



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

*Programa de Estudios de Posgrado*

**Diversidad filogenética de arqueas halófilas extremas  
cultivables de Exportadora de Sal, S.A., Guerrero Negro.**

# **T E S I S**

*Que para obtener el grado de*

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos  
Naturales  
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

**Paulina Tamez Hidalgo**

La Paz, B.C.S. Enero de 2009

Comité tutorial y revisor de tesis  
Dr. Alejandro López Cortés Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Director de Tesis

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 21 del mes de enero del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

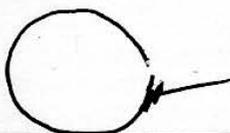
**“Diversidad filogenética de arqueas halófilas extremas cultivables de Exportadora de Sal, S. A., Guerrero Negro”**

Presentada por el alumno:

**Paulina Tamez Hidalgo**

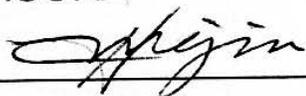
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

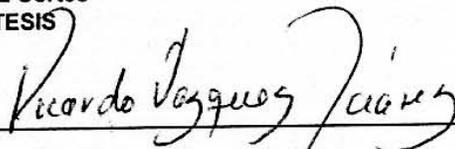


Dr. Alejandro López Cortés  
DIRECTOR DE TESIS

LA COMISION REVISORA



Dr. Humberto Claudio Mejía Ruíz  
CO-TUTOR



Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Comité tutorial y revisor de tesis**

Dr. Alejandro López Cortés Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Director de Tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Cotutor

Dr. Humberto Mejía Ruíz Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Cotutor

**Jurado en la defensa de tesis**

Dr. Alejandro López Cortés Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Humberto Mejía Ruíz Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Suplente:

Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

“La biología es la química avanzada y ha transmitido su conocimiento a la ecología acerca de los elementos indispensables en los cuerpos de los organismos” **Margalef, R. (1997)**

## Resumen

Los habitats hipersalinos son un ejemplo de ambiente extremo. Están distribuidos globalmente y su importancia radica en que han existido desde tiempos precámbricos, en que poseen poblaciones microbianas particularmente especializadas en prosperar bajo condiciones de alta salinidad y sus pobladores son fuente potencial de moléculas nuevas con aplicación biotecnológica. Los miembros más conspicuos son aquellos del dominio Arquea, particularmente de la familia Halobacteriaceae. La planicie donde se encuentra Exportadora de Sal, S.A. (ESSA), Guerrero Negro, se caracteriza por sus altos valores de incidencia de radiación solar; circunstancia que propicia la existencia de grandes extensiones con minerales denominados evaporitas que resultan de la evaporación del agua de mar, como es el caso del yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), la calcita o anhidrita ( $\text{CaSO}_4$ ) y la halita ( $\text{NaCl}$ ). De ESSA, muy pocos estudios han enfocado sus esfuerzos en el aislamiento e identificación de las arqueas halófilas extremas que habitan en las áreas de concentración (21% sales totales) y vasos cristalizadores de cloruro de sodio (25% sales totales). Por ello, el propósito de este trabajo fue describir y relacionar filogenéticamente la composición de poblaciones de arqueas halófilas extremas cultivables presentes en la salmuera y en minerales evaporíticos de los vasos concentradores 9 y 10 y cristalizadores 19 y 20. El análisis polifásico consistió en el aislamiento de cepas de arqueas y bacterias fotótrofas anoxigénicas, microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica de barrido (SEM) y secuenciación del ADN que codifica para el 16S rARN para el análisis filogenético. Además, se analizó la comunidad total por una aproximación independiente de cultivo que integró la amplificación de ADN -de muestras ambientales- que codifica para un fragmento del 16S rARN y posterior separación de productos en un gel de electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE) para su posterior análisis estadístico. Se obtuvieron cinco cepas de los vasos concentradores: cuatro pertenecieron a miembros del género *Halobacterium*, cada una con morfologías coloniales diferentes; una tuvo 99% de similitud con la cepa DMS 11551 (No. acceso AF002984) denominada *Halogeometricum borinquense*. Del cristalizador se obtuvo una cepa de *Haloarcula* sp. Se presume sea la misma especie aislada por Javor *et al.*, (1982), parcialmente estudiada y propuesta como *Haloarcula californiae*. Las micrografías obtenidas por microscopía de contraste de fases y SEM muestran pleomorfismo en todas las cepas, principalmente se distinguen bacilos, cocos, células triangulares, cuadradas, rectangulares y con forma de mazo. El gel de DGGE, mostró la existencia de al menos once bandas las cuales se definieron como unidades operacionales taxonómicas (OTU), en ambas áreas de concentración se distinguen 5 bandas intensas, las cuales sugieren la presencia de 5 poblaciones dominantes de arqueas no cultivables. El análisis estadístico de DGGE muestra que la comunidad de haloarqueas entre los vasos concentradores 9 y 10 difiere ligeramente en composición y número. Se sugiere que los OTU's pertenezcan a miembros no cultivables de la familia Halobacteriaceae o arqueas metanógenas de los géneros, *Methanosarcina*, *Methanohalobium* o *Methanohalophilus*.

**Palabras clave:** ESSA, haloarqueas, extremófilos, salinidad, filogenia

## Abstract

Hypersaline habitats are one kind of extreme environments. These are distributed worldwide and one interesting aspect is that they existed since the Precambrian Era, they shelter specialized microbial populations that thrive under highly saline conditions, and their microbial populations are a potential source for new molecules with useful biotechnological applications. The most outstanding members are those of the archaea domain, particularly the Halobacteriaceae family. The lowland that contains the Exportadora de Sal, S.A. -ESSA salt works receives intense insolation, a condition that favors long extensions of lands that are rich in minerals crystallized from evaporation of seawater (evaporites such as anhydrite, gypsum, and halite). Very few studies have been carried out on isolating and identifying halophile archaea that reside in the gypsum-anhydrite ponds and sodium chloride crystallizer ponds. This study describes and phylogenetically relates the composition of culturable halophilic archaea in brine and evaporite minerals from the bottom of the ponds 9 and 10 and crystallizer ponds 19 and 20. Polyphasic analysis included: isolation of halophilic archaeal and phototrophic anoxygenic bacterial strains, phase-contrast microscopy (PCM), scanning electron microscopy (SEM), and sequencing of DNA for 16S rRNA signaling phylogenetic analysis; with the same methods, we analyzed total haloarchaeal community by a culturable, independent method that comprised amplification of DNA, environmental samples that code for a fragment of the 16S rRNA, followed by a separation of the PCR products in a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for subsequent statistical analysis. We obtained five strains from ponds 9 and 10, four of them belong to the genera *Halobacterium*, each with different colonial morphologies; one corresponds with *Halogeometricum borinquense* species. A *Haloarcula* strain was obtained from crystallizer pond 20. We believe this is the same species previously isolated by other researchers, partially studied and proposed as *Haloarcula californiae*. PCM and SEM images show pleiomorphism in every strain; rods, cocci, and triangular, square, rectangular, and club-shaped cell were observed. DGGE revealed at least another eleven bands that were defined as Operational Taxonomic Units (OTU), with five intense bands distinguishable in both ponds. This suggests the presence of five dominant non-culturable archaea populations. Statistical analysis of results from DGGE showed that the haloarchaea community differs slightly in composition and number between the two ponds. We suggest that the OTUs belong to non-culturable members of the Halobacteriaceae family or methanogenic archaea of the *Methanosarcina*, *Methanohalobium*, or *Methanophilus* genera.

**Keywords:** ESSA, haloarchaea, extremophiles, saline ponds, phylogeny

**Dedicatoria**

A mi padre, porque siempre ha creído en mí y me ha dado su infinito amor

A mi hermana por estar aunque no esté

A mi madre por su apoyo moral

A toda mi familia por ser la base de mi crecimiento.

## **Agradecimientos**

- Esta investigación fue financiada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. a través del proyecto fiscal PC4.2 “Diversidad Microbiana”. Por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Convocatoria Ciencia Básica SEP-CONACyT 45914/A-1 “Diversidad Microbiana: fuente de innovación en biotecnología”.
- Se agradece a CONACyT por otorgar la beca de maestría número 206530, y al departamento de posgrado del CIBNOR por los apoyos y facilidades recibidas durante la maestría.
- La empresa “Exportadora de Sal, S.A., en Guerrero Negro, B.C.S., por brindarnos sus facilidades para el muestreo y procesamiento de las muestras.
- Al laboratorio de Ecología Microbiana Molecular por facilitar todo el equipo y reactivos necesario para el desarrollo de la tesis.
- Al laboratorio de Microbiología Ambiental por facilitar algunos equipos indispensables para la realización de esta tesis. En especial al técnico Juan Pablo Hernandez por su dedicación y valiosos consejos.
- Al laboratorio de Fisiología comparada por facilitar algunos de sus equipos.
- Al laboratorio de microscopía electrónica y en especial al técnico Ariel Cruz Villacorta, por su gran ayuda, consejos técnicos y apoyo moral en las observaciones al microscopio electrónico de barrido
- Al grupo del laboratorio de ecología microbiana molecular-CIBNOR, por su amistad, ayuda y acertados consejos durante la realización de la tesis.
- Al técnico Angel Carrillo por su gran amistad y apoyo moral en todo momento.

- A mis asesores: Dr. Alejandro López Cortés, Dr. Ricardo Vázquez Juárez y Dr. Humberto Mejía Ruíz por su valiosa ayuda y atinados comentarios durante el desarrollo de esta investigación.
- A mis padres por el amor, paciencia y apoyo económico durante los momentos difíciles.
- A mis amigos y compañeros de la maestría por compartir momentos mágicos
- A Sergio por ofrecer su amor, paciencia y hombro en todo momento.

## Índice

Lista de abreviaturas .....	xi
Lista de tablas .....	xii
Lista de figuras.....	xiii
1. Introducción .....	1
1.1. Ambientes hipersalinos extremos .....	1
1.2. Halofilismo .....	2
1.3. La diversidad microbiológica en ambientes hipersalinos .....	4
1.4. Minerales evaporíticos como hábitat .....	5
1.5. Estudios polifásicos para describir diversidad de arqueas.....	8
1.5.1. Herramientas moleculares.....	8
1.5.2. Estudios basados en aislamiento de cepas .....	10
1.6. Arqueas halófilas extremas.....	10
1.6.1. Características generales, modelos importantes de estudio .....	10
1.6.2. Potencial biotecnológico de las arqueas halófilas extremas .....	13
2. Antecedentes.....	15
2.1 Estudios de arqueas en ambientes hipersalinos .....	15
2.2 Estudios microbianos en Exportadora de Sal, S.A. (ESSA).....	16
2.2.1. Estudios de diversidad de organismos del dominio Arquea en ESSA.....	18
3. Justificación .....	20
4. Meta .....	21
5. Hipótesis .....	22
6. Objetivo .....	22
6.1 Objetivos particulares .....	22
7. Descripción del área de estudio .....	24
7.1 Exportadora de Sal, S.A. (ESSA).....	24
8. Materiales y métodos .....	26
8.1 Campo .....	26
8.1.1. Colecta en los sitios de muestreo.....	26
8.1.2. Fijación de las muestras.....	28
8.2. Laboratorio.....	28
8.2.1. Aproximación dependiente de cultivo de la comunidad arqueal.....	28
8.2.2. Enriquecimientos obtenidos de las muestras de campo .....	28
8.2.3. Primo-aislamiento y condiciones de incubación .....	29
8.2.4. Aislamiento y caracterización de las cepas .....	29
8.2.5. Etiquetado de las cepas.....	31
8.2.6. Identificación de las cepas aisladas .....	32
8.2.7. Extracción y cuantificación de ADN.....	32
8.2.8. Amplificación de un fragmento del gen 16S rARN .....	33
8.2.9. Mantenimiento y criopreservación de las cepas aisladas .....	35
8.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	36
8.3.1. Fijación de las colonias .....	36
8.3.2. Fijación de las colonias adheridas a los cristales de NaCl .....	36
8.3.3. Fijación de las muestras naturales de cristales de NaCl y CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	37
8.3.4. Obtención de las imágenes al microscopio .....	37
8.4. Aproximación independiente de cultivo .....	38
8.4.1. Extracción de ADN .....	38

8.4.2.	Amplificación de un fragmento del gen 16S rARN para DGGE .....	39
8.4.3.	Electroforesis de Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE) .....	43
8.4.4.	Preparación de soluciones desnaturalizantes.....	43
8.4.5.	Preparación del gel desnaturalizante para el DGGE .....	44
8.4.6.	Formación del gel de DGGE .....	46
8.4.7.	Electroforesis del gel de DGGE .....	47
8.4.8.	Tinción.....	48
8.5.	Análisis del patrón de bandas .....	49
8.6.	Análisis filogenéticos .....	50
8.6.1.	Evaluación, edición y alineamiento de las secuencias .....	50
8.6.2.	Construcción de árboles filogenéticos.....	50
8.6.3.	Depósito de secuencias en GenBank.....	51
9.	Resultados.....	52
9.1.	Sitios de muestreo en ESSA .....	52
9.2.	Características de las cepas de haloarquea obtenidas .....	54
9.3.	Curvas de crecimiento .....	59
9.4.	Identificación filogenética de las cepas .....	61
9.5.	Morfologías celulares .....	64
9.5.1.	Micrografías SEM.....	66
9.6.	Interacción de haloarqueas con los cristales evaporíticos.....	72
9.6.1.	Interacción de las cepas y los cristales formados artificialmente.....	76
9.7.	Análisis de la comunidad natural por la estrategia PCR-Anidado-DGGE .....	77
9.8.	Análisis de la comunidad de arqueas en el área de concentración 9 y 10.....	80
9.9.	Resultados complementarios.....	81
9.9.1.	Análisis de grupos bacterianos halófilos extremos .....	81
9.9.2.	Tabla de cultivos de Rhodovibrio sp. ....	82
9.9.3.	Identificación de una cepa de bacteria fototrófica anoxigénica .....	83
10.	Discusión .....	84
10.1.	Filogenia de arqueas, problemas de identidad .....	86
10.2.	Análisis de la comunidad de arqueas halófilas extremas presentes.....	89
10.3.	Arqueas e interacción con los cristales de sal.....	91
10.4.	Perspectivas para ahondar en el conocimiento de arqueas halófilas extremas ..	92
11.	Conclusiones.....	95
12.	Recomendaciones .....	96
13.	Referencias.....	98
14.	Anexo 1a Elaboración de los medios HEC.....	113
15.	Anexo 2. Historia de vida de los cultivos .....	116
16.	Anexo 3. Estado del arte filogenético del dominio Arquea .....	122

## Lista de abreviaturas

En este texto se utilizarán anglicismos técnicos para su fácil entendimiento debido a que son de uso común en este campo de la ciencia. Los acrónimos, abreviaturas y palabras empleadas serán:

- **PCR** (Polymerase Chain Reaction) que significa reacción en cadena de la polimerasa.
- **GeneBank**, (banco de genes) que se refiere a la base de datos mundial de genes.
- **BLAST** (Basic Logical Alignment Search Tool), que se refiere a la búsqueda de secuencias similares dentro del banco mundial de genes.
- **DGGE**: (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) Electroforesis de gel en gradiente desnaturalizante.
- **ESSA**: Exportadora de Sal. S.A.
- **SHOW**: Square Haloarchaea of Walsby
- **HEC**: Halophilic médium yeast extract casaminoacids
- **OTU**: Operational Taxonomic Unit
- **UPGMA**: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
- **SEM**: Scanning Electron Microscope
- **SW**: Saline Water

## Lista de tablas

**Tabla I.** Se muestran los géneros la familia Halobacteriaceae que han sido aislados de depósitos naturales y artificiales de rocas evaporíticas.

**Tabla II.** a) Programa usado en el termociclador para la obtención de productos. b) Mezcla de reacción usada para la amplificación del fragmento del 16S rADN

**Tabla III.** a) Primer programa utilizado para generar el amplicón largo de PCR. b) Segundo programa utilizado para generar el segundo y último amplicón. c) Mezcla de reacción utilizada en ambos programas para generar los dos productos de PCR.

**Tabla IV.** Reactivos para la preparación de las soluciones de reserva con alta concentración de desnaturalizante (90 % ó 70 %), y con nula presencia de desnaturalizante (0 %). Soluciones utilizadas en la elaboración del gel de DGGE.

**Tabla V.** Reactivos para la preparación de las soluciones con concentración de desnaturalizante que formarán el gradiente en el gel de 30 a 70 % a partir de soluciones de reserva de 0 y 90 % de desnaturalizante; y la solución con 0 % de desnaturalizante, para la zona de carga. Soluciones que formarán el gel de DGGE en el ensamble de vidrios.

**Tabla VI.** Reactivos para la preparación de las soluciones con concentración de desnaturalizante que formarán el gradiente en el gel de 30 a 70 % a partir de soluciones de reserva de 0 y 70 % de desnaturalizante; y la solución con 0 % de desnaturalizante, para la zona de carga. Soluciones que formarán el gel de DGGE en el ensamble de vidrios.

**Tabla VII.** Identificación de los sitios muestreados en ESSA. Se muestran los valores de los parámetros físicos y químicos para cada sitio: pH, temperatura y salinidad. Se han ordenado de manera cronológica para fácil manejo.

**Tabla VIII.** Cepas obtenidas con los medios utilizados en esta investigación

**Tabla IX.** Sitios enriquecidos con el medio DG específico para el género *Chloroflexus*, bajo condiciones de luz-oscuridad de 12 h, a una temperatura de 22-30 °C, sin agitación. El orden de los sitios ha sido colocado de mayor a menor salinidad previamente indicado en la tabla VI.

**Tabla X.** Se muestran los sitios en donde se obtuvieron los cultivos con la jarra de anaerobiosis utilizando el medio DG 16%.

## Lista de figuras

**Figura 1.** Mapa del sitio de estudio. Se puede apreciar toda la planta de producción de sal en Exportadora de Sal, S.A. (ESSA); las áreas de concentración, los vasos cristalizadores y los estanques con salmuera residual denominados amargos. Se pueden observar los dos sitios de muestreo: áreas de concentración 9 y 10 (P9 y P10). En la parte inferior izquierda se encuentra el acercamiento a la zona de los vasos cristalizadores donde se indican los sitios de muestreo: cristalizadores 19 y 20 (C19 y C20). Con las siglas A1B y A5B se indican los amargos muestreados que tienen el mismo nombre logístico en ESSA.

**Figura 2.** Diagrama de flujo de la colecta en campo. Se muestran siglas afuera de los cuadros de texto. BM se refiere al rubro de biología molecular, FQ es para referir a las condiciones físicas y químicas medidas, Micro se representa la metodología de microbiología clásica.

**Figura 3.** Diagrama general de la estrategia de PCR-Anidado y sus productos principales. Se distingue primordialmente que los segundos productos son de un tamaño menor. La flecha discontinúa que se sitúa a lo largo del diagrama explicita que en cada uno de los pasos la secuencia blanco sigue siendo la misma sólo se va reduciendo.

**Figura 4.** Se muestra la salinidad (%) en cada uno de los sitios de muestreo. Los sitios están representados por los valores de salinidad y se leen de izquierda a derecha desde el sitio P9\_2 hasta el sitio A1B\_2. El eje de la izquierda muestra los valores de temperatura (°C), mientras que el de la derecha muestra los valores de pH. Se observa la relación inversamente proporcional de los parámetros salinidad y pH, así como la relación directamente proporcional de la salinidad con respecto a la temperatura.

**Figura 5.** Curvas de valoración fisiológica de crecimiento. (a) Cepa P92B070208-1P. (b) Cepa P102070208-3R. (c) Cepa P102070208-3O. Medidas a una absorbancia de 580 nm, con un tiempo de generación de 0 a 120 horas, cultivadas en medio HEC al 10% (—), 25% (—) y 30% (—).

**Figura 6.** Filograma de secuencias parciales (ca. 1359 pb) del 16S rADN de cepas axénicas aisladas de las áreas de concentración 9 y 10, y del cristalizador 20. Se empleó el método basado en distancias Neighbor Joining. El análisis bootstrap fue de 500 réplicas. Se utilizaron las secuencias de 16S rADN de *E. coli* y *D. mobilis* como grupos externos. Las claves que se encuentran entre paréntesis en cada secuencia son los números de acceso GeneBank; y las secuencias en letra bold pertenecen a las cepas aisladas en este estudio. La barra de la escala representa la substituciones por sitio.

**Figura 7.** Fotografías de morfologías celulares al microscopio de contraste de fases (100X). **A-B**, cepa **P92B070208-1P** *Halogeometricum* sp., se observan rasgos pleomórficos celulares predominantemente cocos y cocobacilos, se agrupan en racimos. **C-D**, cepa **P102070208-3R**, *Halobacterium* sp., también con rasgos pleomórficos pues se distinguen células angulares, pero principalmente bastones y mazos. **E-F**, cepa

**P1020708-3O** *Halobacterium* sp., de la misma forma células pleomórficas, se distinguen entre ellas algunas angulares en forma de triángulo y cuadrado.

**Figura 8.** Micrografías de la cepa P92B070208-1P, obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Las ampliaciones de las micrografías obtenidas van desde 4500X hasta 10,000X. Las claves en las imágenes refieren a las siguientes formas celulares: C, coco; Cu, cuadradas; B, bastón, T, triangulares; M, mazos. La barra amarilla representa una escala de 5  $\mu\text{m}$ .

**Figura 9.** Micrografías de las cepas P92A090908-6O, P92A090908-6P, P102070208-3R y P102070208-3O, obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Las micrografías muestran diferentes ampliaciones que van desde 1900X hasta 7000X. Las claves en las imágenes refieren a las siguientes formas celulares: C, coco; Cu, cuadradas; B, bastón, T, triangulares; R, rectangulares. Las flecha negra indica el diámetro de una célula cuadrada (1.8  $\mu\text{m}$ ). La barra amarilla representa una escala de 20  $\mu\text{m}$ .

**Figura 10.** Micrografías de la cepa C205090908-1R, obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Distinguen formas angulares irregulares y cuadrados; algunos triángulos. Las micrografías tienen diferentes ampliaciones: desde 1400X hasta 8000X. Las claves en las imágenes refieren a las siguientes formas celulares: Irr, angulares irregulares; Cu, cuadradas. La barra amarilla representa una escala de 5  $\mu\text{m}$ .

**Figura 11.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta con Paladio al vacío a 25 mA por 30 segundos 2 veces. Dos cristales evaporíticos del cristizador 19 donde se pueden apreciar formas celulares de bastones, mazos y rectángulos.

**Figura 12.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta con Paladio al vacío a 25 mA durante 30 segundos por 2 ocasiones. Cristales precipitados de la filtración de salmuera en una membrana de 0.45 mm. La muestra proviene del área de concentración 9. Se puede distinguir una forma celular de mazo y una de bastón (círculo rojo), que aparentemente son similares a las observadas previamente en la figura 11 y sugeridas como miembros de arqueas halófilas extremas.

**Figura 13.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta con Paladio al vacío a 25 mA durante 30 segundos en 2 ocasiones. La figura muestra un acercamiento a la pared de un cristal natural de NaCl en forma de pirámide (tolva) colectado en el cristizador 19. En esta pared se distinguen aparentes formas celulares adheridas al cristal (círculos rojos).

**Figura 14.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta únicamente con Paladio al vacío a 25 mA por 30 segundo 2 veces. La micrografía corresponde a una colonia de la cepa P92B070208-1P que se encuentra encima de una tolva. La muestra fue obtenida de una caja petri que contenía colonias axénicas de la cepa, así como cristales que formaron al transcurrir el tiempo (> 30 días).

**Figura 15.** Gel de DGGE (acrilamida-bis-acrilamida 40% [vol/vol] urea-formamida), teñido con nitrato de plata. El gradiente desnaturante fue del 30 al 70% y la electroforesis fue corrida durante 18h a 60°C y 50V. Se muestra la separación de los fragmentos del gen 16S rARN amplificados con dos estrategias: PCR y Nested-PCR con primers universales del dominio arquea [ARC8F/1492R(344F+GC/907R)]. En todos los casos la pareja de primers usada única o últimamente para el gel es la que contiene la pinza de GC. En todos los casos la concentración del amplicón obtenido es 1X. Los carriles se leen de izquierda a derecha. Carril **1**, *Halogeometricum* sp., (Nested-PCR), carril **2**, *Halogeometricum* sp., (PCR); carril **3**, *Halobacterium* sp (cepa roja); carril **4** *Halobacterium* sp (cepa naranja); carril **5**, *Haloarcula* sp.

**Figura 16.** Gel de DGGE (acrilamida-bis-acrilamida 40% [vol/vol] urea-formamida), teñido con nitrato de plata. El gradiente desnaturante fue del 30 al 70% y la electroforesis fue corrida durante 18h a 60°C y 50V. Se muestra la separación de los fragmentos del gen 16S rARN amplificados con la estrategia PCR-anidado (Nested-PCR), a un concentración 1X, con primers universales para el dominio arquea [ARC8F/1492R (344F+GC/907R)]. Muestras naturales y estándares a partir de cultivos (HEC 20%), en condiciones aeróbicas, provenientes de las áreas de concentración 9 y 10, (21% de salinidad). Los carriles se leen de izquierda a derecha, carriles **1**, **6** y **11**, Standard (mezcla de *Halogeometricum* sp., y *Halobacterium* sp.). Carriles **2** y **3**, muestra natural salmuera P9\_2; carriles **4** y **5** muestra natural salmuera P9\_5; carriles **7** y **8**, muestra natural salmuera P10\_2; carriles **9** y **10**, muestra natural salmuera P10\_5.

**Figura 17.** Análisis de grupos por Gel Comprar II. Se muestra el análisis de cluster UPGMA (por sus siglas en inglés, Unweighted Pair Group Method Arithmetic mean), en donde se puede observar que el índice de similitud es más alto en el cluster del área de concentración 9 con respecto al área de concentración 10.

**Figura 18.** Filograma de secuencias parciales (ca. 734 pb) del 16S rADN de la cepa axénicas P95090908-1W, aislada del área de concentración 9. Se empleó el método basado en distancias Neighbor Joining. El análisis bootstrap fue de 500 réplicas. Se utilizaron las secuencias del 16S rADN de *E. coli* y *D. mobilis* como grupo externo. La barra de la escala representa la substituciones por sitio.

## **1. Introducción**

Los microorganismos son componentes de todos los sistemas ecológicos que están integrados en la biósfera. En algún momento, fueron los únicos habitantes del planeta, por esta razón se les considera (bajo el concepto de *Ecosistema* de Arthur Tansley, 1935, citado en Guerrero *et al.*, 2002) fundadores de los ecosistemas.

### **1.1. Ambientes hipersalinos extremos**

Los ambientes hipersalinos están distribuidos globalmente y son muy estudiados en biogeoquímica (Spear *et al.*, 2003). Su importancia radica en que han existido desde tiempos precámbricos, poseen poblaciones microbianas particularmente especializadas en prosperar bajo condiciones de alta salinidad, brindan información biogeológica sobre las condiciones iniciales de la vida en el planeta, y sus pobladores son fuente potencial de moléculas nuevas con aplicación biotecnológica (Moracci *et al.*, 2007).

La península de Baja California se caracteriza por sus altos valores de incidencia de radiación solar, circunstancia que propicia la existencia de grandes extensiones con minerales que resultan de la evaporación del agua de mar (Shumilin *et al.*, 2002), denominados evaporitas, como es el caso del yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), la calcita o anhidrita ( $\text{CaSO}_4$ ) y la halita ( $\text{NaCl}$ ). Estos sitios, representados por planicies de minerales evaporíticos, canales de marea, lagunas costeras y manantiales termales (López-Cortés, 1998), representan un ambiente en el cual, relativamente pocos grupos taxonómicos han sido capaces de adaptarse y prosperar. Desde el punto de vista antropocéntrico son considerados como lugares inhóspitos y están en la clasificación de ambientes extremos (Horikoshi, 2007).

## 1.2. Halofilismo

No obstante del estrés que genera las altas salinidades se han reportado una gran diversidad de microorganismos que pueden proliferar en asociación con los minerales evaporíticos y los óxidos de metales de las salineras (Canfield *et al.*, 2004). Cada asociación difiere metabólicamente y mantiene una función ecológica particular con respecto al ambiente (Des Marais, 2003). Esto refiere que a través del tiempo, sólo algunos grupos se han especializado de tal forma que únicamente éstos han podido ser exitosos en cada ambiente hipersalino (Des Marais *et al.*, 1997; Oren, 2000). Por otro lado, si se examinan las clasificaciones convencionales de halofilismo (el mínimo de concentración de sal requerida para el crecimiento, la salinidad óptima y el límite de concentración de sal tolerado) dentro del mundo microbiano, se muestra un continuo de propiedades, que hacen un constructo sin posibilidad de establecer límites de halofilismo. Generalmente, el requerimiento mínimo y el máximo dependen del medio que se establezca para aislar los organismos (Oren, 2008). No obstante, se distinguen las siguientes categorías: *halófilos extremos* (crecen mejor en medios que contienen 2.5-5.2 M de sales totales), *halófilos extremos en el límite* (crecen mejor en medios que contienen 1.5-4.0 M de sales totales), *halófilos moderados* (crecen mejor en medio que contienen 0.5-2.5 M de sales totales) (Kushner, 1978 citado en Ventosa *et al.*, 1998). Asimismo, un microorganismo *halotolerante* es el que no muestra un absoluto requerimiento de sal para crecer pero que se desarrolla bien en alta salinidades. Oren (2008), propone utilizar un método operativo más simplificado para definir *halofilismo*: microorganismos que crecen óptimamente a concentraciones de sales totales de 50 g/L (0.85 M NaCl) o mayores y toleran al menos 100 g/L de sales totales (1.7 M NaCl).

Las arqueas halófilas extremas (ejemplo, *Halobacterium salinarum*) y halotolerantes (ejemplo, *Haloadaptatus paucihalophilus*) usan energía para excluir los iones de sodio, mantener una equimolaridad osmótica con el exterior y mantener la conformación adecuada de su maquinaria enzimática y de otras proteínas (Oren, 2008). Muchas proteínas purificadas de haloarqueas se desnaturalizan cuando se someten a bajas concentraciones de salinidad (Oren, 2008). Debido a esto, los halófilos emplean dos diferentes estrategias para prevenir la desecación. Ambas estrategias trabajan incrementando la osmolaridad interna de la célula (Kletzin, 2007): La primera, que es también empleada por la mayoría de las bacterias, levaduras, algas y hongos halófilos, es que ciertos compuestos orgánicos son acumulados en el citoplasma (mejor conocidos como solutos compatibles); estos pueden ser sintetizados de nuevo u obtenidos desde el ambiente. No todos los grupos de halófilos han sido todavía examinados para buscar la ocurrencia y distribución de solutos orgánicos. Sin embargo, se tiene un panorama completo de la distribución de solutos orgánicos en muchos de los grupos halofílicos (Oren, 2008). Dentro del dominio Arquea, los más conocidos incluyen además de glicina, betaína, y ectoína (Mancinelli, 2005) (los cuales también están distribuidos en otros dominios)  $\beta$ -aminoácidos ( $\beta$ -glutamato,  $\beta$ -glutamina, N $\epsilon$ -acetyl- $\beta$ -lisina); 2-Sulfotrehalosa ha sido detectada en algunos miembros alcalifílicos del orden Halobacteriaceae, y se acumula en concentraciones substanciales (> 1 M) (Des Marais *et al.*, 1997).

La segunda y más radical adaptación incluye el influjo selectivo de iones de potasio ( $K^+$ ) y sodio ( $Na^+$ ) (Mancinelli, 2005), que son acumulados en el citosol en concentraciones osmóticamente equivalentes al medio externo (ejemplo 4.2 M KCl + 1 M NaCl) (Kletzin, 2007), y que sirven como el principal soluto. Esta adaptación está

restringida a las bacterias halófilas moderadas del orden de las Halanaerobiales, a las arqueas halófilas extremas de la familia Halobacteriaceae y a las bacterias halófilas extremas (*Salinibacter ruber*). La presencia de esta adaptación en los tres linajes evolutivos, sugiere una evolución convergente vía transferencia horizontal de genes y que sólo se ha retenido en algunos grupos (Villeoux *et al.*, 2007). Si bien los organismos halófilos extremos acumulan concentraciones multimolares de sal en su citosol para balancear las altas presiones osmóticas ambientales, sus proteomas han sido adaptados también para permitir la propia estabilidad y función en altas concentraciones de sal. Superficies ácidas, sitios específicos de unión iónica y múltiples puentes de sal han sido observados en las siete estructuras proteicas resueltas hasta la fecha (Vellieux *et al.*, 2007; Oren, 2008). Asimismo, estudios han mostrado que en la presencia de sales de potasio ( $K^+$ ), la dinámica de las proteínas de arqueas halófilas permite no sólo la estabilidad a temperaturas fisiológicas sino también la apropiada flexibilidad a favor de la actividad biológica (Vellieux *et al.*, 2007).

Mancinelli (2005) refiere que los halófilos pueden prosperar en los siguientes ambientes: lagos carbonatados, lagos hipersalinos polares, lagos hipersalinos calientes, salineras naturales y artificiales, suelos hipersalinos, salmueras de fondos marinos y ventilas hidrotermales.

### **1.3. La diversidad microbiológica en ambientes hipersalinos**

Existe un gran número de estudios tradicionales en la ecología de las salineras, al punto en donde éstas pueden ser interesantes modelos de sistemas para la investigación de la influencia de la salinidad en la diversidad microbiana y la productividad (Joint *et al.*, 2002) por las variaciones inducidas por un factor ambiental (Pedrós-Alió *et al.*, 2000). Algunos estudios han mostrado que ocurren cambios ecológicos importantes en el

gradiente de salinidad, con respecto del decremento de la biodiversidad, el incremento de la salinidad y la dominancia de ciertos grupos de organismos (Rodríguez-Valera, 1988; Javor, 1989; Ventosa *et al.*, 1998). Se ha reconocido que la diversidad microbiológica y la distribución de los grupos funcionales tienen un papel preponderante en el análisis ecológico de comunidades microbianas, la complejidad funcional que se ha detectado en estos ambientes comprende diatomeas, cianobacterias, bacterias verdes no sulfurosas, bacterias púrpuras sulfurosas, bacterias organotróficas, arqueas metanogénicas, arqueas halófilas extremas, bacterias sulfato reductoras, bacterias del grupo Citófaga/Flavobacterium/Bacteroides, entre otros grupos funcionales (Des Marais, 2003; Spear *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2006). Así también, el estudio de estos ecosistemas microbianos brinda información geomicrobiológica del presente y de los registros geológicos del pasado (Canfield *et al.*, 2004). Dado esto, el estudio de la microbiota de los ambientes hipersalinos cercanos a la saturación ha sido estudiada con aproximaciones polifásicas, tanto por métodos dependientes como independientes de cultivo (Burns *et al.*, 2004).

#### **1.4. Minerales evaporíticos como hábitat**

Los microorganismos han dejado evidencia significativa de su presencia y actividad en sedimentos. A la fecha, se ha empezado a apreciar la íntima yuxtaposición e interdependencia de los minerales y los microbios (Guerrero *et al.*, 2002). También está bien reconocido que la muy distribuida ocurrencia de microorganismos en sedimentos de ambientes hipersalinos contribuye a la inmovilización de algunos metales (Guerrero *et al.*, 2002).

Las poblaciones microbianas pueden facilitar la nucleación y el crecimiento de distintos minerales (Guerrero *et al.*, 2002). La precipitación mineral puede estar promovida por

los cambios en las condiciones químicas microambientales y así, el estado de saturación es causado por procesos metabólicos microbianos. Las células microbianas promueven la adhesión de sedimentos por incorporar selectivamente partículas minerales. Tal incorporación preferencial de agua mineral con arqueas y/o bacterias pueden crear un marco guía de precipitación para la construcción de estructuras organosedimentarias. Se ha sugerido que las formas celulares sirven como templados para crear las formas minerales (Guerrero *et al.*, 2002). En los vasos cristalizadores donde hay una concentración de NaCl superior al 20% (w/v) las haloarqueas llegan a ser las poblaciones dominantes de microorganismos (Benlloch *et al.*, 1996). Se presentan en densidades tales que pueden causar que las salmueras se viren rojizas o violáceas debido a sus pigmentos carotenoides los cuales protegen la célula de los efectos dañinos ultravioleta (McGenity *et al.*, 2000). Estos microorganismos causan que las charcas alcancen altas temperaturas, acelerando la tasa de evaporación (Javor, 1989). Cuando el NaCl empieza a precipitar muchas haloarqueas llegan a ser atrapadas dentro de las inclusiones fluídas (McGenity *et al.*, 2000). Se ha sugerido que la presencia de haloarqueas acelera la formación de cristales y promueve inclusiones fluídas más grandes (Norton y Grant, 1988 citado en McGenity *et al.*, 2000). López-Cortés *et al.*, (1994) muestran el efecto de la cepa SP8807 de *Haloarcula* sp., sobre la formación de cristales cúbicos más grandes con respecto a una solución control de NaCl. La formación de un gran número de cristales cúbicos en la presencia de haloarqueas sugiere que las células sirven como templados para la formación de halita. Sin embargo los autores sugieren también que la formación de cristales dendríticos en presencia de la cepa es atribuida a los componentes proteicos de la capa S celular de las haloarqueas (López-Cortés *et al.*, 1994)

En las instalaciones de la compañía Exportadora de Sal, se presentan depósitos de sal, que surgen de la evaporación y que contienen halita, calcita, yeso o una mezcla. Estos son minerales denominados *evaporitas* y se desarrollan por cristalización de la salmuera en al menos 30 g/L de concentración de NaCl. Durante la evaporación de agua de mar, ocurre la precipitación secuencial de carbonato de calcio y sulfato de calcio dejando la salmuera cargada de cloruro de sodio. Más adelante, el NaCl precipita como halita y se desarrolla salmuera densa de cloruro de magnesio, el cual propicia un ambiente hostil para la vida (Antón *et al.*, 1999). Las evaporitas se definen como los minerales precipitados de una solución como resultante de la evaporación del agua que ocurre tanto en sistemas thalassohalinos (marino) como athalassohalinos (no marino). En ambientes marinos, las salmueras y la formación de evaporitas pueden presentarse en la zona intermareal, supramareal y lagunas donde el flujo alimentador provenga directamente del mar, así como de lagos y estanques marginales alimentados por percolación a través de barreras naturales o artificiales (Javor, 1989). Las evaporitas constituyen el 2% de todos los sedimentos en las plataformas de los continentes. Se han registrado depósitos de evaporita formados en el Precámbrico (3500 millones de años). Al interior de una evaporita, la expansiva presión del cristal que crece dentro de los depósitos puede romper la corteza de “plato” que se forma en la superficie, y crear figuras como “teepees” (Spear *et al.*, 2003), las cuales se pueden extender varios centímetros por encima de la salmuera. Los teepees formados de yeso son porosos, y esa porosidad determina la naturaleza del interior de la evaporita (endoevaporita). El aire, el agua y la luz brindan el potencial de colonización de arqueas y/o bacterias a la endoevaporita (Benison *et al.*, 2008). Dependiendo de los cristales presentes (halita o yeso), la radiación solar presente está fuertemente atenuada por el cristal translúcido.

Esto crea diferentes zonas de luz filtrada donde distintas comunidades microbianas pueden residir (Oren *et al.*, 1995). Las comunidades fotosintéticas que contienen distintas capas horizontales de fotótrofos oxigénicos y anoxigénicos frecuentemente cubren el fondo de las charcas hipersalinas usadas para la producción de sal de mar. La apariencia física de estas comunidades microbianas varía de acuerdo a la concentración de sal (Sørensen *et al.*, 2005).

### **1.5. Estudios polifásicos para describir diversidad de arqueas**

La taxonomía polifásica se refiere a una taxonomía que asemeja y asimila varios niveles de información, desde lo molecular hasta lo ecológico e incorpora varias porciones distintas y separadas de información para alcanzar una taxonomía multidimensional. En sí comprende las áreas de clasificación, nomenclatura e identificación y refleja filogenia y evolución. La caracterización ha cambiado de procedimientos simples (aspectos morfológicos y fisiológicos) a una aproximación multidisciplinaria usando, técnicas fenotípicas, genotípicas y quimiotaxonómicas (Gillis *et al.*, 2001).

#### **1.5.1. Herramientas moleculares**

En los últimos diez años se han intensificado los trabajos de filogenia y diversidad en las salineras alrededor del mundo. Un claro ejemplo fue el proyecto de la unión Europea MIDAS (MICROBIAL Diversity in Aquatic Systems), el cual se llevó a cabo en la salineras de Santa Pola en Alicante, España. En donde universidades de distintos países pasaron dos semanas estudiando la salinera. El objetivo principal fue determinar la diversidad de los microorganismos a lo largo de un gradiente usando las diferentes técnicas convencionales y moleculares al alcance (Pedrós-Alió, 2005). Los análisis comparativos de marcadores moleculares filogenéticos, permiten ahora la reconstrucción de filogenias

de organismos de todos los dominios (Ludwig y Schleifer, 1994). En comparación con el nivel fenotípico de evolución hay un número mucho mayor de caracteres definibles y confiables a nivel molecular y genotípico. Debido a eso, las estructuras moleculares y sus secuencias generalmente revelan más evidencia de las relaciones evolutivas que los enfoques fenotípicos (Woese, *et al.*, 1990), especialmente en el caso de microorganismos. Por ejemplo, Nübel *et al.*, (2000), ha observado que la salinidad gobierna la distribución de las cianobacterias y diatomeas dentro de un mismo sistema salino. Hoy día se reconoce a la secuenciación del 16S rARN como la aproximación más confiable para la determinación de las relaciones filogenéticas. Así, a la fecha se han encontrado miembros halófilos (bajo la clasificación de Oren, 2008) pertenecientes a los tres dominios: Arquea, Bacteria, y Eucaria (Oren *et al.*, 1995; Nübel *et al.*, 2000; Spear *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2005; Vellieux *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2008; Oren, 2008).

Además del 16S rARN, también se han usado otros marcadores moleculares filogenéticos: tARN, rpoC1, dominios THT, gyrB, ITS, 23S (Ludwig y Schleifer, 1994; Palenik, 1994; Aravind y Koonin, 1999; Benlloch *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Sun y Caetano-Anollés, 2008)

Puesto que los genes del 16S rARN están más conservados en estructura y función que muchos genes que codifican a proteínas, y consecuentemente con secuencias idénticas, pueden condensar varias poblaciones fisiológica y ecológicamente diferentes. El análisis de la secuencia de los genes que codifican la subunidad pequeña del ARN ribosomal (16S rARN), es actualmente el acercamiento más prometedor para la clasificación filogenética en los dominios bacteria y archea (García-Pichel *et al.*, 2001). Los genes del 16S rARN bacterianos pueden ser clonados de poblaciones naturales y sus

secuencias son usadas para identificar los miembros de la población de determinado ambiente sin la necesidad de cultivar los microorganismos (Field *et al.*, 1997). Con ayuda de oligonucleótidos que transcriben para genes de rARN ha sido posible recuperar información de una gran cantidad de hábitats.

### **1.5.2. Estudios basados en aislamiento de cepas**

Si bien la secuenciación del 16S rADN de muestras ambientales ha probado ser una poderosa y muy confiable herramienta en términos de la identificación de grupos microbianos, y de la estimación de su significancia en el ambiente también es cierto que los métodos tradicionales de cultivo han sido considerados menos útiles, pues en muchos casos los grupos dominantes no se reflejan con estos métodos.

Recientemente este panorama ha cambiado con mejorías dramáticas en los métodos de cultivo de las especies dominantes en algunos ambientes (Ochsenreiter *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2004), proveyendo un considerable optimismo en que los organismos identificados por acercamientos ecológico-moleculares pueden también ser estudiados en cultivos de laboratorio.

## **1.6. Arqueas halófilas extremas**

### **1.6.1. Características generales, modelos importantes de estudio**

El dominio Arquea está claramente reconocido como un único e interesante grupo de organismos por muchas razones importantes (Cavicchioli, 2007). Sus miembros tienen características moleculares distintas que los distinguen de los dominios Bacteria y Eucaria. Particularmente poseen un esqueleto de membrana formado de glicerol-fosfato, enlaces éter y cadenas isoprenoides (Koga y Morii, 2007). Algunos estudios han resaltado el papel fundamental de ellas en la formación de la vida como la conocemos;

muchas arqueas son extremófilas, y por eso son causantes de que se hayan reescrito los libros de texto con respecto al grado que un organismo puede tolerar o incluso prosperar (Cavicchioli, 2007) en un ambiente. Fenotípicamente son muy parecidas a las bacterias: La mayoría son pequeñas (0.5-5 micras) y con formas de bastones, cocos, espirilos, triángulos, cuadrados, rectángulos y mazos. Se duplican por fisión, fragmentación y gemación, y sus genomas son de alrededor de 2-4 Mpb. Las haloarqueas son la familia con mayor número de géneros y se les denota el sufijo “halo” para referir a sus altas demandas de sales totales. Son organismos que en el pasado se les distinguía comúnmente como halobacteria, pero a la fecha se les reconoce como haloarquea (Das Sarma y Das Sarma, 2008). Los miembros de la familia Halobacteriaceae comprenden la mayoría de las poblaciones microbianas en los ambientes hipersalinos (Grant *et al.*, 2001). Existen 27 géneros reconocidos en la familia Halobacterium, que es la única que se distingue claramente del dominio por poseer los únicos miembros halófilos. Aun así se debe de distinguir que existen también miembros halófilos en otras familias, como el género halófilo extremo *Methanohalobium*, que crece rápidamente a 3M de NaCl (Zhilina y Zavarzin, 1990). La familia se distingue inequívocamente de otros miembros halófilos por sus características de tornar rojiza o violácea la salmuera de los ambientes donde crecen masivamente. Esta coloración proviene de los carotenoides, principalmente los C50 denominados bacteriorruberas y también de carotenoides retinales implicados en el metabolismo energético que se acoplan a la bacteriorrodopsina (Madigan *et al.*, 2004). Sin embargo, la característica más conspicua es su absoluto requerimiento de altas concentraciones de NaCl. Algunos géneros pueden crecer a bajas concentraciones como la especie *Haloadaptatus paucihalophilus* (Savage

*et al.*, 2007), que crece a una concentración mínima de 0.8 M NaCl, y el género *Halosarcina pallida* que crece a 1.3 M NaCl (Savage *et al.*, 2008).

La alta concentración de NaCl en su ambiente limita la disponibilidad de oxígeno, aún así se reporta que son aerobios o anaerobios facultativos. Su metabolismo es quimioorganotrofo, usan aminoácidos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía (Grant *et al.*, 2001). Pueden fermentar carbohidratos por vía anaerobia unida a una reducción de nitrato y fumarato (Madigan *et al.*, 2004). En condiciones de baja aireación, las haloarqueas realizan un metabolismo energético basado en la translocación de protones hacia el exterior de la superficie de la membrana, produciéndose una fuerza motriz que dirige la actividad de la ATPasa. Este mecanismo ocurre mediante la transformación de la forma *trans* a *cis* de una molecular retinal de origen carotenoide la cual puede absorber luz y catalizar la génesis de una fuerza motriz de protones. Esta molécula está acoplada a la bacteriorrodopsina, molécula denominada así por su similitud estructural y funcional con el pigmento visual rodopsina y que se encuentra insertada a través de la membrana. La bacteriorrodopsina absorbe luz en la región del verde del espectro alrededor de 570 nm y esto produce la transformación del retinal y la posterior translocación de protones.

Debido a su organización celular similar a la de las bacterias, las arqueas fueron clasificadas erróneamente hasta que la comparación de sus marcadores moleculares revelaron que ellas forman un distinto dominio fundamental de la vida (Kletzin, 2007). Hasta el momento se sabe que los miembros del dominio Arquea comparten algunas características bioquímicas con el dominio Bacteria y otras con el dominio Eucaria. Se sabe por ejemplo, que a pesar de su organización del cromosoma similar a la de las

bacterias (secuencias Shine-Dalgarno en el mRNA, genes ensamblados en operones, un solo origen de replicación bidireccional), sus proteínas estructurales son más similares a las de los eucariotas (Matte-Tailleux *et al.*, 2002).

Asimismo, estudios evolutivos han subrayado el papel fundamental de las arqueas en la evolución de la vida en la tierra. Como ejemplo, Yutin *et al.*, (2008), señalan que el escenario más parsimonioso de la eucariogénesis es que la primera célula eucariote fue una quimera arquea-bacteria, pues los genes que codifican a proteínas involucradas en el proceso de la información (replicación, transcripción, traducción y reparación) son homólogos entre eucariotas y arqueas; asimismo muchas de las enzimas principales de la biogénesis de la membrana son homólogas entre eucariotas y bacterias. Así, ellos establecen un escenario de eucariogénesis en donde un arqueón es invadido por una  $\alpha$ -proteobacteria (el ya bien establecido ancestro de la mitocondria).

### **1.6.2. Potencial biotecnológico de las arqueas halófilas extremas**

La investigación de arqueas ha generado resultados impresionantes después de casi 30 años de haber sido reconocidas como un dominio independiente. Principalmente la investigación se ha enfocado en la descripción de nuevos organismos, la búsqueda de sus miembros en hábitats extremos y la determinación de sus procesos celulares fundamentales. Sin embargo, debido a sus particularidades fisiológicas ya antes mencionadas, la investigación también ha alcanzado los terrenos de la investigación biotecnológica al punto en que un número amplio de compañías alrededor del mundo explotan las bondades que ofrecen las arqueas para la industria en la producción de enzimas, biopolímeros, adhesivos y resinas; biochips, sensores de luz y holografía,

estabilizadores y termoprotectantes y para ser utilizadas en biorremediación (arqueas metanógenas y metilotróficas) (Moracci *et al.*, 2007).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Estudios de arqueas en ambientes hipersalinos

Un amplio rango de taxas ha sido aislado de depósitos naturales y artificiales de minerales evaporíticos de yeso, anhidrita y halita, incluyendo miembros de los siguientes géneros mostrados en la tabla I. Sin embargo, estudios de conteos viables han sido pequeños cuando se comparan con los estudios de conteos totales, y la significancia numérica de de estos estudios nunca es clara. Sólo recientemente ha sido posible la determinación de identidades y abundancias relativas de los organismos en las poblaciones naturales. Típicamente usando estrategias basadas en la señal de la subunidad pequeña del ribosomal 16S. Si bien, pocos estudios de comparación entre estrategias basadas en métodos de cultivo e independientes de cultivo han sido desarrollados, éstos sugieren que algunos de los géneros más ampliamente descritos pueden de hecho no ser taxas significativos en la comunidad *in situ*. Estos resultados se han presentado en el caso del género *Haloarcula*, el cual se estima figura en menos de 0.1% en la comunidad *in situ*, pero comúnmente aparece en estudios de aislamiento (Burns *et al.*, 2004)

**Tabla I.** Se muestran los géneros la familia Halobacteriaceae que han sido aislados de depósitos naturales y artificiales de minerales evaporíticos.

Genero	Autor
<i>Haladaptatus</i>	Savage <i>et al.</i> , (2007)
<i>Halalkalicoccus</i>	Xue <i>et al.</i> , (2005)
<i>Haloalcalophilium</i>	Oren y Ventosa, (2000)
<i>Haloarcula</i>	Torreblanca <i>et al.</i> , (1978)*
<i>Halobacterium</i>	Elazari-Volcani <i>et al.</i> , (1957)*
<i>Halobaculum</i>	Oren <i>et al.</i> , (1995)
<i>Halobiforma</i>	Hezayen <i>et al.</i> , (2002)
<i>Halococcus</i>	Schoop, (1935)*
<i>Haloferax</i>	Torreblanca <i>et al.</i> , (1986)*

---

<i>Halogeometricum</i>	Montalvo-Rodriguez <i>et al.</i> , (1998)
<i>Halomicrobium</i>	Oren <i>et al.</i> , (2002)
<i>Halopiger</i>	Gutiérrez <i>et al.</i> , (2007)
<i>Haloplanus</i>	Bar-David <i>et al.</i> , (2007)
<i>Haloquadra</i>	Burns <i>et al.</i> , (2004b)
<i>Halorhabdus</i>	Waino <i>et al.</i> , (2000)
<i>Halorubrum</i>	McGenity y Grant, (1996)*
<i>Halosarcina</i>	Savage <i>et al.</i> , (2008)
<i>Halosimplex</i>	Vreeland <i>et al.</i> , (2002)
<i>Haloterrigena</i>	Ventosa <i>et al.</i> , (1987)*
<i>Halovivax</i>	Castillo <i>et al.</i> , (2006)
<i>Natrialba</i>	Kamekura y Dyll-Smith, (1996)
<i>Natrinema</i>	McGenity <i>et al.</i> , (1998)*
<i>Natronobacterium</i>	Tindall <i>et al.</i> , (1984)
<i>Natronococcus</i>	Tindall <i>et al.</i> , (1984)
<i>Natronolimnobius</i>	Itoh <i>et al.</i> , (2005)
<i>Natronomonas</i>	Kamekura <i>et al.</i> , (1997)
<i>Natronorubrum</i>	Xu <i>et al.</i> , (1999)

---

\* Citado en Grant *et al.*, (2001).

## 2.2 Estudios microbianos en Exportadora de Sal, S.A. (ESSA)

En el pasado, la mayoría de los esfuerzos de investigación en ESSA se enfocaron en la geoquímica, biogeoquímica (Javor, 1989; Canfield y Des Marais, 1993; Des Marais, 1995; Shumilin *et al.*, 2002, Bebout *et al.*, 2002; Des Marais, 2003), y en la descripción de la diversidad filogenética de algunas especies microbianas que son muy representativas de los tapetes microbianos. Sin embargo el dominio Arquea ha recibido poca atención. Sólo algunos trabajos han enfocado sus esfuerzos en la descripción de las especies presentes (Javor *et al.*, 1982; Stoeckenius, 1981; Jahnke *et al.*, 2008 y Orphan *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se sabe que en las áreas de concentración 1, 2, 3 y parte del área 4, las cuales tiene un rango de salinidad de 4 a 6.5%, los fondos de las charcas están

dominados por pasto marino *Ruppia sp.*, y la alga verde *Enteromorpha sp.*, también se detecta la presencia de tapetes delgados, poco desarrollados que están dominados por los géneros de diatomeas *Naviculun sp.*, *Grammatophora sp.*, *Striatella sp.* y *Licmophora sp.*, así como por el género de cianobacteria *Entophysalis sp.* Asimismo, en las áreas de concentración 4, 5, 6, 7, y 8, que mantienen un rango de salinidad que va de 6.5 a 25%, se encuentran tapetes bien desarrollados y permanentemente sumergidos, los cuales están –en los rangos de 6.5 a 10% de salinidad- están dominados por cianobacterias filamentosas, tales como *Microcoleus spp.*, y *Oscillatoria spp.*; y, en los rangos de salinidad arriba de 9% la ocurrencia de la cianobacteria unicelular *Synechococcus sp* se vuelve más abundante. Sin embargo, para el rango que va desde 9 hasta 20% *Aphanothece halophytica* es la dominante también como el alga verde *Dunaliella sp.* (Des Marais, 1995; Omoregie *et al.*, 2004). Asimismo, basado en técnicas independientes de cultivo, se ha descrito la presencia del género *Chloflexus sp.*, en los tapetes microbianos de las áreas de concentración 4, 5, 6 y 7 (Nübel *et al.*, 2001); Más tarde Ley *et al.*, (2006), hallaron que la dominancia de microorganismos en los tapetes microbianos está representada principalmente por las divisiones filogenéticas *Chloroflexi*, *Spirochaeta*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* y así como *Cianobacteria* que sólo ocurre en la zona óxica.

En el caso del área de concentración 9 donde ocurre la presencia de evaporitas de yeso y anhídrita un estudio (Spear *et al.*, 2003) describió la diversidad microbiana de las tres capas de la evaporita. Se halló que las divisiones filogenéticas *Rhodothermus* y *Salinibacter* dominan en las tres capas: amarilla (45% del total de las secuencias), verde (22% del total de las secuencias) y rosa (34% del total de las secuencias); *Cianobacteria*, de los órdenes *Chrococales* y *Halothece*, tiene presencia importante en dos capas: 23%

en la capa amarilla y 22% en la verde. Finalmente, la subdivisión *Rhodobacter* del filo alfa-proteobacteria tiene una dominancia del 15% en la capa rosa, 14% en la verde y 7% en la rosa. *Desulfobacter* de la división delta-proteobacteria tiene una presencia importante en la capa rosa (19%). No obstante, esta investigación no reporta presencia del dominio arquea.

### **2.2.1. Estudios de diversidad de organismos del dominio Arquea en ESSA.**

En cuanto a los estudios realizados para organismos del dominio Arquea, a la fecha existen sólo tres estudios. Los dos primeros y más recientes, son de las investigadoras Jahnke *et al.*, (2008) y Orphan *et al.*, (2008). En el primer trabajo se describió, mediante el análisis filogenético y de biomarcadores lipídicos, la diversidad de arqueas en cada capas del tapete microbiano del área de concentración 4 (~7% salinidad). En la capa óxica dominada principalmente por *Microcoleus chthonoplastes* se recuperaron clonas de organismos de los órdenes Halobacteriales ( $\geq 80\%$ ), -sorprendentemente algunos miembros del género *Natronomonas*- y de la familia Thermoplasmatales –en menor proporción-, así como organismos del filo Crenarchaeota (poco representados); de la capa en transición (óxica-anóxica), se detectó la presencia de Thermoplasmatales (~80%), Crenarchaeota y Halobacteriales, más la presencia de los géneros *Methanlobus* y *Haloarcula*, ambos en muy baja proporción; en las siguientes 6 capas de la zona anóxica los órdenes más representativos son Thermoplasmatales en primer lugar y organismos del filo Crenarchaeota en segundo, así como el género *Methanlobus* en tercero. Este conocimiento sugiere que los tapetes microbianos son una fuente activa de metanogénesis. Los biomarcadores lipídicos detectaron la presencia de los géneros *Halococcus*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Methanococcoides*, algunos

metilotróficos-metanógenos (*Methanlobus* spp., *Methanohalophilus* spp., *Methanococoides* spp.). Asimismo, la presencia de los ácidos grasos Archaeol y Caldarchaeol en las zonas más anóxicas corrobora la presencia del orden Thermoplasmatales y del filo Crenarchaeota

El segundo trabajo, de Orphan *et al.*, (2008). El estudio estuvo basado en medir las elevadas concentraciones de metano e hidrógeno utilizando núcleos extraídos del tapete microbiano del área de concentración 4. Se incubaron durante 30 días, las partes superior -en condiciones ricas en trimetilamina- y la parte inferior -en un sistema rico en hidrógeno-. Posteriormente, se identificaron filogenéticamente y por análisis de lípidos las arqueas metanógenas para establecer su distribución espacial en el tapete. Se encontraron diversos miembros del orden metilotrófico Methanosarcinales, con alguna evidencia de estratificación a lo largo del tapete. El mayor crecimiento metanogénico fue encontrado en la parte superior del tapete con la presencia de los grupos metilotróficos metanógenos dominantes en el siguiente orden: *Methanlobus*, *Methanohalophilus* y *Methanococoides*.

El tercero es una descripción de Javor *et al.*, (1982). En esta investigación se aísla y describe una cepa que presenta células con forma de cuadrados y cajas, así como otras formas angulares irregulares similares al grupo SHOW (Square Haloarchaea of Walsby). Proponen nombrar a esta cepa de arquea halófila extrema: *Haloarcula californiae*. Sin embargo, la descripción no alcanza los estándares científicos para ser registrada con ese nombre.

### 3. Justificación

Las comunidades de arqueas halófilas extremas que prosperan en ESSA, Baja California Sur, son modelos ideales para la investigación de ciertas funciones ecológicas como crecimiento, estructura, función y dinámica de poblaciones. Algunos estudios sobre el papel que desempeñan las comunidades de arqueas de los ambientes halófilos extremos sugieren un desempeño crucial en la formación y producción de cristales de cloruro de sodio, así como de la movilización de otros elementos no requeridos en la producción de NaCl (López-Cortes *et al.*, 1994; Des Marais, 1995; Benison *et al.*, 2008). Esto tiene importancia económica y ecológica para justificar su estudio. Por ello, es necesario el continuo de investigación sobre biodiversidad. Igualmente, dada su condición de extremófilas se convierten en una fuente potencial de nuevas moléculas de interés biotecnológico, procesos biológicos no descritos y productos de interés público. Por todo lo anterior, en este estudio se logró contribuir al conocimiento de la diversidad de arqueas cultivables de este sitio por medio de una aproximación polifásica, que abarcó tanto la apreciación de poblaciones de arqueas tanto cultivables como no cultivables.

#### **4. Meta**

El propósito de este trabajo es describir y relacionar filogenéticamente la composición de poblaciones de arqueas halófilas extremas cultivables, en el ambiente hipersalino, que conforma la salinera Exportadora de Sal, S. A., Guerrero Negro, Baja California Sur, México. Se ha utilizado como modelo de estudio minerales evaporíticos del sustrato y la salmuera, de las áreas de concentración y los vasos cristalizadores. La aproximación polifásica que integró aislamiento de muestras ambientales, microscopía de contraste de fases, microscopía electrónica y secuenciación del ADN que codifica para el 16S rARN para el análisis filogenético; de igual forma se analizó la comunidad total por una aproximación independiente de cultivo que integra la amplificación de ADN -de muestras ambientales- que codifica para un fragmento del 16S rARN y posterior separación de productos en un gel de electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE) para su posterior análisis estadístico.

## 5. Hipótesis

En diferentes salineras alrededor del mundo se ha reconocido que la diversidad microbiana disminuye con el incremento de la concentración de sales totales de las salmueras (Pedrós-Alió *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2004; Pedrós-Alió *et al.*, 2000; Maturrano *et al.*, 2006), se espera entonces que la comunidad de arqueas halófilas extremas será distinta en los diferentes estanques muestreados de Exportadora de Sal, S.A. Se detectará una mayor riqueza de especies en las áreas de concentración 9 y 10 con respecto de los vasos cristalizadores 19 y 20.

## 6. Objetivo

El objetivo principal es el estudio filogenético de la comunidad de arqueas halófilas extremas cultivables en las áreas de concentración 9 y 10 y en los vasos cristalizadores 19 y 20 de Exportadora de Sal, S.A., Guerrero Negro.

### 6.1 Objetivos particulares

A partir del objetivo principal, se derivaron los siguientes objetivos particulares que se precisan:

1. Aislar las cepas de arqueas halófilas extremas presentes en la salmuera y minerales evaporíticas del piso de los vasos concentradores 9 y 10, y en los cristalizadores 19 y 20.
2. Identificación filogenética mediante la secuenciación de un fragmento de ADN que codifica para la subunidad pequeña del ribosomal 16S.
3. Caracterización morfológica de las cepas por medio de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (SEM)
4. Obtención de micrografías SEM de la interacción de células de haloarquea en los cristales evaporíticos de muestras ambientales.

5. Analizar la composición de la comunidad de arqueas halófilas extremas cultivables y no cultivables mediante la técnica Electroforesis de Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

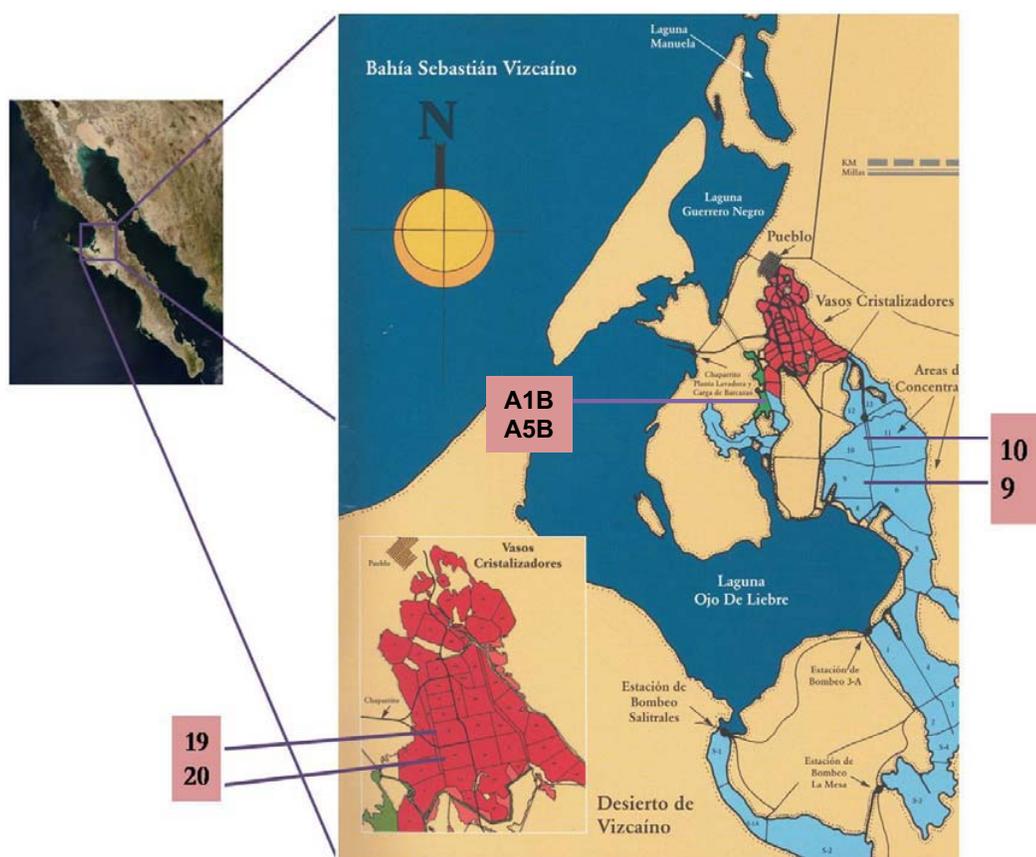
## 7. Descripción del área de estudio

### 7.1 Exportadora de Sal, S.A. (ESSA)

La compañía Exportadora de Sal, S.A. (ESSA), está situada adyacente al poblado de Guerrero Negro y a la laguna Ojo de Liebre, localizada en la costa del Pacífico cerca del límite que divide Baja California y Baja California Sur, a 4 Km al sur del paralelo 28, en la vertiente pacífica de la península de Baja California aproximadamente 700 km al norte de la ciudad de La Paz, Baja California Sur. La planta ocupa un área de 30,000 ha. El rango de precipitación pluvial anual varía entre 15 y 120 mm, aunque puede exceder los 300 mm en años excepcionales, los cuales típicamente ocurren al menos cada década. Los vientos dominantes provienen del oeste-noroeste con una velocidad promedio 5 m/seg. El clima de esta área es caluroso y muy seco, la temperatura media en verano oscila entre 24-40 °C, y 0-24 °C durante el invierno. El área se caracteriza por extensas planicies que reciben entradas de agua dulce episódicamente durante la temporada de ciclones. Todas estas condiciones propician la formación natural de planicies inundadas y saturadas de sal y de marismas, debido a eso, la industria ESSA se sitúa allí (Shumilin *et al.*, 2002).

En el proceso de formación de sal, el agua de mar es bombeada desde la laguna a tierra adentro para formar grandes charcas denominadas vasos concentradores, aproximadamente 8 x 30 km<sup>2</sup> de superficie de la laguna, proveen agua de mar a las instalaciones (Des Marais, 1995). Hay 13 áreas de concentración (< 0.5 m de profundidad) en la primera etapa del proceso. Ahí, el agua es concentrada, formando un gradiente de salinidad, por medio de incidencia solar y viento, los cuales inducen la evaporación hasta que se alcanza la saturación y precipitación secuencial de las siguientes sales: Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, MgCl, NaBr, así diversas

sales de potasio, magnesio y sodio (Horne, 1969, citado en Shumilin *et al.*, 2002). La segunda parte consiste de 32 charcas de cristalización o vasos cristalizadores con un área de 3,000 ha donde la precipitación de sal de mesa (NaCl) ocurre. La salmuera residual se contiene en charcos denominados amargos, estos son ricos en Mg, SO<sub>4</sub>, K, Cl. Los amargos ocupan un área de 2,000 ha. La cosecha de sal al año excede los 7 millones de toneladas métricas. Esta salinera es la segunda más grande del mundo y es el mayor productor de sal de mesa a nivel mundial.



**Figura 1.** Mapa del sitio de estudio. Se puede apreciar toda la planta de producción de sal (ESSA); las áreas de concentración, los vasos cristalizadores y los estanques con salmuera residual denominados amargos. Se pueden observar los dos sitios de muestreo: áreas de concentración 9 y 10 (P9 y P10). En la parte inferior izquierda se encuentra el acercamiento a la zona de los vasos cristalizadores donde se indican los sitios de muestreo: cristalizadores 19 y 20 (C19 y C20). Con las siglas A1B y A5B se indican los amargos muestreados que tienen el mismo nombre logístico en ESSA.

## **8. Materiales y métodos**

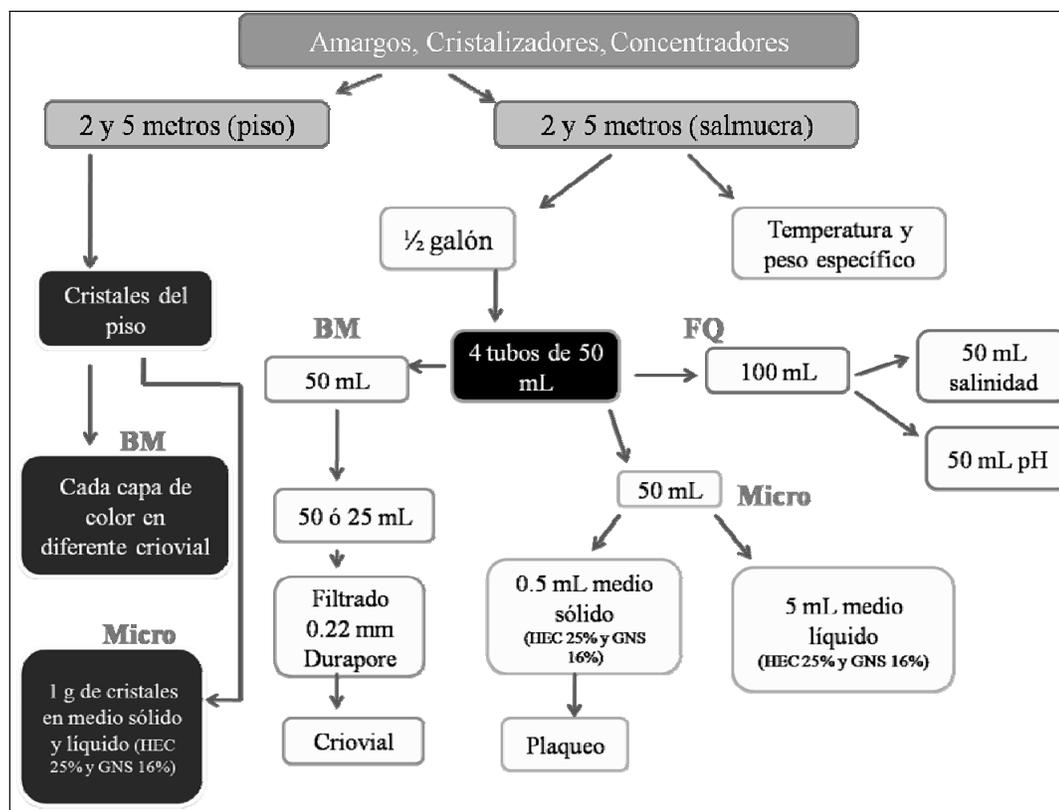
Este trabajo consistió en el análisis de la comunidad de arqueas halófilas a través de una aproximación polifásica, basada tanto en métodos dependientes como independientes de cultivo.

### **8.1 Campo**

#### **8.1.1. Colecta en los sitios de muestreo**

Se analizó la comunidad de arqueas halófilas extremas presente en dos vasos de concentradores (P9 y P10), dos cristalizadores (C19 y C20) y dos amargos (A1B y A5B) de la salinera ESSA (Fig. 1). Se extrajeron muestras de salmuera y se colectaron cristales del fondo de las charcas mencionadas. En todos los sitios se realizaron dos muestreos: a los dos y cinco metros con respecto de la orilla del charco. Se registraron geográficamente todos los sitios con ayuda de un GPS marca Magellan modelo Meridian XL, así también se hicieron mediciones de algunos parámetros físicas y químicas (peso específico, temperatura y pH), con un densitómetro, un termómetro y un potenciómetro respectivamente. Se colectaron 200 mL de salmuera, se almacenaron en viales de plástico de 50 mL y se utilizaron de la siguiente manera: 50 mL para la medición de salinidad en grados Baumé, 50 mL para la medición de pH, 50 mL para inocular medio líquido y sólido para arqueas halófilas extremas (HEC 25%) y 50 mL para recuperación de masa celular, por medio de filtrado con una membrana Durapore de 0.45  $\mu\text{m}$ . En el caso de la salmuera de los cristalizadores y de los amargos, se utilizaron sólo 25 mL pues la membrana se saturó rápidamente, haciendo lenta y difícil la recuperación de masa celular. Asimismo, se extrajeron cristales (*ca.* 200 g) en cada punto de muestreo. Los cristales se colectaron en pequeños trozos del fondo de las charcas y se preservaron en viales de 50 mL. En el caso de los vasos concentradores se

extrajeron evaporitas que presentaran 3 horizontes de colores amarillo, verde y rosa, los cuales se separaron con ayuda de pinzas de disección y con guantes estériles y se preservaron en diferentes viales de 50 mL. Aproximadamente un gramo de cada horizonte fue almacenado en viales especiales para criopreservación, la preservación en nitrógeno se hizo por triplicado para todos los cristales de todas las charcas colectadas. La figura 2 muestra el diagrama de flujo de la colecta en campo. Se resumen los puntos clave de la colecta mencionados anteriormente.



**Figura 2.** Diagrama de flujo de la colecta en campo. Se muestran siglas afuera de los cuadros de texto. BM se refiere al rubro de biología molecular, FQ es para referir a las condiciones físicas y químicas medidas, Micro representa la metodología de microbiología clásica.

### **8.1.2. Fijación de las muestras**

Para la posterior extracción de ADN, las muestras se preservaron en crioviales dentro de un contenedor de nitrógeno (-196 °C), y se guardaron hasta su posterior utilización en el laboratorio.

## **8.2. Laboratorio**

Todos los experimentos fueron desarrollados en el laboratorio de Ecología Microbiana Molecular en el CIBNOR. El material y reactivos suministrados para esta investigación fueron provistos con las facilidades del mismo.

### **8.2.1. Aproximación dependiente de cultivo de la comunidad arqueal**

#### **8.2.2. Enriquecimientos obtenidos de las muestras de campo**

Se inoculó 1 mL de las muestras de cada punto de salmuera y cristales obtenidos en campo en 40 mL de medio HEC 20 y 25% de concentración de sales totales (Anexo 1). Se mantuvieron por un período de 3 semanas en matraces Erlenmeyer de 125 mL en una incubadora, con 125 rpm de agitación constante, condiciones parciales de luz y oscuridad y mantenidas a  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . También se inoculó medio sólido y líquido (40 mL) DG 16% (Anexo 1b) con 0.2 mL y 1 mL de salmuera respectivamente de las localidades muestreadas. Estos medios fueron incubados a una temperatura mínima de  $22\text{ °C}$  y a una temperatura máxima de  $32\text{ °C}$ , en condiciones de fotoperíodo de 12 horas, a una intensidad de luz entre  $25\text{-}50\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , sin agitación por un período de aproximadamente 90 días. Los cultivos en medio sólido fueron sometidos a condiciones anaeróbicas usando una jarra BBL con una atmósfera de  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ . El tiempo de incubación fue de 4 meses.

### **8.2.3. Primo-aislamiento y condiciones de incubación**

De los enriquecimientos logrados se inocularon 0.5 mL a cajas Petri que contenían el medio HEC 20 y HEC 25% a pH 4.8 y 7.0 solidificado con agar. La incubación se realizó a  $37\text{ °C} \pm 0.2$  y también a  $45\text{ °C} \pm 0.2$  en una incubadora estática en condiciones de obscuridad total por un período de 4 a 21 días dependiendo el caso. Posteriormente, los crecimientos observados se diluyeron serialmente en SW 25%. Las diluciones fueron en orden desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta alcanzar una dilución de  $1 \times 10^{-6}$ . Se tomó 0.2 mL de cada dilución y se extendió por duplicado en la superficie de la caja Petri con el mismo medio y se incubó en las mismas condiciones anteriores por el mismo período de tiempo. Nuevamente, de los crecimientos observados, se seleccionó una colonia de cada caso, por medio del microscopio estereoscópico, y se transfirieron a nuevas cajas Petri con el mismo medio por estría cruzada. Se incubaron asimismo en un período de tiempo similar y con las mismas condiciones anteriormente descritas.

### **8.2.4. Aislamiento y caracterización de las cepas**

Las nuevas colonias discretas se transfirieron reiteradamente, con el uso del microscopio estereoscópico, por el método de diluciones previamente descrito. En esta ocasión, las cepas provenientes de las áreas de concentración 9 y 10 se transfirieron solamente en medio sólido HEC 20% y se incubaron con las mismas condiciones y período de tiempo que las anteriores. Asimismo, a la cepa proveniente del vaso cristizador 20, se transfirió en medio sólido HEC 25% y se incubó a  $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  en una incubadora estática en condiciones de obscuridad total por un período de 21 días. Las primeras colonias obtenidas con el medio DG 16% en la jarra, se sometieron a un análisis microscopio y se confirmó su aislamiento. Una vez realizado esto, se volvieron

a incubar a bajos las mismas condiones previas por tiempo indefinido hasta lograr la aparición de suficientes colonias para posteriores análisis. Una vez obtenidas las nuevas colonias aisladas de haloarqueas, se caracterizaron con el uso del microscopio estereoscópico, utilizando los siguientes criterios: tamaño, forma, color, textura, superficie, elevación y margen (Smith, 1997). Se tomó una colonia de cada cepa, se colocó sobre un portaobjetos con 20  $\mu$ L de SW 20% y se cubrió con un cubreobjetos. Se observó en un microscopio de contraste de fases marca Nikon a 100X. Se fotografiaron los campos que mostraron la mayoría de las particularidades de las células cultivadas y se caracterizaron respecto a su forma, largo, diámetro, presencia de inclusiones citoplasmáticas y tipo de agrupación celular.

Posterior al aislamiento se realizó un ensayo de crecimiento microbiano en un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado con diferentes medios. Las cepas se incubaron en 50 mL de los medios HEC 10, 25 y 30% en matraces de 125 mL (por duplicado), a 37 °C por tres días en agitación constante para enriquecer los cultivos. Los enriquecimientos se cosecharon en tubos cónicos de 50 mL de biomasa por centrifugación a 4,000 g por 30 min a 25 °C. Al botón celular obtenido, se resuspendió en 10 mL del medio fresco correspondiente (HEC 10, 25 y 30%). La suspensión se repartió (5 mL por cada uno) en dos matraces que contenían 40 mL del medio fresco correspondiente. Se sometieron a las mismas condiciones de incubación. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 mL, a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación, para medir por medio de turbidometría el incremento de la masa celular. Se midió la densidad óptica a 580 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 6505. Se utiliza como blanco una cuveta de cuarzo marca Sigma que contenía 1 mL de medio fresco en cada uno de los casos. En los casos en donde la densidad óptica fue mayor a

1,5 se diluyó la muestra con medio fresco (1:2, 1:4, 1:10) para obtener valores dentro del rango de confiabilidad. De los datos obtenidos, se analizaron y graficaron en Excel para obtener las curvas de crecimiento de cada cepa bajo los diferentes medios a los que fueron sometidas.

#### **8.2.5. Etiquetado de las cepas**

A las cepas obtenidas se les etiquetó con el siguiente orden para su identificación y manejo en los posteriores análisis:

1. Sitio de muestreo
2. Punto transecto
3. Particularidad de la colonia (en sólo un caso) y/o letra que distingue la colonia A de la B (en algunos casos)
4. Fecha (dd/mm/aa)
5. Número de caja Petri
6. Color de la colonia en inglés

Ejemplo:

**P92B070208-1P**

### **8.2.6. Identificación de las cepas aisladas**

La identificación de las cepas se realizó mediante el análisis de la secuencia del fragmento de ADN que codifica para la subunidad pequeña ribosomal 16S rARN. Este fragmento es de alrededor de 1350 pares de bases.

### **8.2.7. Extracción y cuantificación de ADN**

A las cepas obtenidas se extrajo el ADN genómico por medio del paquete comercial de extracción DNeasy de Quiagen usando el protocolo de extracción para bacterias Gram-negativas. El ADN extraído se visualizó mediante un gel de agarosa 0.7% en buffer TBE 1X, el cual está compuesto por 108 g de Tris-Base, 55 g de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0.5 M; todo suspendido en 1 L de agua destilada. El gel de agarosa contenía 1  $\mu$ L de bromuro de etidio a 10% (w/v). La electroforesis se corrió a 80 V/ 400 mA por 30 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular  $\lambda$ DNA Hind III (0.12-23.1 kbp) de Roche Applied Science. Los geles se fotodocumentaron utilizando un transiluminador BioDoc-it<sup>tm</sup>-20 System (UVP). Asimismo, se cuantificó la concentración de ADN de los extracto en un biofotómetro (BioPhotometer Eppendorf 6131) registrando la absorbancia con 2  $\mu$ L de muestra y 58  $\mu$ L de agua desionizada denominada Nuclease Free Water de Promega en cuvetas de metacrilato para espectrofotometría.

### 8.2.8. Amplificación de un fragmento del gen 16S rARN

Para la amplificación de fragmentos de la subunidad pequeña 16S de la molécula de ARN ribosomal se generó mediante PCR. El par de oligonucleótidos iniciadores, que son universales para el dominio Arquea, usada fue:

ARC-8F (5'-TCCGGTTGATCCTGCC-3')

ARC-1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Teske *et al.*, 2002).

El par de oligonucleótidos iniciadores universales para el dominio bacteria fue:

A (8F) (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

B (1522R) (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3') (Giovannoni *et al.*, 1990).

El amplicón que se generó fue de cerca de 1370 pb (de la bases 23-25 a la base 1492).

La amplificación de los fragmentos ocurrió en un termociclador marca BioRad bajo las siguientes condiciones que se muestran en la tabla II. En cada caso de amplificación de ADN de haloarqueas, el experimento de amplificación incluyó: una muestra ambiental previamente amplificada y secuenciada utilizada como control positivo, la cepa C20L *Rhodococcus* sp., proporcionada por la colección del laboratorio de ecología microbiana molecular utilizada como control negativo (López-Cortés *et al.*, 2008) y la mezcla de reacción sin el ADN templado utilizada como blanco. En cada caso de amplificación de ADN de bacteria, los experimentos incluyeron los mismos controles, sólo que el control negativo fue la muestra usada como control positivo para el caso de arquea. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa de 1.0% con 1.5 µL de Bromuro de Etidio a 10% (w/v). La electroforesis se corrió a 80 V/ 400 mA por 40 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular VIII (0.019-1.11 kbp) de Roche Applied Science. Los geles obtenidos se fotodocumentaron en un transiluminador BioDoc-it<sup>tm</sup>-20 System (UVP).

**Tabla II.** a) Programa usado en el termociclador para la obtención de productos. b) Mezcla de reacción usada para la amplificación del fragmento del 16S rADN.

<p><b>a) Primers universales Arquea</b></p> <p><b>Programa PCR 1</b></p> <p>95 °C 3 min            1 ciclo</p> <p>95 °C 40 s            } 55 °C 40 s            }    30 ciclos 72 °C 2 min            }</p> <p>72 °C 6 min            1 ciclo</p>	<p><b>b)</b></p> <p><b>Mezcla de reacción PCR</b></p> <p>Amortiguador    2.5 µL (5X)</p> <p>MgCl<sub>2</sub>            3.0 µL [25 mM]</p> <p>H<sub>2</sub>O                16.4 µL</p> <p>dNTP's            0.5 µL [8 mM]</p> <p><b>Primers:</b></p> <p>Delante            0.2 µL [250 ng/µL]</p> <p>Reverso            0.2 µL [250 ng/µL]</p> <p>Taq                 0.2 µL [5 U/µL]</p> <p>ADN                2 µL [50-100 ng/µL]</p> <hr/> <p><b>Volumen total</b>            25 µL</p>
<p><b>a) Primers universales Bacteria</b></p> <p><b>Programa PCR 1</b></p> <p>94 °C 3 min            1 ciclo</p> <p>94 °C 1 min            } 60 °C 1 min            }    30 ciclos 72 °C 1 min            }</p> <p>72 °C 7 min            1 ciclo</p>	<p><b>b)</b></p> <p><b>Mezcla de reacción PCR</b></p> <p>Amortiguador    1.25 µL (5X)</p> <p>MgCl<sub>2</sub>            1.72 µL [25 mM]</p> <p>H<sub>2</sub>O                6.2 µL</p> <p>dNTP's            0.65 µL [8 mM]</p> <p><b>Primers:</b></p> <p>Delante            1.0 µL [100 ng/µL]</p> <p>Reverso            1.0 µL [100 ng/µL]</p> <p>Taq                 0.1 µL [5 U/µL]</p> <p>ADN                1 µL [50-100 ng/µL]</p> <hr/> <p><b>Volumen total</b>            13.77 µL</p>

Una vez visualizados los productos del PCR de cada cepa, se mandaron a purificar y secuenciar a la compañía coreana Macrogen.

### **8.2.9. Mantenimiento y criopreservación de las cepas aisladas**

Se tomó una asada abundante de cada cepa identificada y se cultivaron, por duplicado en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 40 mL de medio HEC 20 y/o 25% (según el caso), y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 125 rpm de agitación constante, durante 10 días. Se tomaron 30 mL de cada cepa y se sometió a centrifugación a 5000 g durante 20 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de SW 20% para las cepas del área de concentración y en SW 25% para la cepa del cristalizador. A todas se le añadió 5% (V/V) de dimetilsulfóxido (DMSO) y se transfirieron a un criovial de 2 mL, y se preservaron en un contenedor de nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  para ser parte de la colección de microorganismos del laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR. Asimismo, bajo los estándares del protocolo propuesto por Rippka *et al.*, (1981), se utilizó otra asada de las cepas para mantener las células viables en tubos inclinados que contenían medio HEC 20 y HEC 25%, se incubaron con las mismas condiciones previamente descritas de cuando se aislaron; y, posteriormente se mantuvieron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un período no mayor a 3 meses.

### **8.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

#### **8.3.1. Fijación de las colonias**

Se cortaron las colonias con una capa muy fina de agar. Posteriormente se montaron en el pin de observación que contenía en su superficie de contacto, un tape de carbón conductor de doble cara modelo 5075 marca SPI. A los pines se les añadió 20  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y se dejó reposar por un período de 3 horas. Mas tarde, se procedió a realizar 3 enjuagues, con el mismo amortiguador, para eliminar el exceso de glutaraldehído, en cada enjuague se reemplazó el líquido en el que estaba inmersa la colonia y se añadió nuevo hasta crear una burbuja en el cual la colonia quedara inmersa; y, se dejó reposar por 10 minutos. Una vez enjuagadas las colonias, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2%, a la última burbuja del enjuague en donde estaba inmersa la colonia, y se dejó reposar por 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se enjuagó 2 veces, por un período de 10 minutos entre cada uno, con agua destilada. Una vez completado el proceso, se sometieron los pines con las muestras tratadas a un evaporador de vacío marca Denton Vacuum, modelo Desk II. Las muestras fueron retiradas hasta que se alcanzaron los 50 mTorr de vacío; y, consecutivamente dentro del mismo aparato se recubrieron con iones Paladio a 40 mA durante 30 segundos por dos ocasiones.

#### **8.3.2. Fijación de las colonias adheridas a los cristales de NaCl**

Se cortaron los cristales formados que contenían las colonias junto con el agar sin permitir que éste último fuera una capa muy gruesa. Posteriormente se montaron en el pin de observación que contenía en su superficie de contacto, un tape de carbón conductor de doble cara modelo 5075 marca SPI. Se dejaron secar durante 4 días por

proceso natural en un desecador para protegerlas de contaminación. Posteriormente se sometieron a una deshidratación por vacío en el evaporador de vacío marca Denton Vacuum, modelo Desk II. Las muestras fueron retiradas hasta que se alcanzaron los 50 mTorr de vacío; y, consecutivamente dentro del mismo aparato se recubrieron con iones Paladio a 40 mA por 30 segundos dos veces.

### **8.3.3. Fijación de las muestras naturales de cristales de NaCl y CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O**

Los cristales naturales se montaron en el pin. Posteriormente se montaron en el pin de observación que contenía en su superficie de contacto, un tape de carbón conductor de doble cara modelo 5075 marca SPI. Se dejaron secar durante 4 días por proceso natural en un desecador para protegerlas de contaminación. Posteriormente se sometieron a una deshidratación por vacío en el evaporador de vacío marca Denton Vacuum, modelo Desk II. Las muestras fueron retiradas hasta que se alcanzaron los 50 mTorr de vacío; y, consecutivamente dentro del mismo aparato se recubrieron con iones Paladio a 25 mA por 30 segundos dos veces.

### **8.3.4. Obtención de las imágenes al microscópio**

Las muestras tratadas se colocaron en un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi s-3000N y, las micrografías generadas se adquirieron por medio del programa Quartz PCI (V 5.5). Las imágenes se almacenaron digitalmente en formato tiff para su posterior análisis.

#### **8.4. Aproximación independiente de cultivo**

##### **8.4.1. Extracción de ADN**

Se utilizó el juego comercial, con reactivos y viales, FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil, para la extracción de ADN de la marca BIO 101. Consistió primeramente, en la adición de entre 200 y 500 mg de la muestra a viales, denominados “lysing matrix” que contienen unas perlas de sílica y cerámica. Se agrega 978  $\mu$ L de amortiguador de fosfato de sodio y 122  $\mu$ L de amortiguador MT y se mezcla vigorosamente por 10 Min hasta que se obtuvo una solución homogénea. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 g por 30 segundos. Inmediatamente, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrifuga, se adicionó 250  $\mu$ L del reactivo PPS y se mezcló agitando el tubo manualmente al menos unas 10 veces. Seguido, se centrifugó a 14,000 g por 5 minutos para formar un precipitado. Después, se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial de microcentrífuga y se agregó 1 mL de la suspensión “Binding Matrix Suspension”; y se agitó manualmente por dos minutos para permitir el acoplamiento del ADN a la matriz. Posteriormente se posicionaron los tubos por 3 minutos en un soporte para permitir el asentamiento de la matriz de sílica. Más tarde, se removieron 500  $\mu$ L del sobrenadante, siendo cuidadosos para evitar resuspensión de la matriz, el sobrenadante se desechó, y se resuspendió la matriz en el resto del líquido. En seguida, se transfirió la mezcla a un vial especial denominado “SPIN filter” que contiene otra matriz y se centrifugó a 14,000 g por 1 minuto, y, una vez terminado el proceso se decantó el líquido. Se agregaron 500  $\mu$ L de la solución SEWS-M (Salt-Ethanol-Wash) al mismo vial y se centrifugó a 14,000 g por 1 minuto. Una vez más se desechó el líquido y se centrifugó a 14,000 g por 2 minutos para secar la matriz de solución residual. Posteriormente, se retiró el “SPIN filter” y se colocó en un nuevo vial para dejar destapado por 5 minutos a

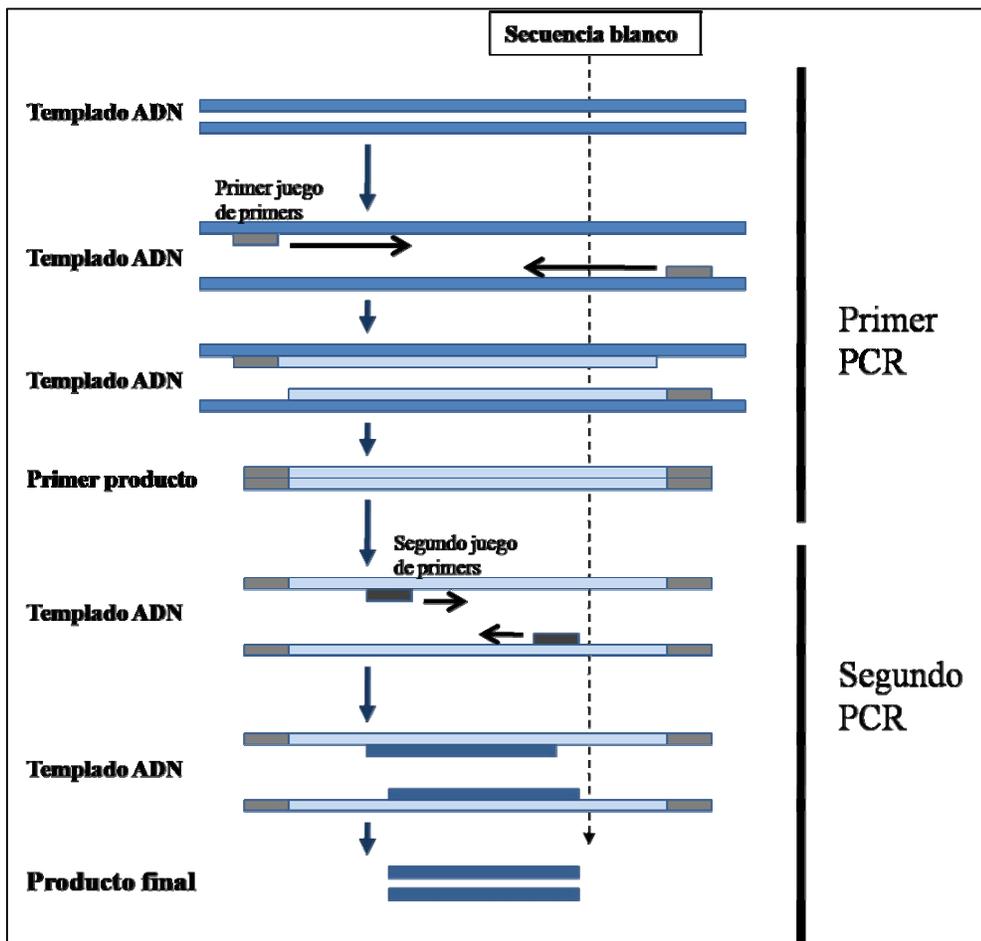
temperatura ambiente. Finalmente se agregó solución DES (DNase/Pyrogen Free Water) y se agitó meticulosamente para resuspender el ADN de la matriz. Se centrifugó a 14,000 g por 1 minuto para transferir la elución en un nuevo vial y dejar listo para su uso molecular.

#### **8.4.2. Amplificación de un fragmento del gen 16S rARN para DGGE**

Para la amplificación de fragmentos de la subunidad pequeña 16S de la molécula de ARN ribosomal se utilizó la estrategia denominada PCR-Anidado (Nested-PCR).

El PCR-Anidado es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), en donde dos pares (en vez de sólo uno) de iniciadores o *primers* de PCR, en dos diferentes corridas, son usados para amplificar un fragmento específico de ADN. Esta estrategia se refiere a que dos pares de iniciadores han sido usados para amplificar un solo locus. El primer par de primers amplifica un fragmento de cualquier tamaño, como si fuera un PCR común; sin embargo, un segundo par de iniciadores llamados *iniciadores anidados* (porque recaen o se instalan dentro del primer fragmento producido anteriormente) se unen dentro del primer producto de PCR, logrado con anterioridad, para permitir una segunda amplificación, no obstante, más corta que la primera (Fig. 3) (Dar *et al.*, 2005).

La lógica detrás de esta estrategia es que si el locus inadecuado fuera amplificado por error, la probabilidad de amplificar un segundo producto por los nuevos primers sería muy baja. Así, esta estrategia incrementa la especificidad y sensibilidad del ensayo.



**Figura 3.** Diagrama general de la estrategia de PCR-Anidado y sus productos principales. Se distingue primordialmente que los segundos productos son de un tamaño menor. La flecha discontinua que se sitúa a lo largo del diagrama explicita que en cada uno de los pasos la secuencia blanco sigue siendo la misma sólo se va reduciendo.

El primer par de oligonucleótidos iniciadores fue:

ARC-8F (5'-TCCGGTTGATCCTGCC-3')

ARC-1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Teske *et al.*, 2002).

El amplicón que se generó fue de cerca de 1370 pb (de la bases 23-25 a la base 1492); el segundo par fue:

344F+GC (5'-GCclamp-ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA3')

907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Wilms *et al.*, 2006).

El amplicón que se generó fue de cerca de 563 pb (de la bases 344 a la base 907). El iniciador 344F+GC contiene en un extremo una pinza rica en Guanina y Citosina; este iniciador es universal para el dominio Arquea; asimismo, el iniciador 907R (que va de derecha a izquierda) es universal para los dominios Arqueas y Bacteria. La amplificación de los fragmentos se realizó en un termociclador marca BioRad. La tabla 3, muestra los programas utilizados para generar los productos de PCR. Se muestra que la mezcla de reacción fue idéntica para ambos casos. Los ensayos de amplificación incluyeron una muestra ambiental amplificada y secuenciada previamente utilizada como control positivo, la cepa C20L identificada como *Rhodococcus* sp., (López-Cortés *et al.*, 2008) utilizada como control negativo y la mezcla de reacción sin el ADN templado utilizada como blanco. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa de 1.0% con 1.5 µL de bromuro de etidio a 10% (w/v). La electroforesis se corrió a 80 V/ 400 mA por 40 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular VIII (0.019-1.11 kbp) de Roche Applied Science. Los geles obtenidos se fotodocumentaron en un transiluminador BioDoc-it<sup>tm</sup>-20 System (UVP).

**Tabla III.** a) Primer programa utilizado para generar el amplicón largo de PCR. b) Segundo programa utilizado para generar el segundo y último amplicón. c) Mezcla de reacción utilizada en ambos programas para generar los dos productos de PCR.

<b>a)</b>	<b>b)</b>	<b>c)</b>
<b>Programa PCR 1</b>	<b>Programa PCR 2</b>	<b>Mezcla de reacción PCR</b>
95 °C 3 min 1 ciclo	94 °C 3 min 1 ciclo	Amortiguador 2.5 µL (5X)
95 °C 40 s	94 °C 30 s	MgCl <sub>2</sub> 3.0 µL [25 mM]
55 °C 40 s	56 °C 45 s	H <sub>2</sub> O 16.4 µL
72 °C 2 min	72 °C 45s	dNTP's 0.5 µL [8 mM]
72 °C 6 min 1 ciclo	72 °C 7 min 1 ciclo	<b>Primers:</b>
		Delante 0.2 µL [250 ng/µL]
		Reverso 0.2 µL [250 ng/µL]
		Taq 0.2 µL [5 U/µL]
		ADN 2 µL [50-100 ng/µL]
		<hr/> <b>Vol. total</b> 25 µL

### **8.4.3. Electroforesis de Gel en Gradiente Desnaturalizante (DGGE)**

Una vez obtenidos los productos de PCR de 563 pares de bases, se procede a separarlos al pasar éstos a través de un gel de acrilamida en gradiente desnaturalizante aplicando un campo eléctrico (electroforesis). Esta técnica es un método de detección de patrones que separa los productos generados por el PCR de muestras ambientales de ADN. El PCR puede amplificar productos del mismo tamaño de los microorganismos dominantes en la muestra. Sin embargo, todos están mezclados y la separación convencional con electroforesis con geles de agarosa resulta en una banda. DGGE puede contener contra esa limitación al incorporar la desnaturalización del ADN. Durante el proceso, los amplicones van encontrando grandes concentraciones de desnaturalizantes químicos que se incrementan gradualmente conforme éstas van migrando a través del gel. Se van generando dominios de fusión de la doble cadena y esto decreta la migración dramáticamente. Diferentes secuencias de diferentes bacterias o arqueas se desnaturalizarán a diferentes concentraciones, resultando un patrón de bandas. Cada banda representa una población presente en la comunidad. Una vez generado el patrón, éste puede ser examinado estadísticamente para determinar la estructura microbiana entre ambientes o entre tratamientos. La técnica se describe a continuación:

### **8.4.4. Preparación de soluciones desnaturalizantes**

La formación del gel con gradiente desnaturalizante para la electroforesis se lleva a cabo con la mezcla de dos soluciones, una con alta concentración de desnaturalizante, en este caso 90 % (Tabla IV). Para preparar la solución con alto porcentaje de desnaturalizante es necesario disolver la urea mediante un calentamiento y agitación

manual durante algunos minutos. Las soluciones se aforan con agua destilada en matraz aforado de 100 mL. Se conservan refrigeradas, en frasco ámbar, por un mes con calidad suficiente.

**Tabla IV.** Reactivos para la preparación de las soluciones de reserva con alta concentración de desnaturalizante (90 % y 70 %), y con nula presencia de desnaturalizante (0 %). Soluciones utilizadas en la elaboración del gel de DGGE.

Reactivo	Solución al 90 %	Solución al 70 %	Solución al 0 %
Urea (SIGMA U-4128)	37.8 g	29.4 g	---
Formamida desionizada (BIO-RAD Control 8438)	36 mL	28 mL	---
Archilamida/bis 40 % (40 % acrylamide/bis 37.5:1 Cat. 161-0148)	15 mL	15 mL	15 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL	2 mL
Aforar con agua destilada:	100 mL	100 mL	100 mL

#### 8.4.5. Preparación del gel desnaturalizante para el DGGE

A partir de las soluciones de reserva de 0 y 90 %, se prepararán las soluciones que formaran el gel de DGGE. Para preparar un gel de DGGE con 6 % de acrilamida/bis, y gradiente de 30 a 70 % de desnaturalizante se necesitan tres soluciones. Un par de soluciones comprenden determinado rango de concentración de desnaturalizante, en este caso va de 30 a 70 %, y una tercera solución que no contiene desnaturalizante (0 %). Esta solución final se vierte en la parte superior del gel, denominado “gel de carga”, en esta zona se forman los pozos para cargar las muestras de ADN (que son productos de PCR presentando secuencias con dominios de baja fusión).

**Tabla V.** Reactivos para la preparación de las soluciones con concentración de desnaturalizante que formarán el gradiente en el gel de 30 a 70 % a partir de soluciones de reserva de 0 y 90 % de desnaturalizante; y la solución con 0 % de desnaturalizante, para la zona de carga. Soluciones que formarán el gel de DGGE en el ensamble de vidrios.

Solución original	Sol. 30 % final	Sol. 70 % final	Sol. 0 %
Sol Desnat. 90 %	3.75 mL	8.6 mL	0 mL
Sol. Desnat. 0 %	7.4 mL	2.47 mL	5 mL
TEMED <sup>1</sup>	6.9 µL	6.9 µL	5 µL
APS 10 % <sup>2</sup>	52.3 µL	52.3 µL	37.5 µL
Vol. Total:	≈ 11.1 mL	≈ 11.1 mL	≈ 5 mL

<sup>1-</sup> TEMED, N,N,N'N-Tetra-metiletilenodiamina, BIORAD Cat. 161-0801.  
<sup>2-</sup> APS, Amonio persulfato, BIORAD Cat. 161-0700. Se diluye en agua destilada mili Q.

**Tabla VI.** Reactivos para la preparación de las soluciones con concentración de desnaturalizante que formarán el gradiente en el gel de 30 a 70 % a partir de soluciones de reserva de 0 y 70 % de desnaturalizante; y la solución con 0 % de desnaturalizante, para la zona de carga. Soluciones que formarán el gel de DGGE en el ensamble de vidrios.

reactivo	Sol. 30 %	Sol. 70 %	Sol. 0 % <sup>1</sup>
Sol Desnat. 70 %	4.9 mL	11.1 mL	0.0 mL
Sol. Desnat. 0 %	6.2 mL	0.0 mL	8.0 mL
TEMED <sup>2</sup>	6.5 µL	6.5 µL	7.5 µL
APS 10 % <sup>3</sup>	42.3 µL	42.3 µL	55.0 µL
Vol. Total:	≈ 11.1 mL	≈ 11.1 mL	≈ 8.0 mL

<sup>1</sup> Se utiliza 8 mL de volumen total en lugar de 5 mL como en la tabla 1, para un llenado total con exceso en la cámara del ensamble de vidrios, considerando que la solución reduce su volumen cuando se gelifica.  
<sup>2</sup> TEMED, N,N,N'N-Tetra-metiletilenodiamina, BIORAD Cat. 161-0801.  
<sup>3</sup> APS, Amonio persulfato, BIORAD Cat. 161-0700. Se diluye en agua destilada mili Q.

Las soluciones que formarán el gel de DGGE se preparan en un matraz “kitazato” de 50 mL, para luego añadir la solución TEMED. Los matraces se agitan manualmente al mismo tiempo que se encuentran conectados a una bomba de vacío a 15 pulg.Hg durante 1-3 min para la degasificación. El matraz es tapado con papel aluminio.

Una vez desgasificadas las soluciones son vertidas en el sistema formador de gradiente (Bio-Rad modelo 385). La solución con alto porcentaje del desnaturalizante (solución con 70 %) es mezclada con 100  $\mu$ L de “Dye Solution DCode” control 300001792, el cual permite visualizar la formación del gradiente en el gel, relacionándolo proporcionalmente con la intensidad del color; posteriormente, la solución es vaciada en la columna del sistema que se localiza próxima a la manguera de salida, la cual contiene un magneto con agitación. La solución con bajo porcentaje de desnaturalizante es vertido en la columna distal al efluente. La solución de APS 10 % es añadida y mezclado en ambas soluciones desnaturalizantes momentos antes de iniciar la formación del gradiente en el ensamble de vidrios, colocado en la base de montaje.

Es importante revisar que el ensamble de vidrios sea impermeable a las soluciones vertiendo agua destilada mili Q y esperar 5 minutos, luego desagua y seca con papel Whatman # 1. También el sistema formador de gradiente se evalúa vertiéndole agua destilada mili Q para asegurar que haya una eficiente comunicación entre columnas, y que los conductos de la manguera y jeringa se encuentren limpias y abiertos.

#### **8.4.6. Formación del gel de DGGE**

Una vez listas las soluciones en el sistema formador de gradiente se activa la bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 4.5 mL/min. El tiempo de vaciado de la mezcla es de 5-6 min. Se confirma que la aguja de la jeringa esté colocada dentro del sándwich de vidrios antes de iniciar el vaciado. Inmediatamente después de vaciar las soluciones, se vierte la solución de 0 % de desnaturalizante, en esta etapa se coloca el peine en los vidrios, se recomienda dejar desbordar un poco de la solución en los vidrios, pues el

volumen de la solución se reduce al polimerizar. Se deja gelificar durante al menos 60 min. Previo al montaje del gel dentro de la cámara de DGGE, se quita el peine y los pozos son lavados con agua destilada miliQ usando una piseta, del mismo modo en el extremo opuesto del gel.

#### **8.4.7. Electroforesis del gel de DGGE**

La cámara de DGGE (DCODE™ Bio-Rad) debe contener 7 L de buffer TAE 1X. El *Caster* que contiene el gel, se montó en el portador del *caster*, y se introdujo la cámara. Una vez formado el gel se retiró el peine con cuidado. Se coloca el módulo de control para cerrar el sistema de DGGE y activarlo. Primero se enciende la bomba, la cual hace circular el buffer, luego se enciende el calentador y se programa para que el amortiguador alcance 65 °C de temperatura.

Una vez alcanzada la temperatura programada, se apaga el equipo y se desmonta el módulo de control para cargar las muestras en los pozos del gel. Se cargan volúmenes entre 10 y 40 µL dependiendo del caso; cada muestra, es mezclada con 10 µL de buffer de carga para DGGE. Al terminar de cargar, se programa la temperatura a 60 °C, se enciende el calentador, y la bomba de circulación, y se inicia la electroforesis a 50 Volts por 18 horas.

#### 8.4.8. Tinción

La detección de las bandas ADN se llevó a cabo mediante el método de tinción de plata descrito por (Benbouza *et al.*, 2006), el cual consiste en 3 pasos:

- a) Fijación. El gel se deja sumergido por 10 minutos a temperatura ambiente, en una solución de 500 mL que contiene 100 mL/L de etanol absoluto y 5 mL/L de ácido acético. Se agita de manera suave.
- b) Tinción. Se sumerge el gel por 10 minutos a temperatura ambiente, en otro recipiente con 500 mL de una solución que contiene 1 g/L de nitrato de plata en solución. Se agita suavemente. Posteriormente se enjuaga dos veces con agua destilada para remover el exceso de la solución de plata.
- c) Revelado. El revelado ocurre cuando se sumerge el gel en otra solución que contiene 15 g/L de NaOH, 0.1 g/L de NaBH<sub>4</sub> y 0.48 g/L de formaldehído. El gel es primero lavado con 200 mL de esta solución durante varios segundos para precipitar el exceso de plata, y luego es incubado en 300 o 400 mL de la misma solución con agitación lenta hasta que se visualizan las bandas (aproximadamente 20 minutos).

Por último, el gel se fija en con una solución de 7.5 g/L de NaCO<sub>3</sub> por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

Los geles se fotodocumentaron en un scanner densitométrico UMAX Powerlook 2100 XL. Las imágenes se grabaron en escala de grises a 400 dpi de resolución vertical y horizontal con 8 bits de profundidad para su posterior análisis y a color a 600 dpi de resolución vertical y horizontal con 24 bits de profundidad.

### **8.5. Análisis del patrón de bandas**

Por la complejidad observada en los geles de DGGE y partiendo de la premisa que muchas bandas pudieran ser artefactos de la técnica, la asignación taxonómica de cada banda se vuelve operacional y se denomina entonces OTU (unidad taxonómica operacional) a todas y cada una de las bandas.

Las imágenes obtenidas en escala de grises fueron procesadas y analizadas en el programa GelCompar II V 4.602 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Los geles fueron normalizados y posteriormente se obtuvieron los patrones de migración de las bandas. Asimismo, se midió la intensidad de la banda en píxeles a través de la integración del área bajo la curva normal ajustada a la curva densitométrica de cada banda.

Se generó una matriz de datos correspondientes a las similitudes entre cada OTU (banda) utilizando el coeficiente de similitud Dice, a partir de ésta se realizó el análisis de agrupamiento mediante el método de agrupamiento pareado sin peso de la media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés).

## **8.6. Análisis filogenéticos**

### **8.6.1. Evaluación, edición y alineamiento de las secuencias**

Las secuencias correspondientes a cada cepa de haloarquea fueron evaluadas y editadas (sólo algunos casos) en el programa Chromas Lite 2.01. Posteriormente, con el programa BLAST 2 sequences (Tatusova y Madden, 1999). Para obtener una secuencia consenso, se realizaron alineamientos con las secuencias que correspondían al iniciador *Forward* y su correspondiente *Reverse*, sólo que a esta última se le aplicó la función “reverso complementario”, la cual gira la secuencia para que se pueda alinear con la primera. Consecutivamente con la secuencia completa, se realizó una búsqueda de secuencias quiméricas en el banco de datos *GeneBank*, utilizando el programa en línea BLAST en su modalidad nucleotide BLAST (Altschul, 1999) y se bajaron aquéllas que tuvieran un índice de similitud superior al 98% con respecto de las secuencias a estudiar. Asimismo, se realizó un alineamiento de todas las secuencias con el software CLC sequence\_viewer 5.1.

### **8.6.2. Construcción de árboles filogenéticos**

Una vez alineadas todas las secuencias se construyó un filograma para estimar la filogenia de las cepas obtenidas. Por medio del software PAUP, versión 4.08b, se utilizó, bajo el método de distancias, el algoritmo de agrupamiento Neighbor-Joining (Vecino más cercano) (Saitou y Nei, 1987) usando la medida de distancia denominada uncorrected. Asimismo, se realizó una búsqueda heurística basada en inferencias Bootstrap y usando el criterio de evolución mínima con 500 réplicas para cada conjunto de datos, cada uno seguido de arreglos topológicos con el algoritmo tree-bisection-

reconnection (TBR). Se estableció como regla al bootstrap que considerara consensos mayores al 50%.

### **8.6.3. Depósito de secuencias en GenBank**

Todas las secuencias obtenidas y analizadas fueron depositadas en la base de datos GeneBank siguiendo las especificaciones de la página web: ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/examples/requirements.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/examples/requirements.html)). Sus números de acceso se muestran la tabla VIII.

## **9. Resultados**

### **9.1. Sitios de muestreo en ESSA**

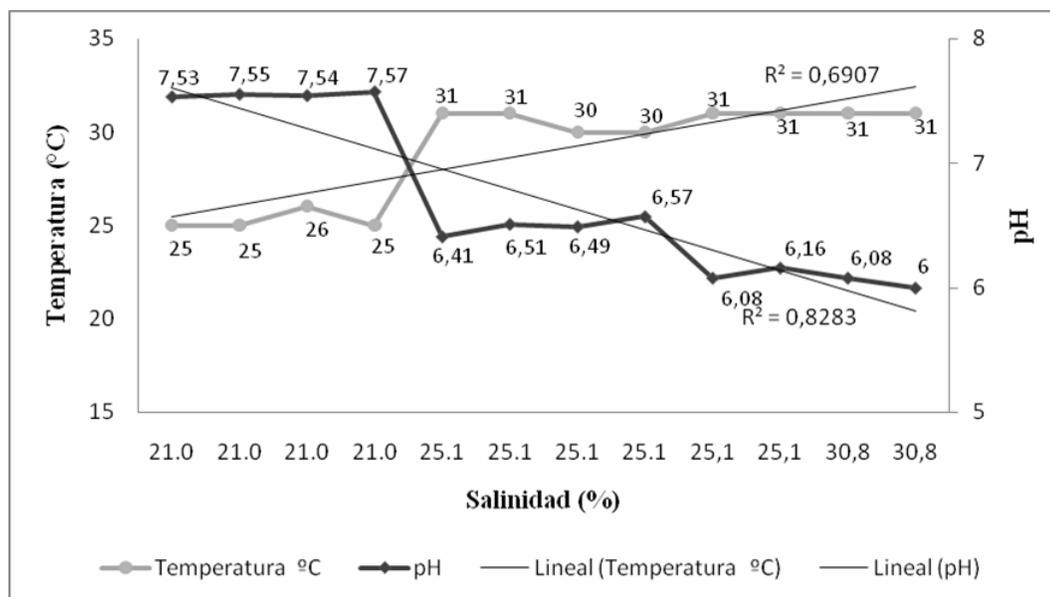
Los sitios de muestreo de Exportadora de Sal, S.A., Guerrero Negro (ESSA), se muestran en la tabla VII. En cada sitio se señala: la fecha del muestreo, la hora, el nombre del sitio, la clave de la charca (acorde con la nomenclatura de la empresa), los metros del punto-transecto donde se colectó, las coordenadas en latitud y longitud, los valores de pH, la temperatura en grados celsius, la concentración de sales totales en términos de porcentaje. Conforme la concentración de sales totales, en cada sitio se presentaba un patrón de coloración del agua distinto. En las áreas de concentración 9 y 10, la columna de agua tiene una coloración rosa muy pálido en las partes más someras y rosa con tonos más grises en las partes más profundas; en los cristalizadores 19 y 20, todo el estanque tiene un color violáceo-púrpura, tanto en las partes someras como en las profundas. Los amargos muestreados tienen coloraciones distintas entre ellos, el amargo 1B presenta un patrón de coloración azul-grisáceo en todo el estanque; por su parte, el amargo 5B tiene una coloración rosa muy pálido. Las áreas de concentración poseen 21.07% de salinidad, los vasos cristalizadores poseen 25.17% y los amargos 30.84% de concentración de sales totales.

**Tabla VII.** Identificación de los sitios muestreados en ESSA. Se muestran los valores de los parámetros físicos y químicos para cada sitio: pH, temperatura y salinidad. Se han ordenado de manera cronológica para fácil manejo.

Fecha	Hora	Sitio	No.	Clave	Transecto (m)	Coordenadas	pH	Temperatura (°C)	Salinidad (%)
04/10/07	12:10	Amargo	1B	A1B_2	2	N 27° 48' 06" W 114° 03' 25"	6.08	31	30.84
04/10/07	12:10	Amargo	1B	A1B_5	5	N 27° 48' 06" W 114° 03' 25"	6.00	31	30.84
04/10/07	12:47	Amargo	5B	A5B_2	2	N 27° 50' 35" W 114° 02' 16"	6.08	31	26.15
04/10/07	12:47	Amargo	5B	A5B_5	5	N 27° 50' 35" W 114° 02' 16"	6.16	31	25.15
04/10/07	13:44	Cristalizador	19	C19_2	2	N 27° 54' 18" W 114° 02' 14"	6.41	31	25.17
04/10/07	13:44	Cristalizador	19	C19_5	5	N 27° 54' 18" W 114° 02' 14"	6.51	31	25.17
04/10/07	13:59	Cristalizador	20	C20_2	2	N 27° 53' 49" W 114° 01' 57"	6.49	30	25.17
04/10/07	13:59	Cristalizador	20	C20_5	5	N 27° 53' 49" W 114° 01' 57"	6.57	30	25.17
05/10/07	12:00	Área de concentración	9	P9_2	2	N 27° 45' 38" W 113° 59' 52"	7.53	25	21.07
05/10/07	12:00	Área de concentración	9	P9_5	5	N 27° 45' 38" W 113° 59' 52"	7.66	25	21.07
05/10/07	13:11	Área de concentración	10	P10_2	2	N 27° 47' 47" W 113° 59' 47"	7.45	26	21.07
05/10/07	13:11	Área de concentración	10	P10_5	5	N 27° 47' 47" W 113° 59' 47"	7.57	25	21.07

Asimismo, se observa la relación inversamente proporcional entre los parámetros físicos y químicos de los sitios en la figura 4. La concentración de sales totales determina el pH. Conforme incrementa la salinidad disminuye el pH, el coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2 = 0,82$ ) indica que el grado de correlación que existe entre las variables salinidad y pH es alto. Sin bien, para el caso de la salinidad con respecto de la temperatura no se observa un ajuste elevado de los datos, se puede observar también

que hay una correspondencia relativamente significativa ( $R^2 = 0,69$ ), al aumentar la concentración de sales totales incrementa también la temperatura. Esta propiedad coligativa se denomina calor específico.



**Figura 4.** Se muestra la salinidad (%) en cada uno de los sitios de muestreo. Los sitios están representados por los valores de salinidad y se leen de izquierda a derecha desde el sitio P9\_2 hasta el sitio A1B\_2. El eje de la izquierda muestra los valores de temperatura (°C), mientras que el de la derecha muestra los valores de pH. Se observa la relación inversamente proporcional de los parámetros salinidad y pH, así como la relación directamente proporcional de la salinidad con respecto a la temperatura.

## 9.2. Características de las cepas de haloarquea obtenidas

A partir de enriquecimientos de las muestras de salmuera y cristales, se obtuvieron cepas axénicas cultivadas en dos medios sólidos: HEC 20%, pH 7.0; y HEC 25%, pH 7.0 (Tabla VIII). Del área de concentración 9 se obtuvieron las siguientes cepas: **P92B070208-1P**, la colonia es rosa de consistencia mucoide y bordes enteros, su morfología celular es pleomórfica predominantemente cocos y bacilos (Figs. 7-8); **P92A090908-6P**, la colonia es violeta de consistencia viscosa y bordes enteros, su

morfología celular es pleomórfica, predominan formas de bastón (Figs. 7 y 9); **P92A090908-6O**; la colonia es naranja de consistencia viscosa y bordes enteros, su morfología celular es pleomórfica, predominan formas de bastón (Figs. 7 y 9). Del área de concentración 10, se aislaron dos cepas: **P102070208-3R**, la colonia es roja-bermellón de consistencia viscosa y bordes enteros, su morfología celular presenta pleomorfismo en la fase exponencial, predominan formas de bastón (Figs. 7 y 9); y **P102070208-3O**, la colonia es roja-bermellón de consistencia viscosa y bordes enteros, su morfología celular presenta pleomorfismo en la fase exponencial, predominan formas de bastón. Las cinco cepas se han logrado en tan sólo 5 pasos con diferentes estrategias de cultivo (Anexo 2), sin embargo, los tiempos de generación de las colonias fueron largos, en general se observa que transcurren de 10 a 22 días aproximadamente. Del cristalizador 20 se logró una cepa, la cual tiene la clave **C205090908-1R**, la colonia es roja-bermellón de consistencia viscosa y bordes enteros, su morfología celular, en la fase exponencial, contiene células cuadradas y, en general, angulares irregulares (Fig. 10). En todos los casos las células no superan los 12  $\mu\text{m}$  de largo ni las 3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figs. 7-10).

El tiempo de incubación necesario para la aparición de colonias en medio sólido HEC 20% y 25% bajo condiciones de temperatura a 37 °C.

- En la cepa P92B070208-1P, fue de  $\pm 2$  días en medio sólido HEC 20% y 8 días en medio sólido HEC 25%, a 37 °C (Anexo 2, tabla I).
- Las cepas P92090908-6P y P92090908-6O, tienen un tiempo de generación colonial de  $\pm 14$  días en medio sólido HEC 20% a 37 °C (Anexo 2, tablas II y III)

- Las cepas P102070208-3R y P102070208-3O, tienen un tiempo de generación de colonias de  $\pm 14$  días en medio sólido HEC 20% y  $\geq 21$  días en medio HEC 25% (Anexo 2, tablas IV y V).
- Por su parte, la cepa C205090908-1R, tiene un tiempo de generación colonial muy lento, es de  $\pm 20$  días en medio sólido HEC 25% 45 °C (Anexo 2, tabla VI).

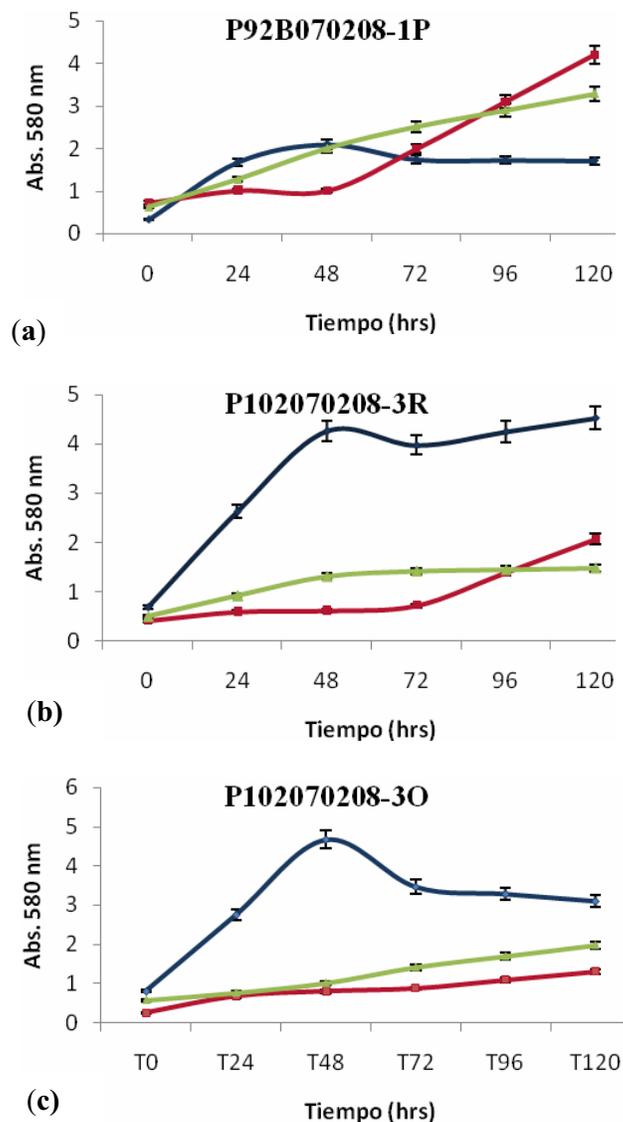
**Tabla VIII.** Cepas obtenidas con los medios utilizados en esta investigación

Características generales				Morfología colonial				Morfología celular			Identificación
Cepa	Medio	Origen	Forma	Margen	Color	Consistencia	Opacidad	Microscopía de contraste de fases	Microscopía electrónica de barrido	Identificación por	Clave de acceso GeneBank
P92B070208-1P	HEC 20%	Salmuera	circular	entero	rosa	mucoide	opaca	Pleomórficas, principalmente cocos y coco-bacilos	Pleomórficas, principalmente cocos y bastones	16S rADN	F1609942
P92A090908-6O	HEC 20%	Salmuera	circular	entero	naranja	viscosa	translúcida	Pleomórficas, principalmente bastones, cuadrados, triángulos, cocos	Pleomórficas, principalmente bastones, cuadrados, triángulos, cocos	16S rADN	F1609945
P92A090908-6P	HEC 20%	Salmuera	circular	entero	lila	viscosa	translúcida	Pleomórficas, bastones, cuadrados, triángulos, cocos	Pleomórficas, principalmente bastones, cuadrados, triángulos, cocos	16S rADN	F1609946
P102070208-3R	HEC 20%	Salmuera	circular	entero	rojo oscuro	viscosa	translúcida	Pleomórficas, bastones, cuadrados, triángulos, cocos	Pleomórficas, principalmente bastones, cuadrados, triángulos, cocos	16S rADN	F1609944

P102070208-30	HEC 20%	Salmuera	circular	entero	naranja	viscosa	translúcida	Pleomórficas, bastones, cuadrados, triángulos, cocos	Pleomórficas, principalmente bastones, cuadrados, triángulos, cocos	16S rADN	F1609943
C205090908-1R	HEC 25%	Cristal	circular	entero	rojo bermellón	viscosa	translúcida	No disponible	Pleomórficas, principalmente cuadrados y algunas formas anguladas irregulares	16S rADN	F1609947

### 9.3. Curvas de crecimiento

Los datos presentados en la figura 5 reflejan sólo parte del ciclo de crecimiento de tres cepas de haloarqueas obtenidas en este estudio: P92B070208-1P, P102070208-3R y P102070208-3O.



**Figura 5.** Curvas de crecimiento. (a) Cepa P92B070208-1P *Halogeometricum* sp. (b) Cepa P102070208-3R *Halobacterium* sp. (c) Cepa P102070208-3O *Halobacterium* sp. Densidad óptica determinada a 580 nm, con un tiempo de generación de 0 a 120 horas, cultivadas en medio HEC al 10% (—), 25% (—) y 30% (—).

La figura 5 (a) corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa P92B070208-1P. En el período de tiempo evaluado (120 horas), en el medio HEC 10% la velocidad de crecimiento es de  $0.056 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 17.69 horas en la fase exponencial. En el medio HEC 25% la velocidad de crecimiento es de  $0.044 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 22.55 horas en la fase exponencial. En el medio HEC 30% la velocidad de crecimiento es de  $0.028 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 34.86 horas en la fase exponencial.

La figura 5 (b) corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa P102070208-3R. En el período de tiempo evaluado (120 horas), en el medio HEC 10% la velocidad de crecimiento es de  $0.074 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 13.39 horas en la fase exponencial. En el medio HEC 25% la velocidad de crecimiento es de  $0.028 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 35.55 horas en la fase exponencial. En el medio HEC 30% la velocidad de crecimiento es de  $0.016 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 59.59 horas en la fase exponencial.

La figura 5 (c) corresponde a la cinética de crecimiento de la cepa P102070208-3O. En el período de tiempo evaluado (120 horas), en el medio HEC 10% la velocidad de crecimiento es de  $0.080 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 12.40 horas en la fase exponencial. En el medio HEC 25% la velocidad de crecimiento es de  $0.018 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 55.55 horas en la fase exponencial. En el medio HEC 30% la velocidad de crecimiento es de  $0.013 \text{ hrs}^{-1}$  y el tiempo de generación es de 74.68 horas en la fase exponencial.

#### 9.4. Identificación filogenética de las cepas

La figura 6 muestra la relación filogenética entre las secuencias obtenidas bajo el modelo de vecino más cercano, utilizando dos secuencias como grupos externos:

- dominio Bacteria, *Escherichia coli* (AB045731)
- dominio Arquea, *Desulfurococcus mobilis* (X06188).

Las secuencias de ADN obtenidas de las cepas, fueron depositadas en la base de datos GeneBank con las siguientes claves de acceso (también se muestran en la tabla VIII):

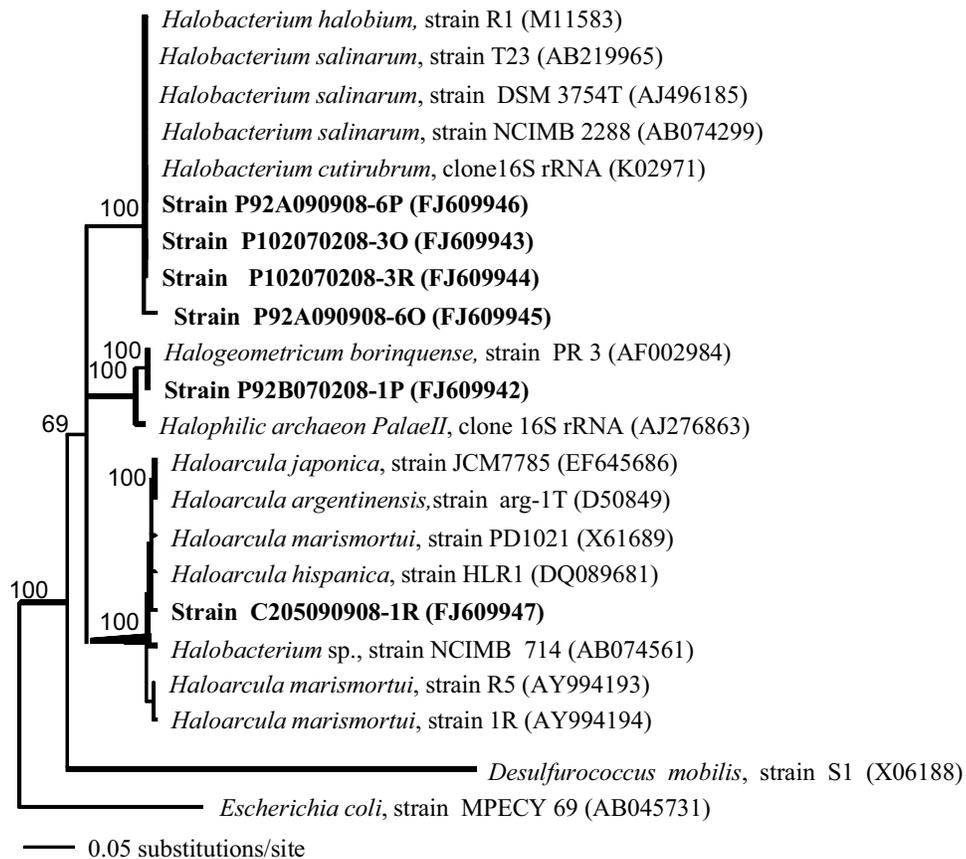
- la cepa **P92B070208-1P** tiene la clave de acceso FJ609942,
- la cepa **P92A090908-6O** tiene la clave de acceso FJ609945,
- la cepa **P92A090908-6P** tiene la clave de acceso FJ609946,
- la cepa **P102070208-3R** tiene la clave de acceso FJ609944,
- la cepa **P102070208-3O** tiene la clave de acceso FJ609943,
- la cepa **C205090908-1R** tiene la clave de acceso FJ609947.

La secuencia FJ609942 tiene una longitud de 1341 y el resultado del emparejamiento BLAST arrojó un valor de 99% de similitud la secuencia AF002984 que corresponde a la cepa tipo PR3<sup>T</sup> de la especie *Halogeometricum borinquense*. En la figura 6 se observa que sólo estas dos secuencias de conforman un grupo monofilético alejado de los otros grupos. Este es un género que hasta el momento contiene una sola especie. Fue aislado por Montalvo-Rodriguez *et al.*, (1998) y está altamente emparentada con miembros del género *Haloferax*. Su estudio ha recibido poca atención. Sin embargo, sus miembros

han sido hallados por métodos independientes de cultivo en diversas salineras (Burns *et al.*, 2004; Maturrano *et al.*, 2006).

Las secuencias FJ609943 (1346 pb), FJ609944 (1334 pb), FJ609945 (908 pb), FJ609946 (1358 pb) corresponden a las cepas **P102070208-3O**, **P102070208-3R**, **P92A090908-6O** y **P92A090908-6P** respectivamente. Mostraron valores de identidad del 99% con la secuencia (AJ496185) de la especie *Halobacterium salinarum* cepa tipo DSM 3754<sup>T</sup> y la secuencia de *Halobacterium halobium* (M11583). El árbol filogenético las agrupa en el conjunto monofilético del género *Halobacterium* spp.

Por su parte la secuencia FJ609947 de 1359 pb de longitud, corresponde a la cepa **C205090908-1R** y el análisis de BLAST la equiparó con la secuencia D50849 con un valor similitud del 99%. Esta secuencia representa a la especie *Haloarcula argentinensis*. El resultado se corrobora con el análisis bioinformático (Fig. 6), el cual ensambla la secuencia dentro del grupo del género *Haloarcula* spp. No obstante con el antecedente del estudio de Javor *et al.*, (1982) se sugiere que esta cepa podría corresponder a *Haloarcula californiae*, de la cual no se conoce secuencia del 16S rADN en ninguna base de datos.

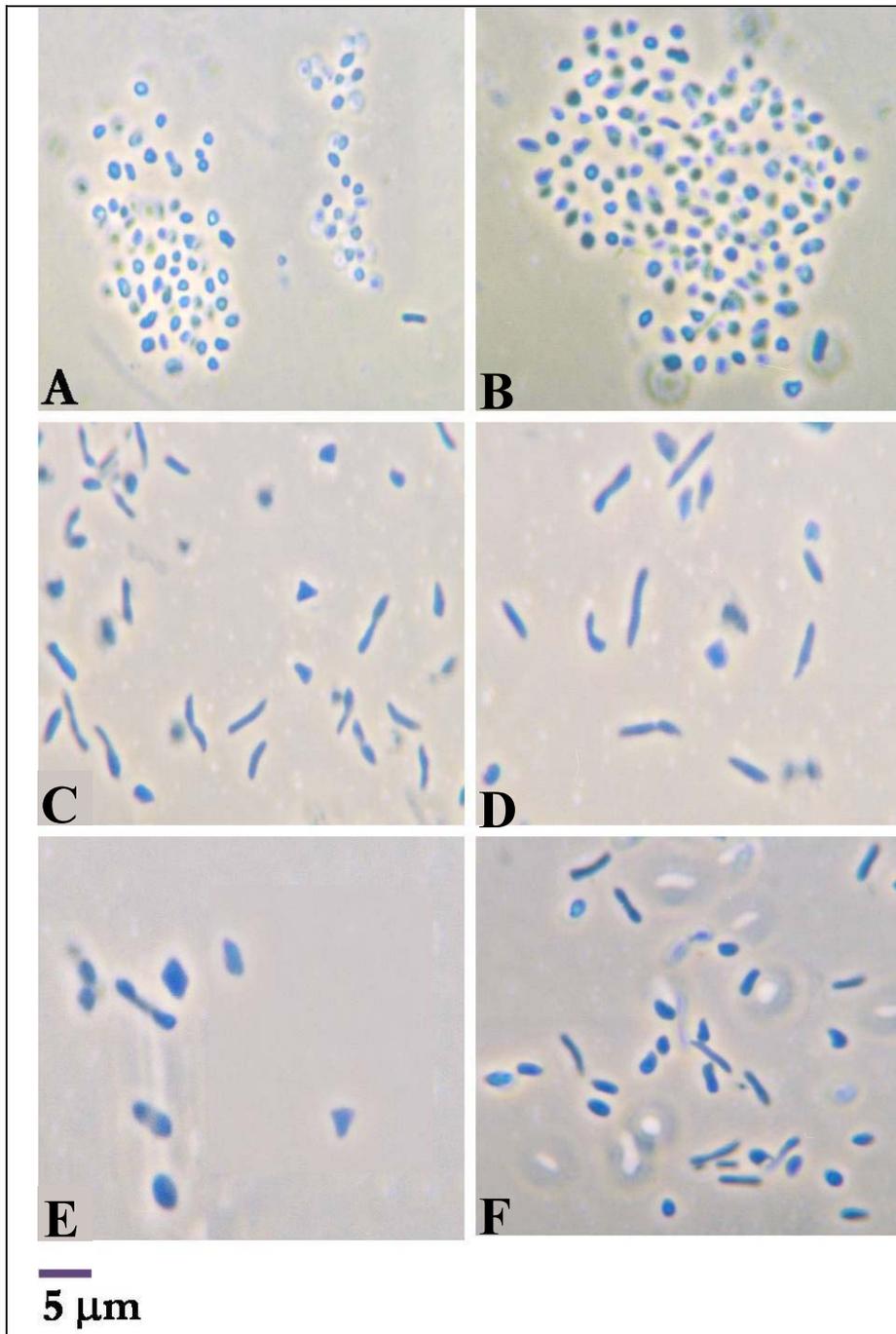


**Figura 6.** Filograma de secuencias parciales (ca. 1359 pb) del 16S rADN de cepas axénicas aisladas de las áreas de concentración 9 y 10, y del cristalizador 20. Se empleó el método basado en distancias Neighbor Joining. El análisis bootstrap fue de 500 réplicas. Se utilizaron las secuencias de 16S rADN de *E. coli* y *D. mobilis* como grupos externos. Las claves que se encuentran entre paréntesis en cada secuencia son los números de acceso GeneBank; y las secuencias en letra bold pertenecen a las cepas aisladas en este estudio. La barra de la escala representa la substituciones por sitio.

### 9.5. Morfologías celulares

Las observaciones al microscopio óptico de contraste de fases, muestran que las cepas P92B070208-1P, P102070208-3O y P102070208-3R, presentan células pleomórficas con diferentes dimensiones en cada caso:

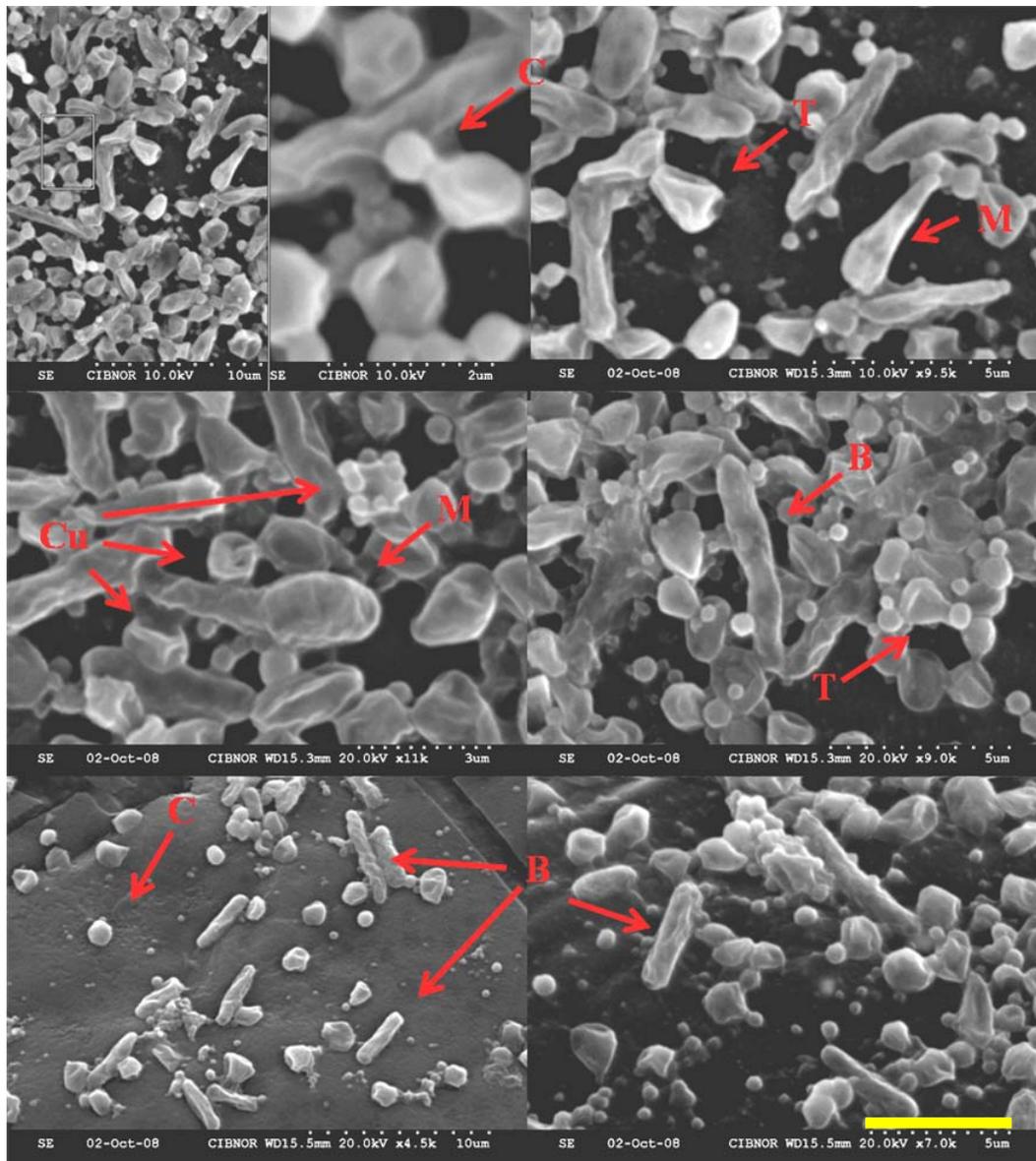
- Figura 7a y 7b, las células de la cepa **P92B070208-1P** que correspondió al género *Halogeometricum* sp., son pleomórficas, se distinguen principalmente cocos, coco-bacilos y bacilos largos, células cuadradas, triángulos y ovals, móviles, con inclusiones citoplasmáticas y se agrupan formando racimos.
- Figura 7c y 7d, las morfologías celulares que presenta la cepa **P102070208-3R** que se relacionó con el género *Halobacterium* sp., son pleomórficas también. Son bacilos largos, triángulos y mazos, son móviles y no presentan inclusiones citoplasmáticas.
- Figura 7e y 7f, las células de la cepa **P102070208-3O** la cual se relacionó también con el género *Halobacterium* sp., son pleomórficas. Se presentan principalmente bacilos largos, esferas, triángulos, mazos y cuadradas. Son células móviles y no presentan inclusiones citoplasmáticas.



**Figura 7.** Micrografías de las morfologías celulares obtenidas con ayuda de un microscopio de contraste de fases (1000X). **A-B**, cepa **P92B070208-1P** *Halogeometricum borinquense*, se observan rasgos pleomórficos celulares predominantemente cocos y cocobacilos, se agrupan en racimos. **C-D**, cepa **P102070208-3R**, *Halobacterium salinarum*, también con rasgos pleomórficos pues se distinguen células angulares, pero principalmente bastones y mazos. **E-F**, cepa **P1020708-3O** *Halobacterium salinarum*, de la misma forma células pleomórficas, se distinguen entre ellas algunas angulares en forma de triángulo y cuadrado.

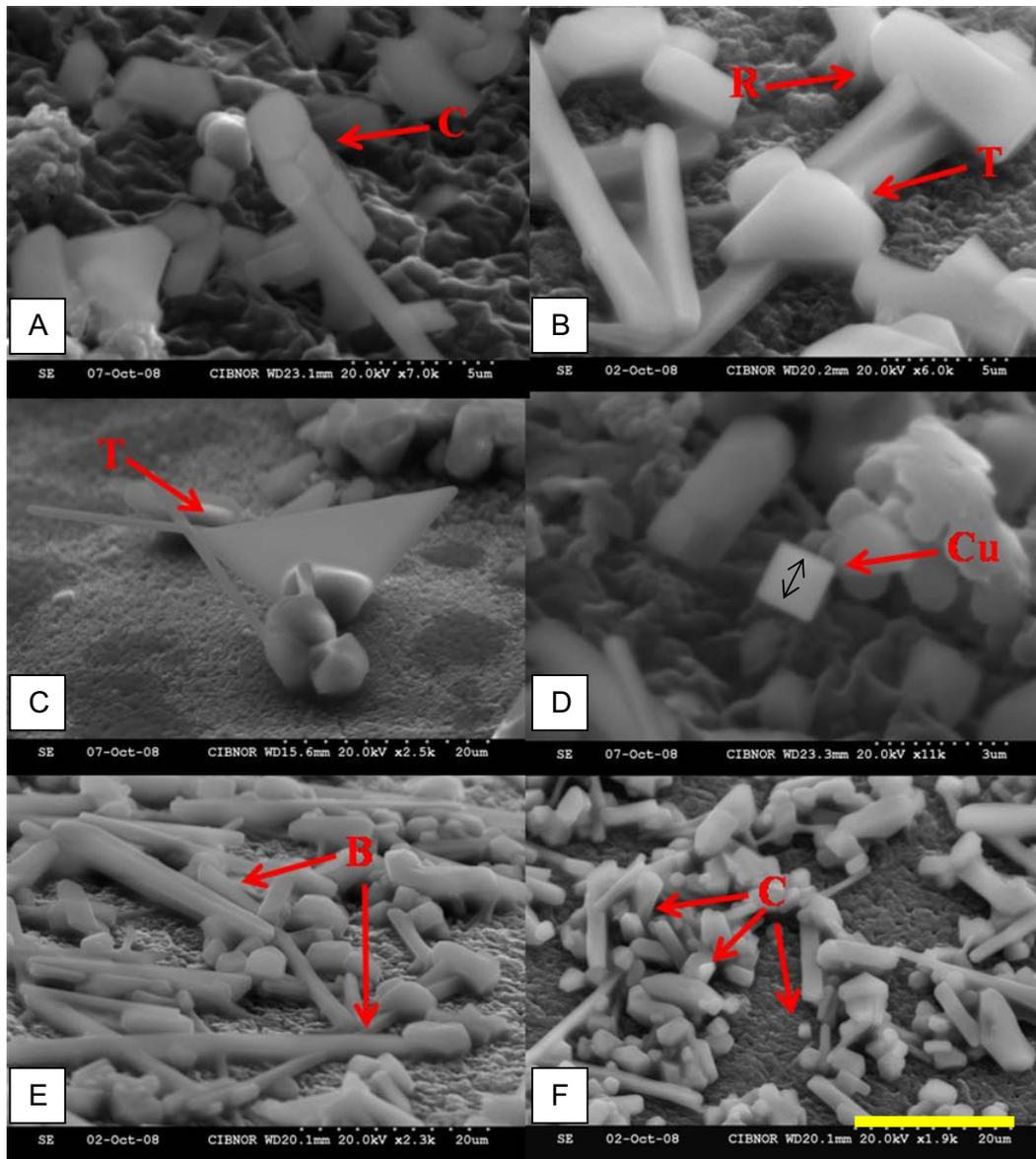
### 9.5.1. Micrografías SEM

Las micrografías expuestas de la cepa P92B070208-1P (*Halogeometricum* sp.) muestran un patrón similar de morfologías celulares que las micrografías obtenidas al microscopio de contraste de fases (Fig. 7). Las células son muy variadas en tamaño, pero se puede distinguir que los diámetros no superan las 3  $\mu\text{m}$ . los cocos y bastones tienen incluso diámetros que van desde 0.5 hasta 1.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Se observan también mazos, algunas células cuadradas, y otras formas más irregulares. Se han mostrado las micrografías que la autora consideró más informativas. En este caso el medio de cultivo sólido fue HEC 20%, las condiciones de incubación fueron sin luz a 37 °C. La colonia muestreada para este estudio tenía 4 días de tiempo de aparición.



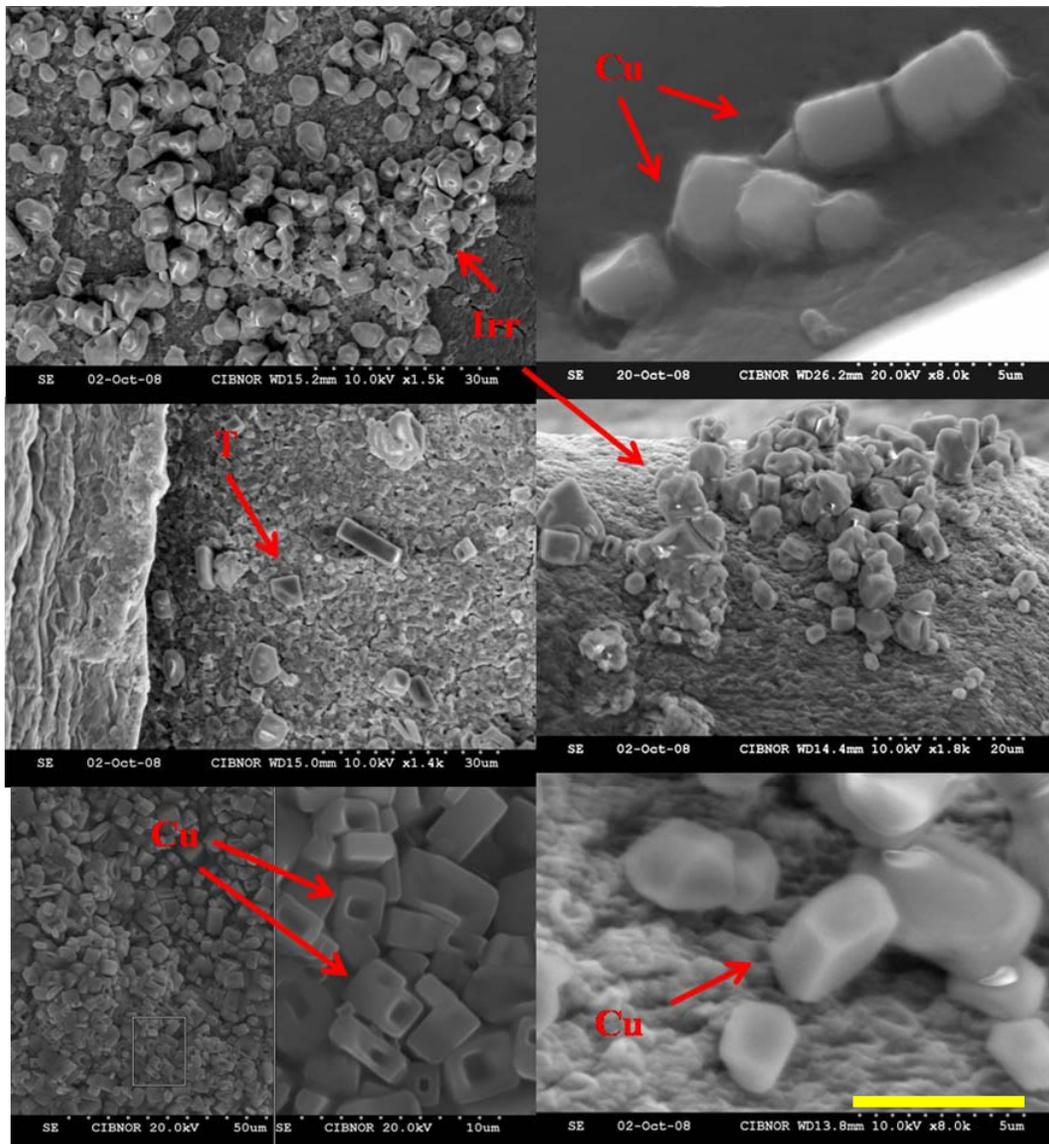
**Figura 8.** Micrografías de la cepa P92B070208-1P, obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Las ampliaciones de las micrografías obtenidas van desde 4500X hasta 10,000X. Las claves en las imágenes refieren a las siguientes formas celulares: C, coco; Cu, cuadradas; B, bastón, T, triangulares; M, mazos. La barra amarilla representa una escala de 5 µm.

Las micrografías están acomodadas en el siguiente orden: A, cepa P92A090908-6O; B, cepa P92A090908-6P; C y D, cepa P102070208-3R; E, cepa P102070208-3O y F, cepa P92A090908-6P. Todas las cepas están en grupo del género *Halobacterium* (Fig. 6) y muestran un patrón similar de morfologías celulares que las micrografías obtenidas al microscopio de contraste de fases (Fig. 7). Las células son muy variadas en tamaño, sin embargo, son un tanto más grandes que las células de la cepa P92B070208-1P (Figs. 7 y 8) Se distinguen predominantemente bastones largos con diámetros no mayores a 1.5  $\mu\text{m}$ , cuadrados, algunas formas poligonales y triangulares. Los diámetros van desde 0.5 hasta 2.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Se han mostrado las micrografías que la autora consideró más informativas. En este caso el medio de cultivo sólido fue HEC 20%, las condiciones de incubación fueron sin luz a 37 °C. Las colonias muestreadas para este estudio tenían entre 10 y 13 días de tiempo de aparición.



**Figura 9.** Micrografías de las cepas P92A090908-6O, P92A090908-6P, P102070208-3R y P102070208-3O, obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Las micrografías muestran diferentes ampliaciones que van desde 1900X hasta 7000X. Las claves en las imágenes refieren a las siguientes formas celulares: C, coco; Cu, cuadradas; B, bastón, T, triangulares; R, rectangulares. Las flecha negra indica el diámetro de una célula cuadrada ( $1.8 \mu\text{m}$ ). La barra amarilla representa una escala de  $20 \mu\text{m}$ .

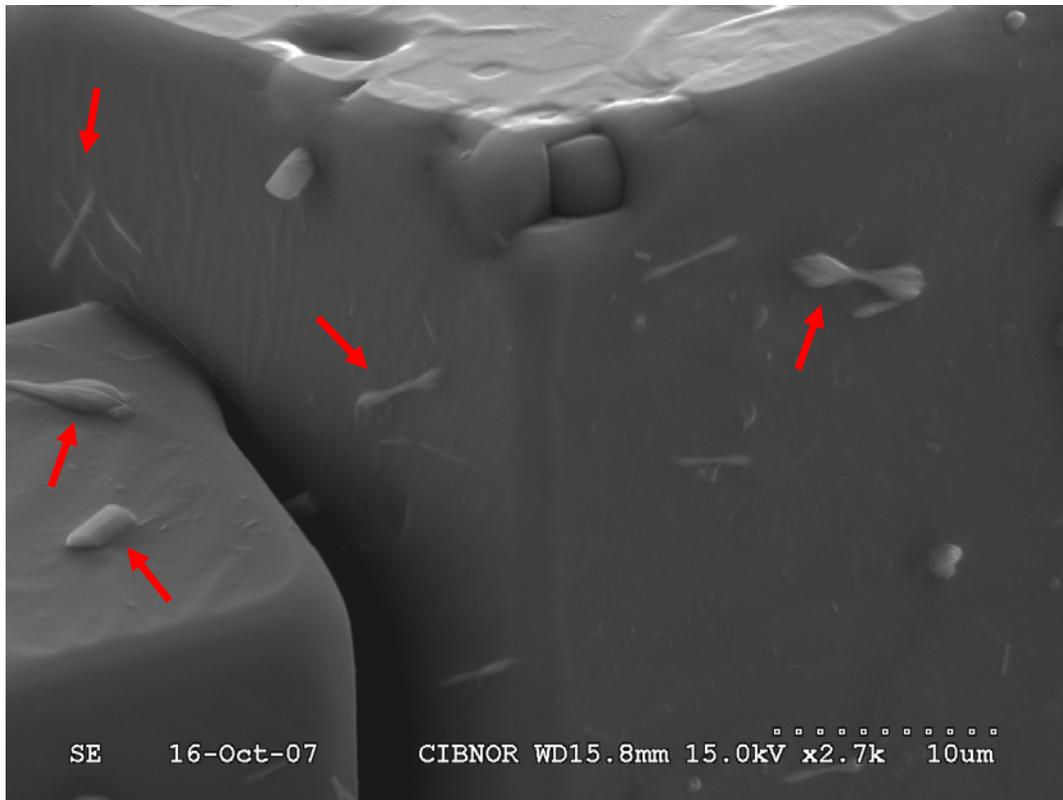
Las micrografías de la figura 9 muestran la cepa C205090908-1R, *Haloarcula* sp. En este caso la mayoría de las células tienen formas angulares, como rectángulos y cuadrados. Sus diámetros no alcanzan a superar los 3  $\mu\text{m}$ . Hay también muchas formas anguladas pero irregulares similares a las reportadas por Javor *et al.*, (1982) y por Stoeckenius (1981). Se han mostrado las micrografías que la autora consideró más informativas. En este caso el medio de cultivo sólido fue HEC 25%, las condiciones de incubación fueron sin luz a 45 °C. Las colonias muestreadas para este estudio tenían entre 2 y 3 días de tiempo de aparición.



**Figura 10.** Micrografías de la cepa C205090908-1R, obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Distinguen formas angulares irregulares y cuadrados; algunos triángulos. Las micrografías tienen diferentes ampliaciones: desde 1400X hasta 8000X. Las claves en las imágenes refieren a las siguientes formas celulares: Irr, angulares irregulares; Cu, cuadradas. La barra amarilla representa una escala de 5  $\mu\text{m}$ .

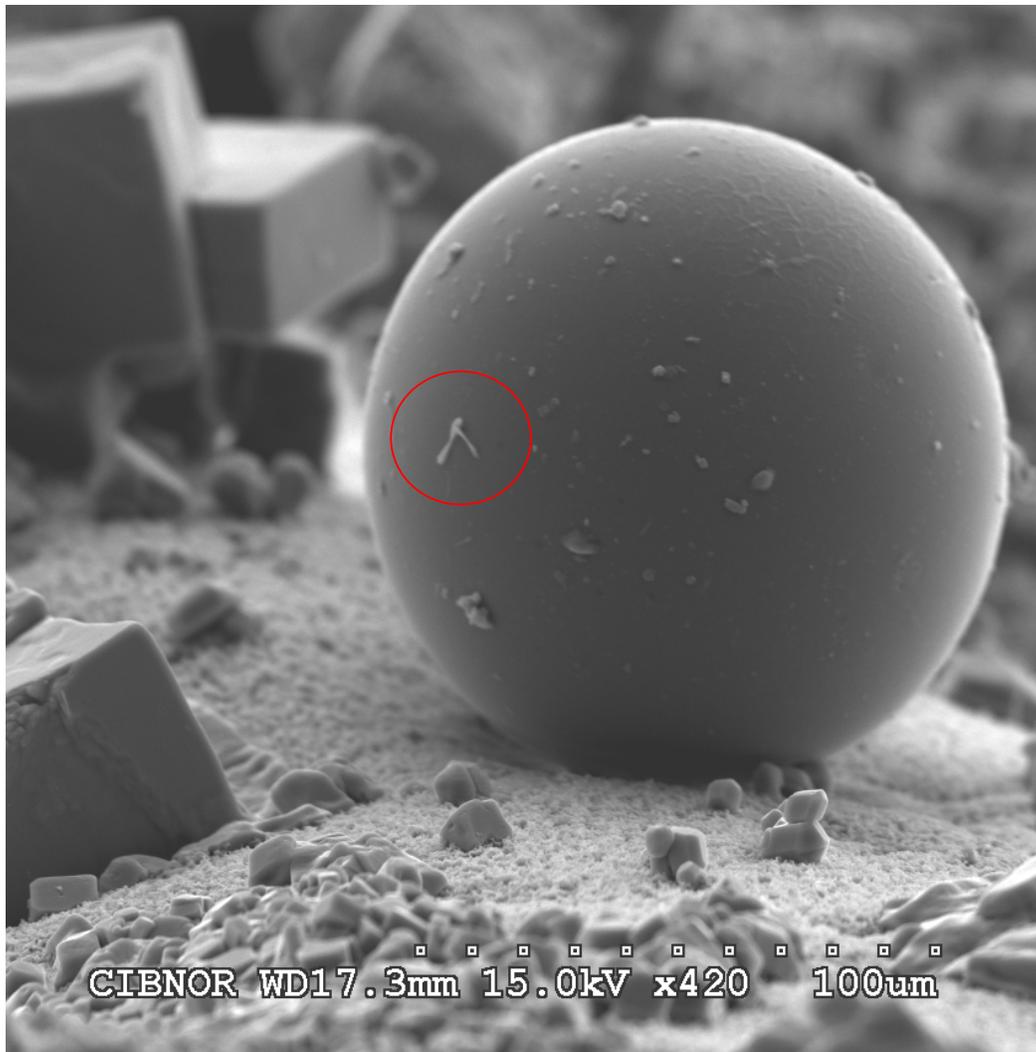
### 9.6. Interacción de haloarqueas con los cristales evaporíticos

Los cristales naturales colectados que se observaron al microscopio electrónico de barrido, muestran algunas morfologías celulares, presentes similares en tamaño y forma a las observadas en las cepas aisladas. Se puede notar en la figura 10 la cual corresponde a una muestra del vaso cristizador 19 algunas células angulares que aparentemente se encuentran adheridas al cristal. Las formas de bastón y mazo son similares a las formas observadas de las cepas P92090908-6P, P92090908-6O, P102070208-3R y P102070208-3O que corresponden a miembros del género *Halobacterium*; y las formas de rectángulo son similares a la cepa C205090908-1R que corresponde al género *Haloarcula*. Cabe destacar que de este sitio no se logró ninguna cepa, sin embargo, la salmuera del mismo presentaba la característica coloración rojo-violáceo que refiere al crecimiento masivo de haloarqueas (Madigan *et al.*, 2004)



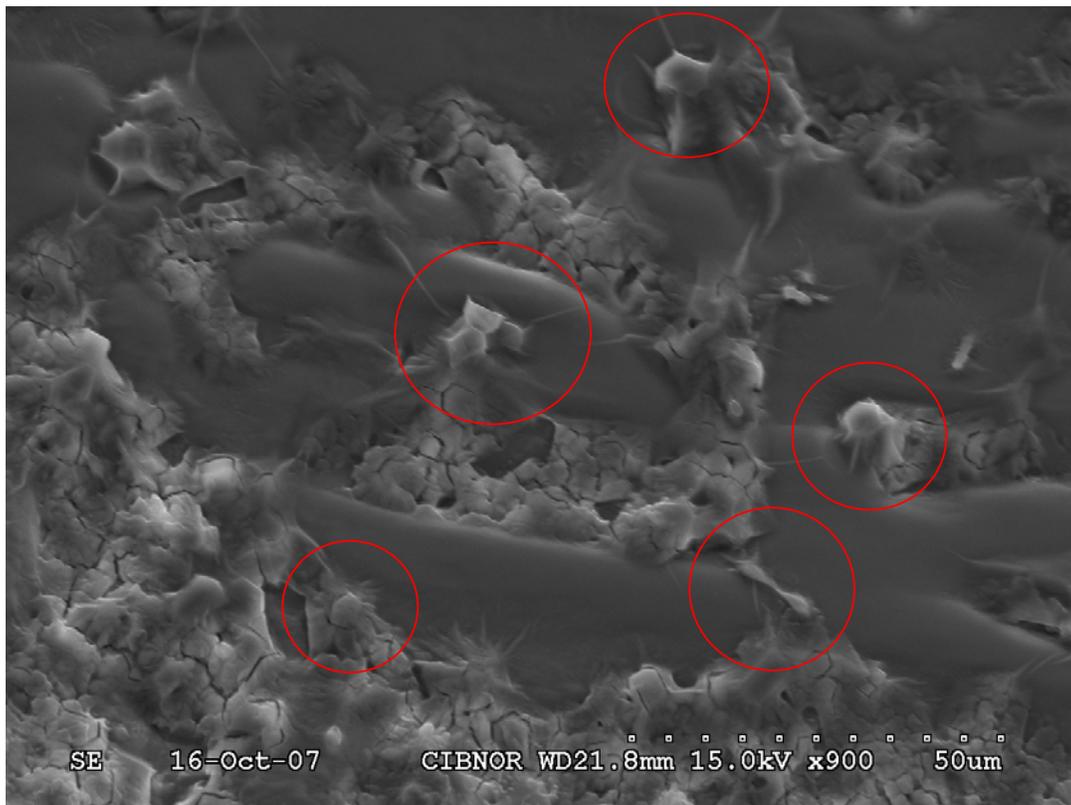
**Figura 11.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta únicamente con Paladio al vacío a 25 mA durante 30 segundos por 2 veces. Dos cristales evaporíticos del cristalizador 19 donde se pueden apreciar, indicadas por flechas rojas, posibles formas celulares de bastones, mazos y rectángulos.

Se sugiere que en la figura 12 la forma redondeada pueda corresponder a un huevo de algún organismo eucarionte halófilo, lo interesantemente distinguido en esta micrografía es la aparente adherencia de dos células similares a las formas celulares bastón y mazo de las cepas P102070208-3R y P102070208-3O observadas en el microscopio de contraste de fases y también sugeridas figura anterior.



**Figura 12.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta con Paladio al vacío a 25 mA durante 30 segundos por 2 ocasiones. Cristales precipitados de la filtración de salmuera en una membrana de 0.45 mm. La muestra proviene del área de concentración 9. Se puede distinguir una forma celular de mazo y una de bastón (círculo rojo), que aparentemente son similares a las observadas previamente en la figura 11 y sugeridas como miembros de arqueas halófilas extremas.

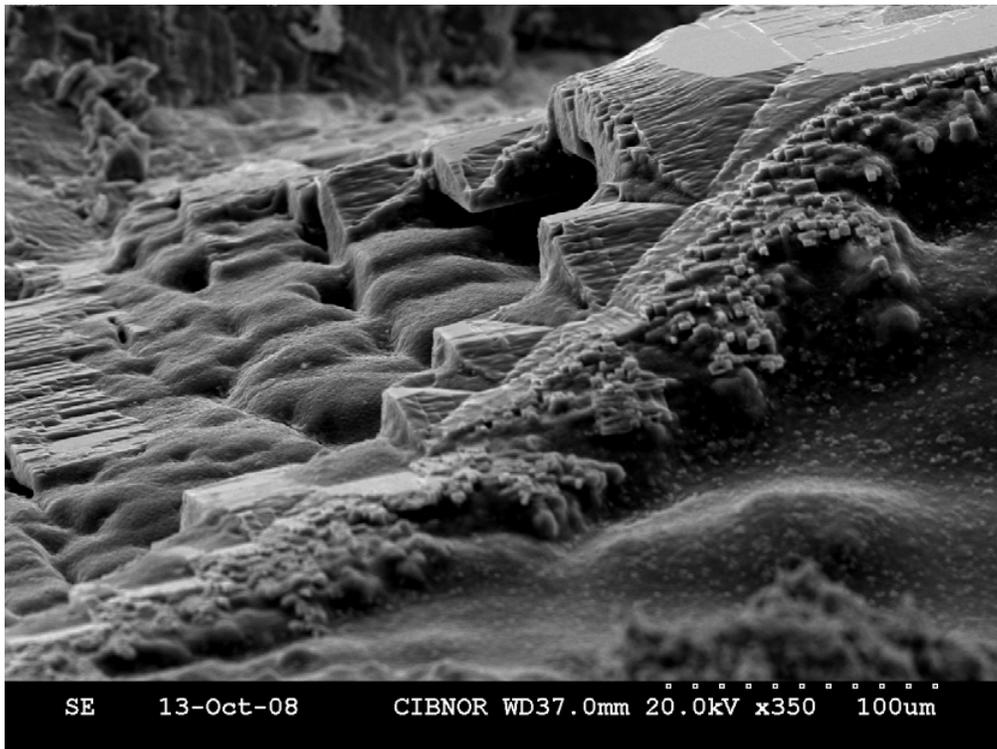
Así también se obtuvieron imágenes de un cristal en forma de pirámide, que se denomina tolva. En este cristal se observan posibles formas celulares adheridas a la roca. Se observan ramificaciones en estas formas que sugieren algún expolímero con el cual aparentemente se mantienen adheridas a la pared del cristal (Fig. 13).



**Figura 13.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta con Paladio al vacío a 25 mA durante 30 segundos en 2 ocasiones. La figura muestra un acercamiento a la pared de un cristal natural de NaCl en forma de pirámide (tolva) colectado en el cristizador 19. En esta pared se distinguen aparentes formas celulares adheridas al cristal (círculos rojos).

### 9.6.1. Interacción de las cepas y los cristales formados artificialmente

Se presenta en la figura 14 la micrografía de la cepa P92B070208-1P (*Halogeometricum borinquense*) poblando un cristal en forma de tolva truncada. Este cristal se formó artificialmente en el laboratorio en un cultivo de la misma cepa con el medio HEC 20% a temperatura ambiente en un período posterior a 21 días. Se observa una estrecha relación entre la colonia y el cristal. Aparentemente la colonia va creciendo en las paredes laterales del cristal y no en la parte superior.



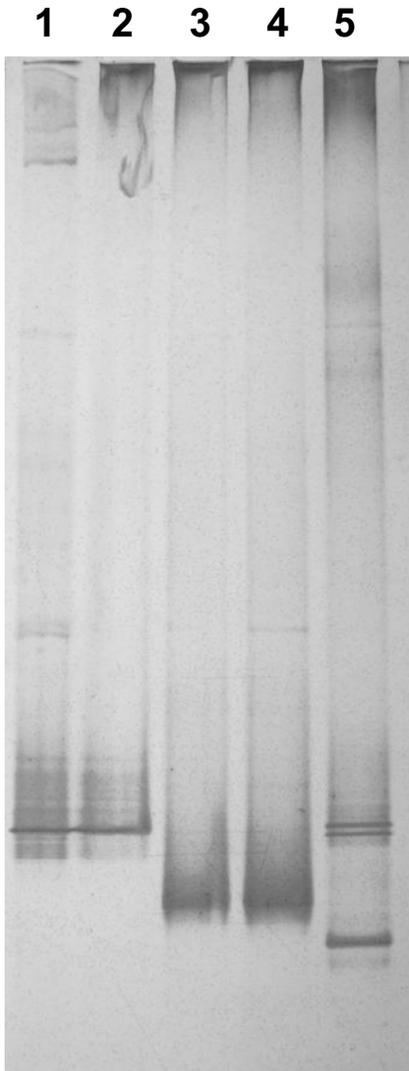
**Figura 14.** Micrografía obtenida al microscopio electrónico de barrido (SEM). Muestra recubierta con Paladio al vacío a 25 mA por 30 segundo 2 veces. La micrografía corresponde a una colonia de la cepa P92B070208-1P que se encuentra encima de una tolva. La muestra fue obtenida de una caja petri que contenía colonias axénicas de la cepa, así como cristales que formaron al transcurrir el tiempo (> 30 días).

### 9.7. Análisis de la comunidad natural por la estrategia PCR-Anidado-DGGE

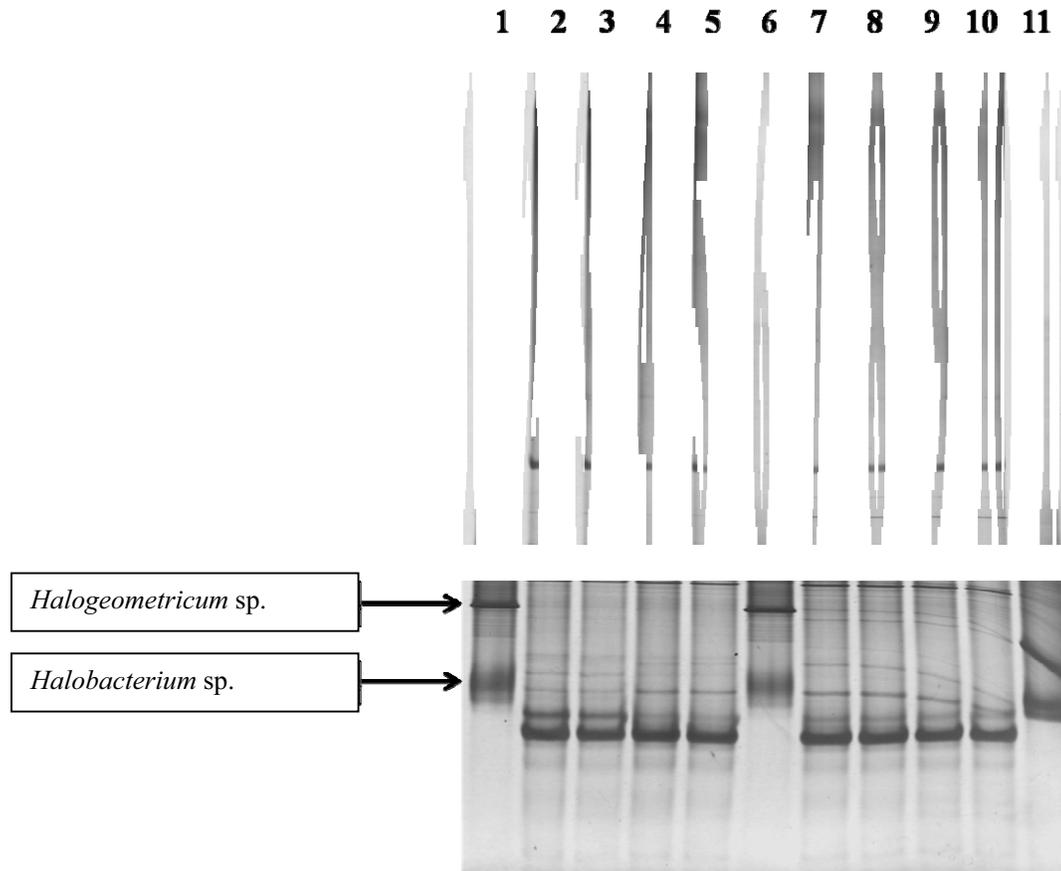
Con la amplificación de un fragmento del 16S rARN de 563 pb se obtuvieron productos de tamaño suficiente para el análisis en DGGE tanto para las 4 muestras ambientales de salmuera como para las cepas. Se utilizaron los productos de PCR de las cepas que provienen de las áreas de concentración 9 y 10 como estándares para el análisis del gel de DGGE. En el caso de dos cepas (P102070208-3R y P102070208-3O) que corresponden a miembros de *Halobacterium*, ocurrió un barrido en todos los geles realizados (datos no mostrados), que no permitió distinguir si existía alguna alineación de en el patrón de bandas que DGGE resolvió para las muestras naturales. Se presume este error se deba a que durante el PCR se generan muchas copias que tienen diferencias mínimas en las bases generando así un barrido en vez de una banda conspicua (Green, 2006). No obstante, para este estudio, se utilizó como banda real. Cada cepa tuvo un apilamiento distinto en el gel, con excepción de las dos cepas de *Halobacterium* que obtuvieron un patrón de alineamiento en la aparente misma posición (Fig. 14).

Se detectaron 12 unidades taxonómicas operacionales (OTU's) en el área de concentración 10, y 10 OTU's en el área de concentración 9. Diferencias en la composición de arqueas fue detectada cuando se comparó entre ambas áreas (Fig. 15). No obstante, 5 bandas mostraron ser más intensas y comunes en todos los casos. Esto sugiere la presencia de cinco poblaciones dominantes con respecto de las otras. Cabe resaltar que ninguna de éstas, se alineó con las bandas de los estándares. Se presume éstas bandas correspondan a poblaciones reales de arqueas hasta el momento no cultivables.

Aparentemente, la presencia de *Halobacterium* ocurrió en ambos estanques, mientras que la presencia de *Halogeometricum borinquense* fue detectada por DGGE (Fig. 15) y aislada sólo en el estanque 10.



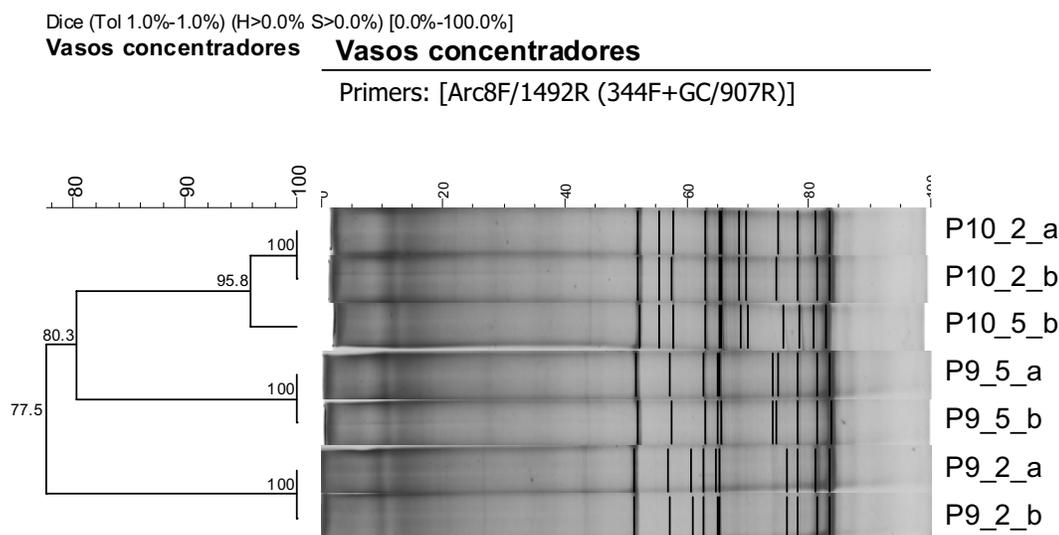
**Figura 15.** Gel de DGGE (acrilamida-bis-acrilamida 40% [vol/vol] urea-formamida), teñido con nitrato de plata. El gradiente desnaturizante fue del 30 al 70% y la electroforesis fue corrida durante 18h a 60°C y 50V. Se muestra la separación de los fragmentos del gen 16S rARN amplificados con dos estrategias: PCR y Nested-PCR con primers universales del dominio arquea [ARC8F/1492R(344F+GC/907R)]. En todos los casos la pareja de primers usada única o últimamente para el gel es la que contiene la pinza de GC. En todos los casos la concentración del amplicón obtenido es 1X. Los carriles se leen de izquierda a derecha. Carril **1**, *Halogeometricum* sp., (Nested-PCR), carril **2**, *Halogeometricum* sp., (PCR); carril **3**, *Halobacterium* sp (cepa roja); carril **4** *Halobacterium* sp (cepa naranja); carril **5**, *Haloarcula* sp.



**Figura 16.** Gel de DGGE (acrilamida-bis-acrilamida 40% [vol/vol] urea-formamida), teñido con nitrato de plata. El gradiente desnaturalizante fue del 30 al 70% y la electroforesis fue corrida durante 18h a 60°C y 50V. Se muestra la separación de los fragmentos del gen 16S rARN amplificados con la estrategia PCR-anidado (Nested-PCR), a un concentración 1X, con primers universales para el dominio arquea [ARC8F/1492R (344F+GC/907R)]. Muestras naturales y estándares a partir de cultivos (HEC 20%), en condiciones aeróbicas, provenientes de las áreas de concentración 9 y 10, (21% de salinidad). Los carriles se leen de izquierda a derecha, carriles 1, 6 y 11, Standard (mezcla de *Halogeometricum* sp., y *Halobacterium* sp.). Carriles 2 y 3, muestra natural salmuera P9\_2; carriles 4 y 5 muestra natural salmuera P9\_5; carriles 7 y 8, muestra natural salmuera P10\_2; carriles 9 y 10, muestra natural salmuera P10\_5.

### 9.8. Análisis de la comunidad de arqueas en el área de concentración 9 y 10

El análisis de agrupamiento con el modelo de Dice por medio de Gel ComparII, establece que en el área de concentración 9 se detectan 12 OTU's y en el área de concentración 10 se detectan 10 OTU's. De acuerdo con este análisis, se puede distinguir un agrupamiento principal donde se encuentra las muestras del área de concentración 10, transecto 2 m y 5 m. De las doce bandas que se definieron como OTU's, y normalizaron existe un 95.8% de valor de similitud bajo el análisis de agrupamiento, así se establece un agrupamiento muy cercano. No obstante en el área de concentración 9 el resultado fue distinto. El análisis forma dos grupos; en ambos puntos de muestreo existen la misma cantidad de OTU's pero aparentemente el patrón de bandas migró distinto haciendo que el análisis estableciera dos grupos separados que sugiere que existe una relación distante.



**Figura 17.** Análisis de grupos por Gel Compar II. Se muestra el análisis de cluster UPGMA (por sus siglas en inglés, Unweighted Pair Group Method Arithmetic mean), en donde se puede observar que el índice de similitud es más alto en el cluster del área de concentración 9 con respecto al área de concentración 10.

## 9.9. Resultados complementarios

### 9.9.1. Análisis de grupos bacterianos halófilos extremos

Asimismo, se lograron cultivos enriquecidos en todos los sitios a partir de muestras de salmuera (10mL) sin filtrar con el medio DG (50mL), el cual contiene 16% de concentración de sales totales. Posterior a un período largo incubación en condiciones de luz-obscuridad, a temperatura ambiente y sin agitación, se obtuvieron en todos los sitios cultivos mixtos enriquecidos con diferente color como se observa en la tabla IX. El período de incubación en todos los casos fue largo (*ca.* 90 días). Para todos los casos el ADN fue extraído.

**Tabla IX.** Sitios enriquecidos con el medio DG específico para el género *Chroflexus*, bajo condiciones de luz-oscuridad de 12 h, a una temperatura de 22-32 °C, sin agitación. El orden de los sitios ha sido colocado de mayor a menor salinidad previamente indicado en la tabla VI.

Sitio	Medio	Muestra	Tiempo de incubación	Color del enriquecimiento
<b>P9_2</b>	DG 16%	Salmuera	2 meses	Verde claro
<b>P9_5</b>	Líquido			
<b>P10_2</b>	DG 16%	Salmuera	2 meses	Verde claro
<b>P10_5</b>	Líquido			
<b>C19_2</b>	DG 16%	Salmuera	2 meses	Rosa brillante, una capa verde olivo en la superficie
<b>C19_5</b>	Líquido			
<b>C20_2</b>	DG 16%	Salmuera	2 meses	Rosa brillante, una capa verde olivo en la superficie
<b>C20_5</b>	Líquido			
<b>A1B_2</b>	DG 16%	Salmuera	2 meses	Rosa pálido
<b>A1B_5</b>	Líquido			
<b>A5B_2</b>	DG 16%	Salmuera	2 meses	Rosa pálido
<b>A5B_5</b>	Líquido			

### 9.9.2. Tabla de cultivos de *Rhodovibrio* sp.

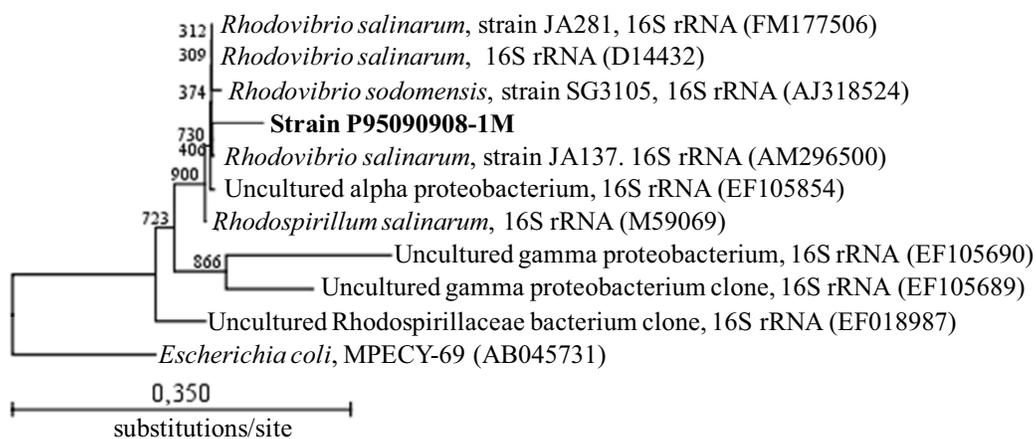
Se obtuvieron 7 cultivos de la jarra de anaerobiosis. El período de incubación fue largo (> 120 días). Todos los cultivos obtenidos presentaron las mismas características coloniales y celulares. Se presentan bacilos muy largos y delgados, con un diámetro aproximado de 4  $\mu\text{m}$ . Todas las cajas presentaron el mismo patrón de colonización, y las observaciones al microscopio de contraste de fases permitieron suponer que los cultivos obtenidos se encontraban axénicos y que en todos los casos se creció la misma especie de bacteria fototrófica anoxigénica.

**Tabla X.** Se muestran los sitios en donde se obtuvieron los cultivos con la jarra de anaerobiosis utilizando el medio DG 16%.

Sitio	Morfología colonial				Morfología celular
	color	textura	margen	opacidad	
<b>P9_2</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	Bacilos largos filamentosos, ca. 4 $\mu\text{m}$
<b>P9_5</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	Bacilos largos filamentosos, ca. 4 $\mu\text{m}$
<b>P10_2</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	----
<b>P10_5</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	Bacilos largos filamentosos, ca. 4 $\mu\text{m}$
<b>C19_5</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	Bacilos largos filamentosos, ca. 4 $\mu\text{m}$
<b>C20_2</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	----
<b>A5B_5</b>	magenta	lisa, viscosa	discontinuo, plana	opaca	----

### 9.9.3. Identificación de una cepa de bacteria fototrófica anoxigénica

El análisis bioinformático arrojó un filograma que se muestra en la figura 18. En él se puede observar que la cepa P95090908-1M se inserta en el grupo del género *Rhodovibrio* spp. Esta bacteria pertenece al filo de las gamma-proteobacterias. El valor de similitud que despliega el análisis de BLAST es de 99% con la secuencia del 16S rARN AM296500 de GeneBank que representa la especie de *Rhodovibrio salinarum*.



**Figura 18.** Filograma de secuencias parciales (ca. 734 pb) del 16S rADN de la cepa axénica P95090908-1M, aislada del área de concentración 9. Se empleó el método basado en distancias de vecino más cercano. El análisis bootstrap fue de 500 réplicas. Se utilizó la secuencia de 16S rADN de *E. coli* como grupo externo. La barra de la escala representa la sustituciones por sitio.

## 10. Discusión

La mayoría de las cepas obtenidas corresponden al género *Halobacterium* sp. (4 de 6). En la misma condición de cultivo (37 °C, sin luz, medio HEC 20%), las 4 cepas que correspondientes a *Halobacterium* sp., tuvieron un tiempo de aparición de sus colonias de alrededor de 10 días. En el caso de la cepa de *Halogeometricum* sp., su tiempo de aparición fue mayor, observándose a los 2 días las primeras colonias. Por último para el caso de la cepa de *Haloarcula* sp., su crecimiento fue muy lento. Se presentaron las primeras colonias hasta las 4 semanas aproximadamente, incluso cuando se le cultivó en las condiciones óptimas de crecimiento para los miembros de su género. El aislamiento de la C205090908-1R *Haloarcula* sp., involucró menos pasos pero requirió más tiempo. Requiere más salinidad y más temperatura que las otras (40 °C, sin luz, medio HEC 25%). A diferencia de las demás fue la única cepa extraída de la inoculación de los cristales de sal y fue la única obtenida de un vaso cristalizador. Cabe resaltar que en todos los casos, los rangos fisiológicos de cloruro de sodio, magnesio, de pH y temperatura fueron similares con los valores reportados del manual Bergey (Grant *et al.*, 2001). Para el caso de la cepa P95090908-1M *Rhodovibrio* sp., la historia fue diferente, pues requirió un medio muy específico, condiciones anaerobias para su crecimiento y el tiempo de aparición de las colonias superó los 4 meses. Debido a esta característica su estudio se redujo a la mera identificación por 16S rARN.

Las morfologías coloniales observadas en todas las cepas fueron similares en textura pero diferentes en color (Tabla 8). Las únicas excepciones de este caso fueron la cepa P92B070208-1P *Halogeometricum* sp., y P95090908-1M *Rhodovibrio* sp. La primera

tiene una textura mucoide, y la segunda presenta colonias discontinuas y planas (Tabla 10).

Las cinéticas de crecimiento dejaron evidencia de la tolerabilidad a la salinidad de cada cepa. P92B070208-1P *Halogeometricum* sp., muestra un rango más amplio de tolerancia a la salinidad. Sin embargo la velocidad de crecimiento calculada en la fase exponencial muestra que en cada medio su crecimiento se comportará de distinta manera, pues con HEC 10% se necesitan 17.69 horas para que la población se duplique, aparentemente la fase exponencial ocurre en 24 horas; con HEC 25% es necesario 22.55 horas para que la población se duplique y la fase exponencial se presenta hasta las 48 horas, y con el medio HEC 30%, el cálculo indica que la población necesita 34.86 horas para duplicarse, un tiempo largo.

Para las otras dos cepas, las cuales corresponden al género *Halobacterium*, la situación fue similar con el medio HEC 10% en donde se observa que el tiempo de generación es de 13.39 horas para P102070208-3R y 12.40 horas para P102070208-3O. Sin embargo con los medios HEC 25% y HEC 30% la situación es un tanto distinta. Aparentemente, el crecimiento para la segunda cepa es más prolongado que para P102070208-3R. Además en la figura 5 se puede observar como el medio en donde se desarrollan mejor es el HEC 10%. Esto sugiere que su rango óptimo de crecimiento es 1.3 M NaCl a diferencia de la cepa P92B070208-1P que su crecimiento óptimo es con el medio HEC 25% (3.3 M NaCl). Estos datos mantienen la misma correspondencia con el manual Bergey (Grant *et al.*, 2001)

### 10.1. Filogenia de arqueas, problemas de identidad

En el dominio Arquea, a lo largo de la historia han existido problemas en la identidad de las cepas que han dejado confusión (Grant *et al.*, 2001). La carencia de datos en el pasado resultó en muchas cepas depositadas pertenecientes al género *Halobacterium* con hibridaciones ADN-ADN de menos del 70%. Otros problemas particulares incluyen la pérdida de especies tipo de *Halobacterium*, la cepa tipo de *Haloarcula marismortui* y diferencias en las cepas tipo de *Halorubrum trapanicum* de diferentes colecciones. Se han hecho intentos para re-direccionar la situación, estableciendo neotipos con mayores estudios comparativos. Asimismo, los epítetos de *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium cutirubrum* y *Halobacterium halobium* en ocasiones han mostrado relaciones de hibridación ADN-ADN del 100%.

En este estudio, todas las secuencias obtenidas tuvieron un 99% de similitud con especies de arqueas halófilas extremas reportadas en GeneBank. Si bien, la aproximación filogenética del 16S rADN permitió un acercamiento taxonómico de las cepas, en el caso de las cuatro cepas obtenidas de *Halobacterium sp.*, no ocurrió así. El análisis filogenético lo muestra. Las cepas pertenecen al mismo grupo pero no hubo una similitud del 100%, incluso los alineamientos realizados entre éstas secuencias muestran que existen pequeñas diferencias de bases. Se propone que estas diferencias se deban a errores de secuenciación. No obstante, las diferencias fenotípicas entre estas cuatro cepas de *Halobacterium sp.*, mostraron sólo una distinción, su color colonial. Las micrografías no distinguieron entre ellas debido a su carácter pleomórfico. Así pues para resolver este conflicto taxonómico, será necesario profundizar en su estudio taxonómico. El acercamiento polifásico es la mejor estrategia para coleccionar la máxima

cantidad de información. Utilizar marcadores quimiotaxonómicos, hibridaciones ADN-ADN, otros marcadores moleculares como el 23S e incluso la secuenciación del genoma serán las estrategias para esclarecer estas pequeñas diferencias detectadas entre estas 4 cepas.

La microscopía permitió la adquisición de micrografías para comparar con la literatura (Stoeckenius, 1981; Javor *et al.*, 1982; Kessel y Cohen, 1982; Oren *et al.*, 1999; Young, 2006). En todos los casos se detectaron múltiples formas. C205090908-1R *Haloarcula* sp., presenta formas similares a las reportadas por Javor *et al.*, (1982): rectángulos irregulares, cuadrados, trapezoides, ovoides, triángulos y otras formas poligonales redondeadas. Menciona también que al incrementar en el medio de cultivo la salinidad las formas se vuelven rectángulos regulares. Es importante recalcar que la cepa estudiada por Javor fue aislada de ESSA también. La literatura refiere que las cepas de haloarquea que no presentan formas cocoidales asumen una variedad de formas desde discos, bastones hasta formas angulares irregulares o incluso cuadrados como el género *Haloquadra* (antes *Haloquadratum*) que fue descubierto por Walsby en 1980 y ha sido identificado en diferentes salineras (Kessel y Cohen, 1982; Maturrano *et al.*, 2006), y recientemente aislado por Burns *et al.*, (2004a). Observando las micrografías varias preguntas han surgido:

Si todas las células de una cepa tienen la misma historia de vida ¿Por qué se presentan diferencias morfológicas entre estas?

¿Las morfologías observadas son diferentes estados de crecimiento celular?

¿Podrá ser la morfología de cada célula herencia de su ancestro inmediato?

¿Podrá el medio afectar de manera particular a cada célula de la misma cepa?

¿Cuál es el mecanismo activador que provoca pleomorfismo?

En sí ningún autor ha logrado hipotetizar sobre la presión de selección que origina el pleomorfismo. Sin embargo algunas ideas han sido propuestas. Por ejemplo Young (2006) menciona que el desarrollo de diversas formas celulares probablemente haga más flexible la capacidad para contender contra los cambios dramáticos de la presión osmótica. También se ha planteado que el pleomorfismo en algunas cepas de haloarquea que no son cocoidales se deba a la carencia de la presión de turgor que permite a la célula la formación de esquinas (Grant *et al.*, 2001). Sin embargo, Walsby (1980) ha planteado que la presión osmótica no dicta la forma, pues la concentración de sales interna es igual a externa. No obstante, Javor *et al.*, (1982) argumenta que en condiciones ambientales estas células son problemente como cualquier otro microorganismo cuando experimentan incrementos abruptos en las presiones osmóticas internas, por ejemplo cuando llueve o las altas mareas diluyen los cristalizadores. Hipotetiza además que estas células y su relativa suave pared (compuesta únicamente de una glicoproteína) permiten un gran incremento en su volumen interno con un pequeño cambio y su envoltura celular. La tendencia de ciertas formas a deformarse sin lisarse puede representar otra adaptación morfológica en los ambientes dominados por la difusión y la presión osmótica (Young, 2006). También se argumenta que en un ambiente carente de nutrientes la formación de varillas incrementa el área de superficie sin gastar energía en el incremento de volumen (Young, 2006).

Sin duda la adaptación bioquímica es un rasgo de selección que origina la forma celular, pero los mecanismos bajos los cuales se rigen estas presiones selectivas continúan siendo debate. Aún así analizar alguna de estas cuestiones podría arrojar datos valiosos

para comprender la importancia de la morfología celular como un rasgo de selección en las haloarqueas.

## **10.2. Análisis de la comunidad de arqueas halófilas extremas presentes**

De acuerdo con el patrón de migración del análisis de DGGE, *Halogeometricum* sp., se encuentra representada sólo en el área de concentración 10. Esta sugerencia tiene sentido puesto que la cepa sólo se logró aislar en este sitio. Por el contrario, *Halobacterium* sp muestra presencia en ambos sitios, esto se confirma con los aislamientos. Si bien, con la técnica de DGGE la resolución de la banda para esta especie resultó en una banda indefinida, la figura 15 muestra la aparente señal de esta población en las muestras naturales con una pequeña y tenue banda que no está tan representada como las otras cinco. Aún así, esta banda se consideró dentro del análisis estadístico como de los doce OTU's establecidos para el análisis de agrupamiento. Y, aunque existe un sesgo por el reducido número de muestras extraídas del sitio, los resultados sugieren que en el área de concentración 10 la complejidad de la comunidad es similar.

También hay que considerar que la presencia de las doce bandas no necesariamente representa a doce poblaciones distintas de haloarqueas. Kamekura *et al.*, (2004), hacen mención de la heterogeneidad de secuencias del 16S rADN que se pueden encontrar en el genoma de una cepa de haloarquea. Con base en ellos, se sabe por ejemplo que *Haloarcula marismortui* contiene dos operones definidos en su genoma el *rrnA* y el *rrnB*, que existen 74 bases substituídas entre ellas que significan el 5.0% de diferencia

de 1472 pares de bases y que este número es más o menos similar al de otros miembros de *Haloarcula* reportados *Har. vallismortis* (3.3%), *Har. sinaiensis* (2.7%) y *Har. quadrata* (5.0%). Así también hay que recordar que los métodos electroforéticos pueden presentar artefactos que se formen durante la migración de las bandas a través del campo eléctrico. Bajo este contexto, se podría cuestionar si cada una de las bandas corresponde a diferentes poblaciones de haloarquea. Sin embargo la autora propone a estas bandas como representantes de poblaciones reales.

Por otro lado, Burns *et al.*, (2004) refieren que bajo la visión tradicionalista de métodos de cultivo, los grupos dominantes de un ambiente a estudiar pueden estar pobremente representados, y el panorama que se obtenga será distinto a la realidad. Aparentemente en este caso se presenta lo mismo. En ambos geles, el patrón de migración de los estándares fue diferente con respecto al patrón que presentaron las muestras naturales, las cinco bandas más intensas que se encuentran en ambos sitios no se lograron identificar. Éstas, sugieren la presencia de poblaciones de arqueas halófilas no cultivables que aparentemente son las que ocurren con mayor dominancia en los vasos concentradores estudiados. Cabe resaltar que los medios de cultivos utilizados son genéricos para haloarqueas. Aún así, no se descarta la presencia de arqueas metanógenas halófilas extremas, como los géneros *Methanohalobium spp.*, *Methanohalophilus spp.*, (Zhilina y Zavarzin, 1990) y *Methanococoides spp.*, (Janke *et al.*, 2008); esta propuesta está basada en dos fundamentos: 1) las evaporitas de yeso-anhidrita de las áreas de concentración proveen las condiciones de refugio para organismos anaerobios; 2) los iniciadores utilizados en la técnica PCR-anidado-DGGE

son universales para el dominio arquea y no específicos para la familia Halobacteria (Teske *et al.*, 2001; Burcin-Mutlu *et al.*, 2008).

En ningún caso se obtuvieron secuencias ni se lograron aislar algunas de las bandas más representadas. Por el período de tiempo que se tiene para investigación de maestría, no se logró estandarizar el protocolo de elución de ADN del gel, reamplificación y secuenciación. Así mismo, Green (2006), señala la importancia del uso de la clonación de productos como parte del protocolo de DGGE para la obtención de secuencias de calidad confiable. Este procedimiento no fue parte de los objetivos para esta investigación. Aún así se sugiere que en próximos intentos se estandarice el método de clonación para productos de PCR de haloarqueas para un análisis más productivo.

### **10.3. Arqueas e interacción con los cristales de sal**

Se sabe que las poblaciones de haloarqueas rojas en los cristalizadores absorben radiación solar que incrementa la temperatura propiciando la precipitación de minerales de la salmuera (Antón *et al.*, 1999). Sin embargo, el mecanismo metabólico por el cual ocurre tal interacción se desconoce, así como el papel ecológico que este mecanismo de adaptación metabólica juega en el ecosistema. Las micrografías muestran la interacción estrecha entre las haloarqueas y los cristales. Las figuras 11, 13 y 14 lo clarifican. Es claro que el papel de las entidades biológicas puede jugar un papel importante en la producción de cristales de sal (López-Cortés *et al.*, 1994). Sin embargo, para optimizar las operaciones en la producción de sal es necesario invertir más esfuerzos en este campo del conocimiento. En México a la fecha no existe ningún otro trabajo relacionado con este tema. Las imágenes obtenidas durante esta investigación hacen

meritorio reconocer a este trabajo como una contribución en este tema. La importancia ecológica que tienen este tipo de estudios es que sus resultados repercuten en la visión económica de la sociedad y por lo tanto se toman medidas de conservación. En este caso, la compañía Exportadora de Sal, S.A. sabe que en sus instalaciones posee un recurso muy valioso, pero para obtener más información científica como esta es necesario conocer previamente los microorganismos que ahí habitan. Y así su posterior estudio brindará la posibilidad de expandir la visión de conservación en aras de incrementar la producción de sal y la obtención novedosas moléculas de aplicación biotecnológica.

#### **10.4. Perspectivas para ahondar en el conocimiento de arqueas halófilas extremas**

Bajo el panorama observado durante esta investigación la cual, desde el particular punto de vista de la autora, logró resultados suficientes para sugerir algunas premisas, mismas que se han plasmado a lo largo de la discusión, se plantean ahora algunas consideraciones para el futuro de cualquier estudio de haloarqueas. Con base en Kletzin (2007), las perspectivas para engrandecer el campo del conocimiento de las haloarqueas serán las siguientes:

- a) **Aislamiento.** Hacer que los esfuerzos se enfoquen en reemplazar a las especies no cultivables que han sido identificadas por métodos moleculares, para así añadir arqueas cultivables a las ramas huérfanas del árbol filogenético;
- b) **Consorcio.** Se requiere especial interés en el estudio de especies que sólo pueden crecer en co-cultivos simbióticos o mutualísticos;

- c) **Metagenómica.** Es necesario invertir más esfuerzos en metagenómica para incrementar la base de datos mundial, para expandir la base de potenciales enzimas comerciales y para reforzar el conocimiento filogenético por medio de herramientas de bioinformática; d) **Biología estructural.** Profundizar en los estudios de biología estructural para elucidar nuevos procesos celulares de las arqueas. Con las nuevas herramientas de cristalización de proteínas se podrá realizar un rastreo masivo en tiempos relativamente cortos;
- e) **Biología celular.** Mas esfuerzos para esclarecer algunos aspectos de procesos celulares como replicación, transcripción y traducción, las arqueas continúan siendo modelos de estudio para comprender los mismos procesos eucariotes;
- f) **Fisiología.** Se necesitan descubrir nuevas rutas metabólicas para obtener un panorama más amplio del dominio arquea.
- h) **Proteómica.** Ampliar nuestro conocimiento del mapa proteómico y por genética inversa (de la proteína al gen) contribuir a la anotación de genomas de bacterias halófilas.

Durante esta investigación se realizaron búsquedas exhaustivas en la literatura indexada que se encuentra en internet. El resultado es resultó en muchas publicaciones de instituciones de otros países en donde analizan poblaciones ambientales de haloarqueas en localidades mexicanas, las cuales se han citado a lo largo de este texto. Las únicas publicaciones relacionadas con arqueas que se han realizado en instituciones mexicanas son Valenzuela-Encinas *et al.*, (2008) y Vazquez-Duhalt *et al.*, (2008). El primero es un estudio de diversidad de arqueas alcalino-halófilas del lago de Texcoco, mediante la secuenciación y clonación del 16S rADN. Si bien es un trabajo similar a este, en él no

realizaron un trabajo de aislamiento y caracterización de cepas. El segundo, es una revisión sobre la capacidad metabólica de arqueas halófilas y bacterias halotolerantes para degradar compuestos orgánicos contaminantes. Cabe resaltar que ambos estudios son muy recientes. De la misma manera no se logró encontrar la existencia de colecciones microbiológicas mexicanas en donde se tengan preservados miembros de haloarquea. Este contexto proyecta un panorama positivo para esta investigación. Así, en la opinión personal de la autora, este trabajo se coloca como pionero en el aislamiento y estudio de diversidad de haloarqueas en México.

La importancia en el estudio de estos microorganismos ha tomado mucha fuerza en la última década en diversos aspectos del conocimiento. El mejor ejemplo es el manual Bergey del 2001, en donde se reportan 14 géneros integrantes de la familia Halobacteriaceae. En el 2008, Oren reporta que existen al menos 26 géneros validados y publicados bajos las normas del código internacional para la nomenclatura de bacteria (ICNB, por sus siglas en inglés). Este incremento ha ocurrido en un período de 7 años. Así pues, el continuo estudio de miembros de haloarquea es de suma importancia para México.

## 11. Conclusiones

- Se obtuvieron cinco cepas de las áreas de concentración: cuatro pertenecieron a miembros del género *Halobacterium*, cada una con morfologías coloniales diferentes; una correspondió a la especie *Halogeometricum* sp.
- Del cristizador se obtuvo una cepa de *Haloarcula*. Se presume sea la misma especie aislada por, parcialmente estudiada y propuesta como *Haloarcula californiae* (Javor *et al.*, 1982).
- Las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases y SEM muestran pleomorfismo en todas las cepas, principalmente se distinguen bacilos, cocos, células triangulares, cuadradas, rectangulares y con forma de mazo.
- DGGE muestra la existencia de al menos otras doce bandas (P9\_2 y P9\_5) y diez (P10\_2 y P10\_5) bandas las cuales se definieron como unidades operacionales taxonómicas (OTU).
- Cinco bandas de ambos sitios son intensas, sugiriendo que la dominancia ocurre por estas cinco poblaciones.
- El análisis del DGGE por Gel Compar muestra que la comunidad de arqueas entre las áreas de concentración 9 y 10 difiere ligeramente en composición y número.
- Se sugiere que los OTU's pertenezcan a miembros no cultivables de la familia Halobacteriaceae o arqueas metanógenas de los géneros *Methanosarcina* spp., *Methanohalobium* spp., y/o *Methanohalophilus* spp.

## 12. Recomendaciones

Los ambientes evaporíticos son representantes de las secuencias de biomoléculas sedimentarias sobrevivientes más tempranas (Jahnke *et al.*, 2008). Exportadora de Sal, S.A., ofrece una oportunidad de explorar las comunidades hipersalinas dentro de un ambiente relativamente estable. Estos ambientes mantienen una complejidad biológica que sólo recientemente fue descubierta mediante la aplicación de análisis moleculares modernos (Spear *et al.*, 2003; Ley *et al.*, 2006; Jahnke *et al.*, 2008 y Orphan *et al.*, 2008).

La empresa ESSA es una de las salinas comerciales más grandes del mundo, pues posee en los fondos de los vasos concentradores tapetes microbianos de diferentes texturas y composiciones, y rocas evaporíticas formadas de yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), y/o anhidrita ( $\text{CaSO}_4$ ) que poseen capas de colores habitadas por comunidades microbianas con distintas estrategias metabólicas (Spear *et al.*, 2003); asimismo, en los cristalizadores existen comunidades densas de arqueas halófilas extremas con potencialidades biotecnológicas por estudiar.

Si bien los estudios anteriores se han enfocado en la identificación de cianobacterias y su papel ecológico en estos ambientes, la relativa contribución de la identificación de los organismos del dominio Arquea en ESSA, expande el marco conceptual para interpretación ecológica, biogeoquímica y paleontológica de los ambientes evaporíticos. Se ha considerado a ESSA como el único ecosistema hipersalino mexicano protegido y conservado contra el deterioro ocasionado por la actividad humana que posee inigualablemente una riqueza biológica y biotecnológica por descubrir (López-Cortés,

1998). Por lo tanto, se recomienda enfatizar los estudios de los microorganismos que posee el sitio.

El dominio Archaea es diverso y abundante no sólo en ambientes extremos, sino también en suelos, océanos y aguas continentales, en donde ellas juegan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos. Sus miembros poseen capacidades únicas de sobrevivencia que los hacen atractivos para el búsqueda de nuevas moléculas de uso biotecnológico. Asimismo, su continuo estudio se ha justificado para conocer los límites de la vida en el planeta.

### 13. Referencias

1. Antón J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F y Amann R. 1999. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ. Microbiol.* 1: 517-523.
2. Aravind L y Koonin EV. 1999. DNA binding proteins and evolution of transcription regulation in Archaea. *Nuc. Ac. Res.* 27(23): 4658-4570.
3. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
4. Atlas RM. 2005. Handbook of: Media for environmental microbiology. Second edition. CRC Press. Florida. 579 p.
5. Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woses CR y Wolfe RS. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43: 260–296.
6. Bar-David RE, Mana L y Oren A. 2007. *Haloplanus natans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, gas-vacuolate archaeon isolated from Dead Sea-Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 780–783.
7. Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. & Pace, N.R. 1996 Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. PNAS. USA* 93, 9188-9193.
8. Bebout BM, Carpenter SP, Des Marais DJ, Discipulo M, Embaye T, Garcia-Pichel F, Hoehler TM, Hogan M, Jahnke LL, Keller RM, Miller SR, Prufert-Bebout LE, Raleigh C, Rothrock M y Turk K. 2002. Long-term manipulations of intact microbial mat communities in a greenhouse collaboratory: simulating Earth's present and past environments. *Astrobiol.* 2, 383–402.
9. Benlloch S, Acinas SG, Martínez-Murcia AJ y Rodríguez-Valera F. 1996. Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. *Hydrobiol.* 329: 19-31.
10. Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP y Mergaeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2): 77-81.
11. Benison KC, Jagniecki EA, Edwards TB, Mormile MR y Storrie-Lombardi MC. 2008. Hairy Blobs: Microbial suspects preserved in modern and ancient extremely acid lake evaporates. *Astrobiol.* 8(3): 1-15.
12. Blochl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW y Stetter KO. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extrem.* 1: 14–21.

13. Brauer SL, Cadillo-Quiroz H, Yashiro E, Yavitt JB y Zinder SH. 2006. Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* 442: 192–194.
14. Brock TD, Brock KM, Belly RT y Weiss RL. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.* 84: 54–68.
15. Burggraf S, Huber H y Stetter KO. 1997. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 657–660.
16. Burns, D. G., H. M. Camakaris, P. H. Janssen, and M. L. y Dyall-Smith. 2004. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5258-5265.
17. Burns, D. G., H. M. Camakaris, P. H. Janssen, and M. L. y Dyall-Smith. 2004a. Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:469-473.
18. Burcin-Mutlu M, Martínez-García M, Santos F, Peña A, Kiyem G y Anton J. 2008. Prokaryotic diversity in Tuz Lake, a Hypersaline environment in Inland Turkey. *FEMS.* 1-10.
19. Canfield, D. E. y Des Marais, D. J. 1993. Biogeochemical cycles of carbon, sulfur and free oxygen in a microbial mat. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 57:3971-3984.
20. Canfield DE, Sørensen KB, y Oren A, 2004. Biogeochemistry of a gypsum-encrusted microbial ecosystem. *Geobiol.* 2:133-150.
21. Castillo AM, Gutiérrez MC, Kamekura M, Ma Y, Cowan DA, Jones BE, Grant WD y Ventosa A. 2006. *Halovivax asiaticus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 765–770.
22. Cavicchioli, R. 2007. *Archaea. Molecular and cellular Biology.* ASM Press, Washintong DC. 523 p.
23. Dar SA, Kuenen JG y Muyzer G. 2005. Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2325-2330.
24. Das Sarma P y Das Sarma S. 2008. On the origin of prokaryotic “species”: The taxonomy of halophilic Archaea. *Sal. Syst.* 4(5):1-5.
25. Des Marais, D. J. 1995. The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. En *Advances in Microbial Ecology.* Jones, G. (Ed.) Plenum Press, New York. Vol 14. 590 p.

26. Des Marais D J, 2003. Biogeochemistry of Hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biol. Bull.* 204:160-167.
27. Ferry JG, Smith PH y Wolfe RS. 1974. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 465–469.
28. Fiala G, Stetter KO, Jannasch HW, Langworthy TA y Madon J. 1986. *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 106–113.
29. Fiala G y Stetter KO. 1986. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* 145: 56–61.
30. Field KG, Gordon D, Wright T, Rappé M, Urbach E, Vergin K y Giovannoni S J. 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:63-70
31. García-Pichel F, López-Cortés A y Nübel U. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1902-1910
32. Gillis M, Vandamme P, De Vos P, Swings J y Kersters K. 2001. Polyphasic taxonomy. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria.* Boone, D.R. Castenholz, R. W. (eds). Volumen uno. Second Edition. Springer-Verlag, New York. 43-48 p.
33. Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL y Field KG. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 345: 60-63.
34. Grant W D, Kamekura M, McGenity T J y Ventosa A. 2001. Extremely halophilic archaeobacteria, class Halobacteria ord. nov. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria.* Boone, D. R. y Castenholz, R. (eds). Volumen uno. Segunda edición. W. Springer-Verlag, New York. 294-317 p.
35. Green SJ. 2006. A Guide to Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Online publication: <http://ddgehelp.blogspot.com/>
36. Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI. 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. Nov., comprising a disting lineage of the Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (3): 997-1006.

37. Guerrero R, Piqueras M, y Berlanga M. 2002. Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int Microbiol.* 5: 177-188.
38. Gutiérrez MC, Castillo AM, Kamekura M, Xue Y, Ma Y, Cowan DA, Jones BE, Grant WD y Ventosa A. 2007. *Halopiger xanaduensis* gen. nov., sp., an extremely halophilic archaeon isolated from saline Lake Shangmatale in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1402–1407.
39. Hafenbradl D, Keller M, Dirmeier R, Rachel R, Roßnagel P, Burggraf S, Huber H, y Stetter KO. 1996. *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe<sup>2+</sup> at neutral pH under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* 166: 308–314.
40. Hensel R, Matussek K, Michalke K, Tacke L, Tindall BJ, Kohlhoff M, Siebers B y Dielenschneider J. 1997. *Sulfophobococcus zilligii* gen. nov., spec. nov. a novel hyperthermophilic archaeum isolated from hot alkaline springs of Iceland. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 102–110.
41. Hezayen FF, Tindall BJ, Steinbuchel A y Rehm BHA. 2002. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2271–2280.
42. Horikoshi K. 2007. Early history of extremophiles. En: *Physiology and biochemistry of extremophiles*. Gerday C y Glansdorff N (eds.). ASM Press. Washington, DC. 429 p.
43. Huber R, Kristjansson JK y Stetter KO. 1987. *Pyrobaculum* gen. nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* 149: 95–101.
44. Huber G, Spinnler C, Gambacorta A y Stetter KO. 1989. *Metallosphaera sedula* gen. nov. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 12: 38–47.
45. Huber H y Stetter KO. 2001. Family I. Archaeoglobaceae fam. nov. Stetter 1989, 2216. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. Boone DR y Castenholz RW (eds). 2da. ed. New York: Springer-Verlag.
46. Huber R, Dyba D, Huber H, Burggraf S y Rachel R. 1998. Sulfur-inhibited *Thermosphaera aggregans* sp. nov., a new genus of hyperthermophilic archaea isolated after its prediction from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 31–38.
47. Huber H, Burggraf S, Mayer T, Wyschkony I, Rachel R y Stetter KO. 2000. *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic

- Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp nov and *Ignicoccus pacificus* sp nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 (6): 2093-100.
48. Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC y Stetter KO. 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. Nature. 417 (6884): 63–67.
  49. Itoh T, Suzuki K y Nakase T. 1998. *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 879–887.
  50. Itoh T, Suzuki K, Sanchez PC y Nakase T. 1999. *Caldivirga maquilingensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped crenarchaeote isolated from a hot spring in the Philippines. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1157–1163.
  51. Itoh T, Suzuki K y Nakase T. 2002. *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1097–1104.
  52. Itoh T, Suzuki K, Sanchez PC y Nakase T. 2003. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1149–1154.
  53. Itoh T, Yamaguchi T, Zhou P y Takashina T. 2005. *Natronolimnobius baerhuensis* gen. nov., sp. nov. and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in Inner Mongolia, China. Extrem. 9: 111–116.
  54. Jankhe LL, Orphan VJ, Embaye T, Turk KA, Kubo MD, Summons RE y Des Marais. 2008. Lipid biomarker and phylogenetic analyses to reveal archaeal biodiversity and distribution in hypersaline microbial mat and underlying sediment. Geobiol. 1-17.
  55. Javor, B., Requadt, C. y Stoeckenius, W. (1982). Box-shaped halophilic bacteria. J Bacteriol 151, 1532-1 542.
  56. Javor B. 1989. Hypersaline environments. Microbiology and biogeochemistry. Ed. Springer-Verlag. Thomas D. Brock Series. Berlin. Pp 328.
  57. Jochimsen B, Peinemann-Simon S, Volker H, Stuben D, Botz R, Stoffers P, Dando PR y Thomm M. 1997. *Stetteria hydrogenophila*, gen. nov. and sp. nov., a novel mixotrophic sulfur-dependent crenarchaeote isolated from Milos, Greece. Extrem. 1: 67–73.
  58. Kamekura M y Dyall-Smith ML. 1996. Taxonomy of the family Halobacteriaceae and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. J. Gen. Appl. Microbiol. 41: 333–350.

59. Kamekura M, Dyal-Smith ML, Upasani V, Ventosa A y Kates M. 1997. Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 853–857.
60. Kamekura M, Mizuki T, Usami R, Yoshida Y, Horikoshi K y Vreeland RH. 2004. The potential use of signature bases from 16S rRNA gene sequences to genera of Halobacteria. En: *Halophilic microorganisms*. Ventosa A (Ed) Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 79 pp.
61. Kashefi K, Tor JM, Holmes DE, Gaw Van Praagh CV, Reysenbach AL y Lovley DR. 2002. *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 719–728.
62. Kessel M y Cohen Y. 1982. Ultrastructure of square bacteria from a brine pool in southern Sinai. *J. Bacteriol.* 150(2): 851-860.
63. Kletzin A. 2007. General characteristics and important model organisms. En: *Archaea, Molecular and cellular biology*. Ed. Cavicchioli, R. ASM Press, Washington, DC. p 523
64. Koga Y y Morii H. 2007. Biosynthesis of ether-type polar lipids in Archaea and evolutionary considerations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(1):97-120.
65. Kurosawa N, Itoh YH, Iwai T, Sugai A, Uda I, Kimura N, Horiuchi T y Itoh T 1998. *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order Sulfolobales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 451–456.
66. Kurr M, Huber R, König H, Jannasch HW, Fricke H, Trincone A, Kristjansson JK y Stetter KO. 1991. *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Arch. Microbiol.* 156: 239–247.
67. Ley RE, Harris KJ, Wilcox J, Spear JR, Miller SR, Bebout BM, Maresca JA, Bryant DA, Sogin ML y Pace NR. 2006. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro Hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol.* 72:3685-3695.
68. López-Cortés A. 1998. Ecología y biotecnología de las comunidades microbianas. *Cien. Des.* 138: 11-17

69. López-Cortés A, Ochoa JL y Vázquez-Duhalt, R. 1994. Participation of halobacteria in the crystal formation and crystallization rate of NaCl. *J. Geomicrobiol.* 12 (2): 69-80.
70. López-Cortés A, Lanz-Landázuri A y García-Maldonado JQ. 2008. Screening and isolation of PHB-Producing bacteria in a polluted marine microbial mat. *Microb. Ecol.* 56: 112-120.
71. Ludwig W y Schleifer KH. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence análisis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 155-173
72. Madigan MT, Martinko JM y Parker J. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos.* Décima edición. Pearson Eduaction, S.A. Madrid, 1096 p.
73. Mancinelli RL. 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.* 277–297 p.
74. Maestrojuan GM, Boone DR, Xun LY, Mah RA y Zhang LF. 1990. Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the genus *Methanoculleus* gen. nov, emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and description of new strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 117–122.
75. Matte-Tailliez O, Brochier C, Forterre P y Philippe H. 2006. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. *Mol. Biol. Evol.* 19(5):631–639.
76. Maturrano L, Santos F, Rosselló-Mora R y Antón J. 2006. Microbial diversity in Maras Salterns, a hypersaline environment in the peruvian Andes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3887-3895.
77. McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD y Stan-Lotter H. 2000. Originis of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ. Microbiol.* 2(3): 243-250.
78. Miller TL y Wolin MJ. 1985. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch. Microbiol.* 141: 116–122.
79. Montalvo-Rodriguez R, Vreeland RH, Oren A, Kessel M, Betancourt C, y Garriga JL. 1998. *Halogeometricum borinquense* gen. nov. sp. nov., a novel halophilici archaeon from Puerto Rico. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1305-1312.
80. Niederberger TD, Gotz DK, McDonald IR, Ronimus RS y Morgan HW 2006. *Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 965–971.

81. Nübel U, García-Pichel F, Clavero E y Muyzer G. 2000. Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ Microbiol.* 2:217-226.
82. Omoregie EO, Crumbliss LL, Bebot BM y Zehr JP. 2004. Comparison of diazotroph community structure in *Lyngbya* sp and *Microcoleus chthonoplastes* dominated microbial mats from Guerrero Negro, Baja, México. *Microbiol. Ecol.* 47: 305-318.
83. Orphan VJ, Jahnke LL, Embaye T, Turk KA, Pernthaler A, Summons RE y DesMarais DJ. 2008. Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. *Geobiol.* 1-18.
84. Oren A, Gurevich P, Gemmell RT y Teske A. 1995. *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 747-754.
85. Oren A, Ventosa A, Gutierrez MC y Kamekura M. 1999. *Haloarcula quadrata* sp. nov., a square motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *Int. J. Syst. Bac.* 49: 1149-1155.
86. Oren A y Ventosa A. 2000. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of Halobacteriaceae. Minutes of the meetings, 16 August 1999, Sydney, Australia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1405-1407.
87. Oren A, Elevi R, Watanabe S, Ihara K y Corcelli A. 2002. *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1831-1835.
88. Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Sal. Syst.* 4(2):1-13.
89. Oschenreiter T, Pfeifer F y Schleper C. 2002. Diversity of Archaea in Hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extrem.* 6:267-274.
90. Palenik B. 1994. Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(9): 3212-3219.
91. Patel GB y Sprott GD. 1990. *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. *Methanotherx concilii* and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 79-82.
92. Paterek JR y Smith PH 1988. *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic halophilic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 122-123.

93. Pedrós-Alió C, Calderón-Paz JI, MacLean MH, Medina G, Marrasé C, Gasol JM y Guixa-Boixereu N. 2000. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32:143-155.
94. Pedrós-Alió C. 2005. Diversity of microbial communities: The case of solar salterns. En: *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria y Eukarya*. Gunde-Cimerman N, Oren A y Plemenitas A. (eds.) Springer. Holanda. 71-90.
95. Perevalova AA, Svetlichny VA, Kublanov IV, Chernyh NA, Kostrikina NA, Tourova TP, Kuznetsov BB y Bonch-Osmolovskaya EA. 2005. *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, with an emended description of the genus *Desulfurococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 995–999.
96. Preston CM, Wu KY, Molinski TF y Delong EF. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(13): 6241–6246.
97. Prokofeva MI, Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, Chernyh NA, Kuznetsov BB, Tourova TP y Bonch-Osmolovskaya EA. 2000. *Acidilobus aceticus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic thermoacidophilic archaeon from continental hot vents in Kamchatka. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2001–2008.
98. Reysenbach AL. 2001. Family I. Thermoplasmataceae fam. nov. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. Boone DR y Castenholz RW. (eds). 2da. ed. New York: Springer-Verlag.
99. Reysenbach AL. 2001a Class I. Thermoprotei class. nov. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. Boone DR y Castenholz RW (eds). 2da. ed., New York: Springer Verlag, p. 169.
100. Reysenbach A-L, Liu YT, Banta AB, Beveridge TJ, Kirshtein JD, Schouten S, Tivey MK, Von Damm K, Voytek MA. 2006. A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 442: 444–447.
101. Rippka R, Waterbury JB y Stainer RY. 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles, en: Starr, M. P. Stolp, H. Trüper, H. G. Balows, A. y Schlegel, H. G. (eds) Springer-Verlag. New York. p 212-220
102. Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F y Ramos-Comenzana A. 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon source. *J. Gen. Microbiol.*
103. Rouviere P, Mandelco L, Winker S y Woese CR. 1992. A detailed phylogeny for the Methanomicrobiales. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 363–371.

104. Saitou N y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
105. Savage KN, Krumholz LR, Oren A y Elshahed MS. 2007. *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulphide-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:19-24.
106. Savage KN, Krumholz LR, Oren A y Elshahed MS. 2008. *Halosarcina pallida* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon from a low-salt, sulphide-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:856-860.
107. Segerer A, Neuner AM, Kristjansson JK y Stetter KO. 1986. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 559–564.
108. Segerer AH, Trincone A, Gahrtz M y Stetter KO. 1991. *Stygiolobus azoricus* gen. nov., sp. nov. represents a novel genus of anaerobic, extremely thermoacidophilic archaeobacteria of the order Sulfolobales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 495–501
109. Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP y Zillig W. 1995. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* 177: 7050–7059.
110. Shumilin E, Grajeda-Muñoz M, Silverberg N, y Sapozhnikov D. 2002. Observations on trace element Hypersaline geochemistry in surficial deposits of evaporation ponds of Exportadora de Sal Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *Mar Chem.* 79:133-153.
111. Smith, A. L. 1997. Microbiology laboratory manual and workbook. 4<sup>a</sup>. Ed. The CV. Mosby Company St. Louis, USA. 159 p.
112. Spear JR, Ley RE, Berger AL, y Pace NR. 2003. Complexity in natural microbial ecosystems: the Guerrero Negro experience. *Biol. Bull.* 204:168-173.
113. Sprenger WW, van Belzen MC, Rosenberg J, Hackstein JH y Keltjens JT. 2000. *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1989–1999.
114. Sørensen KB, Canfield DE, Teske AP y Oren A. 2005. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. *Appl. Environm. Microbiol.* 71:7352-7365.

115. Sowers KR y Ferry JG. 1983. Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 684–690.
116. Stetter KO, König H y Stackebrandt E. 1983. *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *Syst. Appl. Microbiol.* 4:535–551.
117. Stoekenius W. 1981. Walsby's square bacterium: Fine structure of an orthogonal prokaryote. *J. Bacteriol.* 148(1): 352-360.
118. Sun FJ y Caetano-Anollés G. 2008. Evolutionary patterns in the sequence and structure of transfer RNA: Early origins of Archaea and viruses. *PLOS Comput. Biol.* 4(3): 1-9.
119. Takai K, Sugai A, Itoh T y Horikoshi K. 2000. *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 489–500.
120. Tatusova TA y Madden TL 1999. BLAST 2 sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250
121. Teske A, Hinrichs K, Edgcomb V, de Vera-Gómez A, Kysela D, Sean S, Sogin M y Jannasch HW. 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol.* 68:1994-2007.
122. Tindall BJ, Ross HNM y Grant WD. 1984. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 41–57.
123. Tindall, BJ. 2003. Taxonomic problems arising in the genera *Haloterrigena* and *Natrinema*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1697–1698.
124. Valenzuela-Encinas C, Neria-Gonzalez I, Alcántara-Hernandez RJ, Enriquez-Aragón JA, Estrada-Alvarado I, Hernandez-Rodriguez C, Dendooven L y Marsch R. Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extrem.* 12:247-254.
125. Le Borgne S, Paniagua D y Vazquez-Duhalt R. 2008. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15:74-92.
126. Vellieux, F. Madern, D. Zaccari, G. y Ebel, C. 2007. Molecular adaptation to high salt. En: *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*. Eds: Gerday C. y Glansdorff, N. ASM Press, Washington, D. C. 429 p.

127. Ventosa A, Nieto J J y Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Revs.* 62:504-544.
128. Vreeland RH, Straight S, Krammes J, Dougherty K, Rosenzweig WD y Kamekura M. 2002. *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon with tree 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremoph.* 6: 445-452.
129. Waino M, Tindall BJ y Ingvorsen K. 2000. *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 183-190.
130. Walsby AE. 1980. A square bacterium. *Nature.* 283: 69-71.
131. Walsh EJ, Shröder T, Wallace RL, Ríos-Arana JV y Rico-Martinez R. 2008. Rotifers from selected inland saline waters in the Chihuahuan desert of Mexico. *Saline Systems.* 4(7):1-11.
132. Wang LT, Lee FL, Tai CJ y Kasai H. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1846-1850.
133. Wasserfallen A, Nolling J, Pfister P, Reeve J y Conway de Macario E. 2000. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov. and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 43-53.
134. Waters E, Hohn MJ, Ahel I, Graham DE, Adams MD, Barnstead M, Beeson KY, Bibbs L, Bolanos R, Keller M, Kretz K, Lin X, Mathur E, Ni J, Podar M, Richardson T, Sutton GG, Simon M, Dieter S, Stteter KO, Short JM, Noordewier M. 2003. The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Nat. Acad. Sci. PNAS.* 100 (22): 12984-12988.
135. Wilms R, Sass H, Köptke B, Köster J, Cypionka H y Engelen B. 2006 Specific bacterial, archaeal and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 2756-2764.
136. Whitman WB. 2001. Genus II. *Methanotorris* gen. nov. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria.* DR Boone and RW Castenholz, (eds). 2da. ed. New York: Springer-Verlag.
137. Whitman WB. 2001a. Genus II. *Methanothermococcus* gen. nov. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply*

- branching and phototrophic Bacteria. DR Boone and RW Castenholz, (eds). 2da. ed. New York: Springer-Verlag.
138. Whitman WB, Boone DR y Koga Y. 2001. Family II. Methanocaldococcaceae fam. nov., En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. DR Boone and RW Castenholz, (eds). 2da. ed. New York: Springer-Verlag.
139. Wildgruber G, Thomm M, König H, Ober K, Ricchiuto T y Stetter KO. 1982. *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the Methanoplanaceae. Arch. Microbiol. 132: 31–36.
140. Woese CR, Kandler O y Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:4576–4579.
141. Xu Y, Zhou P y Tian X. 1999. Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 261–266.
142. Xue Y, Fan H, Ventosa A, Grant WD, Jones BE, Cowan DA, y Ma Y. 2005. *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 2501–2505.
143. Young, K.D. 2006. The selective value of bacterial shape. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70: 660–703.
144. Yutin N, Makarova KS, Mekhedov SL, Wolf YI y Koonin EV. 2008. The deep archaeal roots of eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 25(8):1619–1630.
145. Zellner G, Stackebrandt E, Messner P, Tindall BJ, Conway de Macario E, Kneifel H, Sleytr UB y Winter J. 1989. Methanocorpusculaceae fam. nov., represented by *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense* spec. nov. and *Methanocorpusculum bavaricum* spec. nov. Arch. Microbiol. 151: 381–390.
146. Zellner G, Messner P, Kneifel H, Tindall BJ, Winter J y Stackebrandt E. 1989. *Methanolacinia* gen. nov., incorporating *Methanomicrobium paynteri* as *Methanolacinia paynteri* comb. nov. J. Gen. Appl. Microbiol. 35: 185–202.
147. Zellner G, Boone DR, Keswani J, Whitman WB, Woese CR, Hagelstein A, Tindall BJ y Stackebrandt E. 1999. Reclassification of *Methanogenium tationis* and *Methanogenium liminatans* as *Methanofollis tationis* gen. nov., comb. nov. and *Methanofollis liminatans* comb. nov. and description of a new strain of *Methanofollis liminatans*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 247–255.
148. Zhilina TN y Zavarzin GA. 1990. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic archaea. FEMS Microbiol. Rev. 87: 315–322.

149. Zillig W, Gierl A, Schreiber G, Wunderl S, Janekovic D, Stetter KO y Klenk HP 1983. The archaeobacterium *Thermofilum pendens* represents a novel genus of the thermophilic, anaerobic sulfur respiring Thermoproteales. Syst. Appl. Microbiol. 4: 79–87.
150. Zillig W, Holz L, Janekovic D, Schafer W y Reiter WD. 1983a. The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. Syst. Appl. Microbiol. 4: 88–94.
151. Zillig W, Holz I, Klenk HP, Trent J, Wunderl S, Janekovic D, Imself E y Haas B. 1987. *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine Archaeobacterium, representing a novel order, Thermococcales. Syst. Appl. Microbiol. 9: 62–70.
152. Zillig W, Holz I, y Wunderl. S. 1991. *Hyperthermus butylicus* gen. nov., sp. nov., a hyperthermophilic, anaerobic, peptide-fermenting, facultatively H<sub>2</sub>S-generating archaeobacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 41:169–170.



#### 14. Anexo 1a Elaboración de los medios HEC

**Tabla I.** Medio HEC 20 y 25%. (López-Cortés *et al.*, 1994, modificado de Rodríguez-Valera *et al.*, 1980).

<b>HEC 20%</b>		<b>HEC 25%</b>	
<b>Reactivos (g/L)</b>	<b>g/L</b>	<b>Reactivos (g/L)</b>	<b>g/L</b>
NaCl	156	NaCl	195
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	13	MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	16.25
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	20	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	25
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	<b>0.6*</b>	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	<b>0.6*</b>
KCl	4	KCl	5
NaHCO <sub>3</sub>	<b>0.2*</b>	NaHCO <sub>3</sub>	<b>0.2*</b>
NaBr	0.5	NaBr	0.6
NH <sub>4</sub> Cl	2	NH <sub>4</sub> Cl	2.5
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.005	FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.0062
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.62
<b>Adjust pH to 7.0 with KOH [1M]</b>		<b>Adjust pH to 7.0 with KOH [1M]</b>	
<b>Filtrate with Whatman #1</b>		<b>Filtrate with Whatman #1</b>	
yeast extract	5	yeast extract	5
casaminoácidos	1	casaminoácidos	1
<b>Concentración molar</b>		<b>Concentración molar</b>	
Magnesio	0.14 M	Magnesio	0.18 M
Cloruro de Sodio	2.61 M	Cloruro de Sodio	3.32 M

\*Estas sales se mantienen constante y corresponden a la del agua de mar. El medio HEC contiene: a) la solución de las sales representativas del agua de mar (diferente porcentaje de salinidad) y b) Solución de materia orgánica (extracto de levadura/casaminoácidos).

Se disuelven las sales en orden dado en un volumen de 600 mL de agua destilada. Inicialmente se disuelven las primeras tres sales en 400 mL. Posteriormente, el resto de las sales en los otros 200 mL. Es importante que no se agregue una sal hasta que no disuelva mejor la anterior, y así sucesivamente.

Una vez obtenida la solución se ajusta el pH a 7.0 con KOH 1 M. Una vez ajustado el pH, se filtra la solución con papel whatman #1. Se usa la bomba de vacío, cuidando que no se rompa el filtro ni se sature. En caso de que eso ocurra, se cambia por uno nuevo.

El penúltimo paso involucra la adición de 5 g/L de extracto de levadura y 1.0 g/L de hidrolizado de caseína (casaminoácidos). Agitar hasta solubilizar. No es necesario calentar la solución.

Para elaborar medio sólido, adicionar agar 22 g/L. Disolverlo por medio de agitación mecánica. El agar se solubiliza parcialmente. Inmediatamente se somete a esterilización

en autoclave a 15 lb de presión. Se utiliza una botella del doble de capacidad que el líquido obtenido.

**Anexo 1b. Elaboración del medio DG 16%**

**Tabla II. Medio DG 16% (Castenholz y Pierson 1981 modificado por Atlas, 2005).**

Constituyentes	Concentración final
NTA (ácido nitriloacético)	0.1 g
<b>Solución de micronutrientes</b>	0.5 mL
FeCl <sub>3</sub> (Solución) 0.29 g/L	1.0 mL
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.06 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.10 g
NaCl	0.008 g
KNO <sub>3</sub>	0.10 g
NaNO <sub>3</sub>	0.70 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.11 g
Na <sub>2</sub> S	0.5 g
Glycyl-glycine como buffer	0.8 g
<b>Solución de micronutrientes*</b>	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	0.05 mL
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.228 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0025 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0025 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0045 g

\*Elaborar primero la solución de micronutrientes y llevar a un volumen final de 100 ml

Adherir todos los componentes, excepto Na<sub>2</sub>S en H<sub>2</sub>O destilada y llevar a un volumen de 1L. Mezclar, ajustar a pH a 8.2-8.4. Agregar, Na<sub>2</sub>S. Reajustar pH a 8.2-8.4. Gentilmente calentar hasta hervir. Distribuir en tubos o frascos. Autoclave por 15 min a 15 psi de presión 121°C. Servir en cajas petri o dejar en tubos.



## 15. Anexo 2. Historia de vida de los cultivos

**Tabla I.** Historia de vida de la cepa P92070208-1P. *Halogetometricum borinquense*, cepa rosa mucoide proveniente del área de concentración 9, punto transecto 2 (P9 2). En todos los pasos las transferencias se realizaron por duplicado.

Paso	Inóculo	Fecha de inoculación	Fecha de crecimiento	Medio	Volumen/Cantidad de inóculo	parámetros físicos y químicos	Estrategia	Características de la colonia /enriquecimiento posterior al crecimiento
<b>origen</b>	Salmuera	08-oct-07	22-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 35 °C / aireación continua / poca luz	Inoculación directa sin filtrar/0.5 mL	Enriquecimiento naranja-salmón
<b>1</b>	Enriquecimiento	30-oct-07	13-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 37 °C / sin luz	Inoculación directa sin filtrar/1.0 mL	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ mucoide /rosa brillante/ presencia de contaminante
<b>2</b>	Colonia rosa	26-nov-07	07-dic-07	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estria compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ mucoide /rosa brillante/ presencia de contaminante
<b>3</b>	Colonia rosa	18-ene-08	21-ene-08	HEC 20% (sólido)	0.1 mL en 0.9 mL	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Diluciones hasta $1 \times 10^{-6}$	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ mucoide /rosa brillante/ presencia de contaminante
<b>4</b>	Colonia rosa	07-feb-08	09-feb-08	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estria compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ mucoide /rosa brillante/sin contaminante
<b>5</b>	Colonia rosa	27-feb-08	29-feb-08	HEC 20% (sólido)	Verificación de colonias aisladas con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estria amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ mucoide /rosa brillante/ sin contaminante

**Tabla II.** Historia de vida de la cepa P92090908-6P. *Halobacterium sp.*, cepa roja proveniente del área de concentración 9, punto transecto 2 (P9 2). En todos los pasos las transferencias se realizaron por duplicado.

Paso	Inóculo	Fecha de inoculación	Fecha de crecimiento	Medio	Volumen/Cantidad de inóculo	parámetros físicos y químicos	Estrategia	Características de la colonia /enriquecimiento posterior al crecimiento
<b>origen</b>	Salmuera	08-oct-07	22-oct-08	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 35 °C / aireación continua / poca luz	Inoculación directa sin filtrar/0.5 mL	Enriquecimiento naranja-salmón
<b>1</b>	Enriquecimiento	30-oct-07	13-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 37 °C / sin luz	Inoculación directa sin filtrar/1.0 mL	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /morada / presencia de contaminante
<b>2</b>	Colonia naranja	26-nov-07	07-dic-07	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /morada / presencia de contaminante
<b>3</b>	Colonia morada	18-ene-08	23-ene-08	HEC 20% (sólido)	0.1 mL en 0.9 mL	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Diluciones hasta $1 \times 10^{-6}$	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /morada / presencia de contaminante
<b>4</b>	Colonia morada	09-sep-08	23-sep-08	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 40 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /morada / sin contaminante
<b>5</b>	Colonia morada	23-sep-08	08-oct-08	HEC 20% (sólido)	Verificación de colonias aisladas con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 40 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /morada / sin contaminante

**Tabla III.** Historia de vida de la cepa P92090908-60. *Halobacterium sp.*, cepa roja proveniente del área de concentración 9, punto transecto 2 (P9\_2). En todos los pasos las transferencias se realizaron por duplicado.

Paso	Inóculo	Fecha de inoculación	Fecha de crecimiento	Medio	Volumen/Cantidad de inóculo	parámetros físicos y químicos	Estrategia	Características de la colonia /enriquecimiento posterior al crecimiento
<b>origen</b>	Salmuera	08-oct-07	22-oct-08	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 35 °C / aireación continua / poca luz	Inoculación directa sin filtrar/0.5 mL	Enriquecimiento naranja-salmón
<b>1</b>	Enriquecimiento	30-oct-07	13-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 37 °C / sin luz	Inoculación directa sin filtrar/1.0 mL	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / presencia de contaminante
<b>2</b>	Colonia naranja	26-nov-07	07-dic-07	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / presencia de contaminante
<b>3</b>	Colonia naranja	18-ene-08	23-ene-08	HEC 20% (sólido)	0.1 mL en 0.9 mL	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Diluciones hasta $1 \times 10^{-6}$	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / presencia de contaminante
<b>4</b>	Colonia naranja	09-sep-08	23-sep-08	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 40 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / sin contaminante
<b>5</b>	Colonia naranja	23-sep-08	08-oct-08	HEC 20% (sólido)	Verificación de colonias aisladas con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 40 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / sin contaminante

**Tabla IV.** Historia de vida de la cepa P102070208-3R. *Halobacterium sp.*, cepa roja proveniente del área de concentración 10, punto transecto 2 (P10\_2). En todos los pasos las transferencias se realizaron por duplicado.

Paso	Inóculo	Fecha de inoculación	Fecha de crecimiento	Medio	Volumen/Cantidad de inóculo	parámetros físicos y químicos	Estrategia	Características de la colonia /enriquecimiento posterior al crecimiento
<b>origen</b>	Salmuera	08-oct-07	22-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 35 °C / aireación continua / poca luz	Inoculación directa sin filtrar/0.5 mL	Enriquecimiento naranja-salmón
<b>1</b>	Enriquecimiento	30-oct-07	13-nov-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 37 °C / sin luz	Inoculación directa sin filtrar/1.0 mL	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / presencia de contaminante
<b>2</b>	Colonia naranja	26-nov-07	07-dic-07	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / presencia de contaminante
<b>3</b>	Colonia naranja	18-ene-08	23-ene-08	HEC 20% (sólido)	0.1 mL en 0.9 mL	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Diluciones hasta $1 \times 10^{-6}$	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / presencia de contaminante
<b>4</b>	Colonia naranja	07-feb-08	21-feb-08	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / sin contaminante
<b>5</b>	Colonia naranja	27-feb-08	12-abr-08	HEC 20% (sólido)	Verificación de colonias aisladas con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estría amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / sin contaminante

**Tabla V.** Historia de vida de la cepa P102070208-30. *Halobacterium sp.*, cepa naranja proveniente del área de concentración 10, punto transecto 2 (P10 2). En todos los pasos las transferencias se realizaron por duplicado.

Paso	Inóculo	Fecha de inoculación	Fecha de crecimiento	Medio	Volumen/Cantidad de inóculo	parámetros físicos y químicos	Estrategia	Características de la colonia /enriquecimiento posterior al crecimiento
<b>origen</b>	Salmuera	08-oct-07	22-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 35 °C / aireación continua / poca luz	Inoculación directa sin filtrar/0.5 mL	Enriquecimiento naranja-salmón
<b>1</b>	Enriquecimiento	30-oct-07	13-oct-07	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 4.8 / 37 °C / sin luz	Inoculación directa sin filtrar/1.0 mL	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / presencia de contaminante
<b>2</b>	Colonia naranja	26-nov-07	07-dic-07	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estria compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / presencia de contaminante
<b>3</b>	Colonia naranja	18-ene-08	23-ene-08	HEC 20% (sólido)	0.1 mL en 0.9 mL	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Diluciones hasta $1 \times 10^{-6}$	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / presencia de contaminante
<b>4</b>	Colonia naranja	07-feb-08	21-feb-08	HEC 20% (sólido)	Asada de una colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estria compacta	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / sin contaminante
<b>5</b>	Colonia naranja	27-feb-08	12-abr-08	HEC 20% (sólido)	Verificación de colonias aisladas con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Esparcimiento con triángulo, estria amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /naranja / sin contaminante

**Tabla VI.** Historia de vida de la cepa C205090908-1R. *Haloarcula sp.* Cepa roja proveniente del área de concentración 9, punto transecto 2 (P9\_2). En todos los pasos las transferencias se realizaron por duplicado.

Paso	Inóculo	Fecha de inoculación	Fecha de crecimiento	Medio	Volumen/Cantidad de inóculo	parámetros físicos y químicos del cultivo	Estrategia	Características de la colonia /enriquecimiento posterior al crecimiento
<b>origen</b>	Evaporita de NaCl	08-oct-07	04-dic-07	HEC 25% (líquido)	10 mL	pH 7.0 / 35 °C / aireación continua / poca luz	Inoculación directa sin filtrar/0.5 mL	Enriquecimiento rojo-bermellón
<b>1</b>	Enriquecimiento	23-ene-07	07-feb-08	HEC 25% (líquido)	1.0 mL	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Inoculación directa sin filtrar/ 1.0 mL	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / presencia de contaminante
<b>2</b>	Colonia roja	07-feb-08	23-abr-08	HEC 25% (sólido)	Asada de colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Estria compacta, triángulo de esparción	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / presencia de contaminante
<b>3</b>	Colonia roja	05-may-08	27-jun-08	HEC 25% (sólido)	Asada de colonia seleccionada con estereoscopio (3X)	pH 7.0 / 37 °C / sin luz	Transferencia de una colonia con asa. Estria amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja /sin contaminante
<b>4</b>	Colonia roja	09-sep-08	29-sep-08	HEC 25% (sólido)	Verificación de colonias aisladas con estereoscopio 3X	pH 7.0 / 45 °C / sin luz	Esparcimiento con asa pequeña estria amplia	Colonia con bordes circulares enteros/ elevada/ lisa/ opaca translúcida/ viscosa /roja / sin contaminante

### 16. Anexo 3. Estado del arte filogenético del dominio Arquea

**Tabla I.** Se muestran los cuatro diferentes fila reconocidos hasta el momento para el dominio Arquea (casillas grises) junto con todas los géneros y especies que hasta el momento se reconocen.

<b>Fila Crenarchaeota</b>
Clase Thermoprotei (Reysenbach, 2001a)
<b>Orden Caldisphaerales</b>
<b>Familia Caldisphaeraceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Caldisphaera</i> (Itoh, <i>et al.</i> , 2003)
<b>Orden Cenarchaeales</b> (Burggraf <i>et al.</i> , 1997)
<b>Familia Cenarchaeaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Cenarchaeum</i> (Preston <i>et al.</i> , 1996)
<b>Orden Desulfurococcales</b>
<b>Los siguientes dos géneros no han sido asignados a una familia:</b>
Género <i>Caldococcus</i> (Niederberger <i>et al.</i> , 2006)
Género <i>Ignisphaera</i> (Niederberger <i>et al.</i> , 2006)
<b>Familia Desulfurococcaceae</b>
Lista de generos:
Género <i>Acidilobus</i> (Prokofeva <i>et al.</i> , 2000)
Género <i>Acidococcus</i> (Burggraf <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Aeropyrum</i> (Burggraf <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Desulfurococcus</i> (Perevalova <i>et al.</i> , 2005)
Género <i>Ignicoccus</i> (Huber <i>et al.</i> , 2000)
Género <i>Staphylothermus</i> (Fiala <i>et al.</i> , 1986)
Género <i>Stetteria</i> (Jochimsen <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Sulfophobococcus</i> (Hensel <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Thermodiscus</i> (Burggraf <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Thermosphaera</i> (Huber <i>et al.</i> , 1998)
<b>Familia Pyrodictiaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Geogemma</i> (Burggraf <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Hyperthermus</i> (Zillig <i>et al.</i> , 1991)
Género <i>Pyrodictium</i> (Stetter <i>et al.</i> , 1983)
Género <i>Pyrolobus</i> (Blochl <i>et al.</i> , 1997)

<b>Orden Nitrosopumilales</b>
<b>Familia Nitrosopumilaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Nitrosopumilus (candidatus)</i> (Reysenbach, 2001)
<b>Orden Sulfolobales</b>
<b>Familia Sulfolobaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Acidianus</i> (Segerer <i>et al.</i> , 1986)
Género <i>Metallosphaera</i> (Huber <i>et al.</i> , 1989)
Género <i>Stygiolobus</i> (Segerer <i>et al.</i> , 1991)
Género <i>Sulfolobus</i> (Brock <i>et al.</i> , 1972)
Género <i>Sulfurisphaera</i> (Kurosawa <i>et al.</i> , 1998)
<b>Orden Thermoproteales</b>
<b>Familia Thermofilaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Thermofilum</i> (Zillig <i>et al.</i> , 1991a)
<b>Familia Thermoproteaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Caldivirga</i> (Itoh <i>et al.</i> , 1999)
Género <i>Pyrobaculum</i> (Huber <i>et al.</i> , 1987)
Género <i>Thermocladium</i> (Itoh <i>et al.</i> , 1998)
Género <i>Thermoproteus</i> (Burggraf <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Vulcanisaeta</i> (Itoh <i>et al.</i> , 2002)
<b>Fila Euryarchaeota</b>
<b>El siguiente género no ha sido asignado a una clase:</b>
Género <i>Aciduliprofundum</i> (Reysenbach <i>et al.</i> , 2006)
<b>Clase Archaeoglobi</b>
<b>Orden Archaeoglobales</b>
<b>Familia Archaeoglobaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Archaeoglobus</i> (Huber y Stetter, 2001)
Género <i>Ferroglobus</i> (Hafenbradl <i>et al.</i> , 1996)
Género <i>Geoglobus</i> (Kashefi <i>et al.</i> , 2002)
<b>Clase Halobacteria</b>
<b>Orden Halobacteriales</b>
<b>Familia Halobacteriaceae</b>

<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Haladaptatus</i> (Savage <i>et al.</i> , 2007)
Género <i>Halalkalicoccus</i> (Xue <i>et al.</i> , 2005)
Género <i>Haloalcalophilium</i> (Oren y Ventosa, 2000)
Género <i>Haloarcula</i> (Torreblanca <i>et al.</i> , 1978)
Género <i>Halobacterium</i> (Elazari-Volcani <i>et al.</i> , 1957)
Género <i>Halobaculum</i> (Oren <i>et al.</i> , 1995)
Género <i>Halobiforma</i> (Hezayen <i>et al.</i> , 2002)
Género <i>Halococcus</i> (Schoop, 1935)
Género <i>Haloferax</i> (Torreblanca <i>et al.</i> , 1986)
Género <i>Halogeometricum</i> (Montalvo-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998)
Género <i>Halomicrobium</i> (Oren <i>et al.</i> , 2002)
Género <i>Halopiger</i> (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007)
Género <i>Haloplanus</i> (Bar-David <i>et al.</i> , 2007)
Género <i>Haloquadra</i> (Burns <i>et al.</i> , 2004a)
Género <i>Halorhabdus</i> (Waino <i>et al.</i> , 2000)
Género <i>Halorubrum</i> (McGenity y Grant, 1996)*
Género <i>Halosarcina</i> (Savage <i>et al.</i> , 2008)
Género <i>Halosimplex</i> (Vreeland <i>et al.</i> , 2002)
Género <i>Haloterrigena</i> (Ventosa <i>et al.</i> , 1987)*
Género <i>Halovivax</i> (Castillo <i>et al.</i> , 2006)
Género <i>Natrialba</i> (Kamekura y Dyll-Smith, 1996)
Género <i>Natrinema</i> (McGenity <i>et al.</i> , 1998)*
Género <i>Natronobacterium</i> (Tindall <i>et al.</i> , 1984)
Género <i>Natronococcus</i> (Tindall <i>et al.</i> , 1984)
Género <i>Natronolimnobius</i> (Itoh <i>et al.</i> , 2005)
Género <i>Natronomonas</i> (Kamekura <i>et al.</i> , 1997)
Género <i>Natronorubrum</i> (Xu <i>et al.</i> , 1999)
<b>Clase Methanobacteria</b>
<b>Orden Methanobacteriales</b>
<b>Los siguientes dos géneros no han sido asignados a una familia:</b>
Género <i>Methanoregula</i> ( <i>candidatus</i> ) (Brauer <i>et al.</i> , 2006)
Género <i>Methanocalculus</i> (Rouviere <i>et al.</i> , 1992)
<b>Familia Methanobacteriaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Methanobacterium</i> (Rouviere <i>et al.</i> , 1992)

Género <i>Methanobrevibacter</i> (Rouviere <i>et al.</i> , 1992)
Género <i>Methaosphaera</i> (Miller y Wolin, 1985)
Género <i>Methanothermobacter</i> (Wasserfallen <i>et al.</i> , 2000)
<b>Familia Methanothermaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Methanothermus</i> (Rouviere <i>et al.</i> , 1992)
<b>Clase Methanococci</b>
<b>Orden Methanococcales</b>
<b>Familia Methanocaldococcaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Methanocaldococcus</i> (Whitman <i>et al.</i> , 2001)
Género <i>Methanotorris</i> (Whitman, 2001)
<b>Familia Methanococcaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Methanococcus</i> (Rouviere <i>et al.</i> , 1992)
Género <i>Methanothermococcus</i> (Whitman, 2001a)
<b>Clase Methanomicrobia</b>
<b>Orden Methanomicrobiales</b>
<b>Familia Methanocorpusculaceae</b> (Zellner <i>et al.</i> , 1989)
Lista de géneros:
Género <i>Methanocorpusculum</i> (Zellner <i>et al.</i> , 1989)
<b>Familia Methanomicrobiaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Methanoculleus</i> (Maestrojuan <i>et al.</i> , 1990)
Género <i>Methanofollis</i> (Zellner <i>et al.</i> , 1999)
Género <i>Methanogenium</i> (Zellner <i>et al.</i> , 1999)
Género <i>Methanolacinia</i> (Zellner <i>et al.</i> , 1989)
Género <i>Methanomicrobium</i> (Balch <i>et al.</i> , 1979)
Familia: Methanoplanaceae (Wildgruber <i>et al.</i> , 1982)
Género <i>Methanoplanus</i>
<b>Familia Methanospirillaceae</b>
Lista de géneros:
Género <i>Methanospirillum</i> (Ferry <i>et al.</i> , 1974)
<b>Orden Methanosarcinales</b>
<b>Familia Methanosaetaceae</b>
Lista de géneros:

Género <i>Methanosaeta</i> (Patel y Sprott, 1990)
<b>Familia Methanosarcinaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Methanomicrococcus</i> (Sprenger <i>et al.</i> , 2000)
Género <i>Methanococcoides</i> (Sowers y Ferry, 1983)
Género <i>Methanohalobium</i> (Zhilina y Zavarzin, 1990)
Género <i>Methanohalophilus</i> (Paterek y Smith, 1988)
Género <i>Methanolobus</i> (Balch <i>et al.</i> , 1979)
Género <i>Methanomethylovorans</i> (Balch <i>et al.</i> , 1979)
Género <i>Methanosalsum</i> (Balch <i>et al.</i> , 1979)
Género <i>Methanosarcina</i> (Balch <i>et al.</i> , 1979)
<b>Clase Methanopyri</b>
<b>Orden Methanopyrales</b>
<b>Familia Methanopyraceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Methanopyrus</i> (Kurr <i>et al.</i> , 1991)
<b>Clase Thermococci</b>
<b>Orden Thermococcales</b> (Zillig <i>et al.</i> , 1987)
<b>Familia Thermococcaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Palaeococcus</i> (Takai <i>et al.</i> , 2000)
Género <i>Pyrococcus</i> (Fiala y Stetter, 1986)
Género <i>Thermococcus</i> (Zillig <i>et al.</i> , 1983a)
<b>Clase Thermoplasmata</b>
<b>Orden Thermoplasmatales</b>
<b>Familia Ferroplasmaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Genus <i>Ferroplasma</i> (Golyshina <i>et al.</i> , 2000)
<b>Familia Picrophilaceae</b>
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Picrophilus</i> (Schleper <i>et al.</i> , 1995)
<b>Familia Thermoplasmataceae</b> (Reysenbach, 2001)
<b>Lista de géneros:</b>
Género <i>Thermoplasma</i> (Reysenbach, 2001)
<b>Fila Korarchaeota</b> (Barns <i>et al.</i> , 1996)
<b>Sólo organismos ambientales se han estudiado</b>

<b>Fila Nanoarchaeota</b> (Huber <i>et al.</i> , 2002)
<b>Este género no ha sido asignado a una clase.</b>
<b>Lista de géneros:</b>
<b>Género <i>Nanoarchaeum</i></b> (Waters <i>et al.</i> , 2003)