014. *Fundamentos de Química analítica*. CENGAGE LEARNING. Novena ed. ISBN: 978-0-495-55828-6.
- Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W. D., Horikoshi, K. 1990. *Haloarcula japónica* sp. Nov., a new triangular halophilic Archaeobacterium. *Systematic and Applied Microbiology*. 13. pp. 177-181.
- Támez, P. 2009. Diversidad filogenética de arqueas halófilas extremas cultivables de Exportadora de sal, S. A., Guerrero Negro. Tesis para obtener el Grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones del Noroeste, S. C. La Paz B.C.S. 1-119.

- Ventosa, A., Joaquín, J. N., and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Rev.*, 62. Doi: 10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998. pp. 504-544.
- Vora, J. U., Jain, N. K., and Modi, H. A. 2014. Extraction, Characterization and Application studies of red pigment of halophile *Serratia marcescens* KH1R KM035849 isolated from Kharaghoda soil. *International Journal of Pure & Applied Bioscience. India.* 2: 160-168. ISSN: 2320 – 7051
- Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L., and Elliot, E. 1980. *Halomonas elongata*, a New genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 30 (2). Doi: 10.1099/00207713-30-2-485. pp. 485- 495.
- Wainø, M., Tindall, B. J., and Ingvorsen, K. 2000. *Halorhabdus utahensis* gen nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50. pp. 183-190.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Yadav, A. N., & Saxena, A. K. 2018. Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. *Journal of Applied Biology & Biotechnology.* 6 (1). Doi: 10.7324/JABB.2018.60109. pp. 48- 55.
- Yadav, D., Singh, A. and Mathur, N. 2015. Halophiles- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 4 (12). pp. 616-629.

ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS HALÓFILAS (Castro- Piña *et al.*, 2011).

Medio de Cultivo Bacterias halófilas	
Composición	g/L
Extracto de carne	1
Levadura	2
Peptona	7.5
NaCl	200
Agar	20
Agua destilada	1000

Se esteriliza a 121°C (15 lb) durante 15 min.

ANEXO 2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ARQUEAS HALÓFILAS (Leal- Ferrández, 2017)

Medio de Cultivo Arqueas halófilas	
Componente	g/L
HNaCO ₃	0.167
NaBr	0.65
CaCl ₂	0.958
KCl	5
MgCl ₂ • 6H ₂ O	34.6
MgSO ₄ • 7H ₂ O	49.5
NaCl	250
Agar	20
Agua destilada	1000

Una vez que se prepara la cantidad requerida se filtra con papel para eliminar las impurezas y se procede a esterilizar a 121 °C durante 20 min.

ANEXO 3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

3a) Prueba de Oxidación- fermentación:

Composición	g/L
Triptona	10.0
Extracto de levadura	1.0
Purpura de bromocresol	0.04
Agar	18.0
Agua destilada	1000.0

Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) por 15 minutos, ajusta pH a 7.2. Incubar de 24 a 48 h a 37°C

3b) Fermentación de Carbohidratos: Caldo básico rojo de fenol.

Composición	g/L
Peptona	10.0
Extracto de carne	1.0
NaCl	5.0
Agua destilada	1000.0
Indicador de pH rojo de fenol	0.018
Carbohidratos	
Dextrosa	5.0
Sacarosa	5.0
Manitol	5.0
Lactosa	5.0

Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) por 15 minutos. Incubar de 24 a 48 h a 37°C.

3c) Hidrólisis de almidón.

Composición	g/L
Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar	18.0
Almidón	0.21
Agua destilada	1000.0

Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 min. Incubar de 24 a 48 h a 37°C.

3d) Agar Mc Conkey

Composición	g/L
Bd Mc Conkey II agar	50.0
Agua destilada	1000.0

Esterilizar a 121°C por 15 min, incubar a 35-37°C de 18 a 48 h