



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**Caracterización polifásica de bacterias halófilas moderadas
aisladas de una salinera en Manzanillo, Colima**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

ESPERANZA ABRIL SOSA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS	10
General:	10
Particulares:	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Análisis genético	10
Caracterización bioquímica	12
<i>Pruebas bioquímicas</i>	12
<i>Pruebas nutricionales</i>	13
Caracterización morfológica.....	13
Análisis quimiotaxonómico	14
RESULTADOS	15
Análisis genético	15
Caracterización bioquímica	22
Caracterización morfológica.....	23
Análisis quimiotaxonómico	29
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Capacidad de resolución taxonómica de algunas de las técnicas con mayor aplicación.....	8
Figura 2. Árboles filogenéticos construidos con Mr. Bayesde las cepas agrupadas con el género <i>Halomonas</i> . A) 16S ADNr, B) <i>gyrB</i> , C) <i>rpoD</i> y D) secuencias de los tres loci concatenadas.	17
Figura 3. Filogenia de las cepas correspondientes al género A) <i>Virgibacillus</i> , B) <i>Oceanobacillus</i> , C) <i>Salinicoccus</i> y D) <i>Brachybacterium</i>	20
Figura 4. Detección positiva de PHB.....	26
Figura 5. Morfología obtenida con MEB de las cepas agrupadas con <i>Halomonas</i>	27
Figura 6. Micrografías en MEB. A) Cepa M1-15 , B) M1-26	28
Figura 7. Fotomicrografías en MEB de las cepas A) M3-7 , B) M2-1 y C) M3-1 ,	28
Cuadro 1. Lista de oligos utilizados en la amplificación de los genes.....	11
Cuadro 2. Variedad de géneros y especies aisladas.....	15
Cuadro 3. Características fenotípicas.	24
Cuadro 4. Composición de ácidos grasos en las especies de <i>Halomonas</i>	29
Cuadro 5. Composición de ácidos grasos en los géneros <i>Brachybacterium</i> , <i>Oceanobacillus</i> , <i>Salinicoccus</i> y <i>Virgibacillus</i>	31

RESUMEN

Los ambientes hipersalinos son hábitats extremos caracterizados por tener mayor concentración de sales disueltas en comparación con el agua de mar (35ups), lo que disminuye la disponibilidad de agua, necesaria para el crecimiento y reproducción de la mayoría de los microorganismos, sin embargo, las bacterias halófilas moderadas (crecimiento óptimo entre >3-15% NaCl) evolucionaron bajo condiciones estresante que imperaban en la tierra primitiva; adaptadas a estas circunstancias ahora tienen la capacidad de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de manera más eficaz con alta concentración salina, debido a lo cual son consideradas como un grupo con enorme potencial biotecnológico. Por lo mismo, muchas bacterias son estudiadas con el propósito de conocer sólo sus aplicaciones dejando de lado el estudio sistemático, para contrarrestar tal efecto se emplea el enfoque polifásico, el cual evalúa criterios *fenotípicos*, *genotípicos* y *quimiotaxonómicos* con el fin de obtener resultados coherentes. Los suelos de salinas marinas, son una fuente inagotable de microorganismos halófilos, cuyo estudio contribuye a profundizar el conocimiento sobre la dinámica de los ecosistemas extremos y de la biodiversidad procariota, además de constituir modelos potenciales para el estudio de vida en otros planetas y poseer aplicaciones evolutivas y biotecnológicas. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar por vez primera y bajo un enfoque multidisciplinario, a las bacterias halófilas moderadas aisladas de una salinera de Manzanillo, Colima.

La caracterización se llevó a cabo analizando el gen 16S ADN_r y, para el género *Halomonas*, los genes codificadores *gyrB* y *rpoD*, también se realizaron pruebas bioquímicas tradicionales, se evaluó el perfil de ácidos grasos así como la morfología mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

El total de cepas aisladas fue 27 de las cuales se caracterizaron 12 cepas, que se clasificaron dentro de las especies *Halomonas salifodinae*, *H. caseinilytica*, *H. aquamarina*, *Virgibacillus marismortui*, *V. halodenitrificans*, *Salinicoccus roseus*, *Brachybacterium sp.* y *Oceanibacillus picturae*. De este conjunto, cabe resaltar la presencia de *O. picturae* dado que es la primera vez que se reporta en un ambiente marino mexicano, por otro lado, se tiene evidencia para creer que la cepa **M3-1** representa una nueva especie del género *Brachybacterium*. Finalmente, la tinción para detectar poli(3-hidroxibutirato), el principal plástico bacteriano, fue positiva en cinco de las cepas analizadas, por lo que se considera relevante continuar su estudio con el fin de conocer sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipersalinos se caracterizan por tener mayor concentración de sales disueltas que el agua de mar (35ups) (Mata 2006); dependiendo de la procedencia de estas sales se agrupan en talasosalinas, cuando el origen es el agua de mar y atalasalinas cuando tienen un origen distinto (Litchfield, 1998).

Las salinas marinas, provocadas y aprovechadas por el hombre para extraer sal, entran en el primer grupo, talasosalinas, en estos ambientes el contenido de sal aumenta debido a la evaporación del agua hasta que, finalmente el NaCl precipita dejando a los cationes más solubles como K^+ , Mg^+ y Mn^+ en la solución madre, por lo tanto, aunque en un inicio la concentración total de sal sea de ~3.3% (p/v), la concentración final puede estar por encima de 34% (p/v); además de la alta composición iónica otros factores que se presentan son: alta temperatura, luz intensa, pH alcalino, y la presencia de aceptores de electrones alternativos al oxígeno (Litchfield, 1998).

Por lo anterior, las salinas marinas son consideradas como ambientes extremos, pues el exceso de sales disminuye el agua disponible necesaria para el crecimiento y reproducción de muchos microorganismos (Dennis & Shimmin, 1997). Sin embargo, a lo largo de su historia evolutiva los microorganismos halófilos han desarrollado adaptaciones fisiológicas y genéticas que les permiten balancear o mantener su presión osmótica, teniendo así la capacidad para reproducirse y realizar las funciones metabólicas de manera más eficaz en presencia de altas concentraciones salinas (Meseguer, 2004).

Archaea y Eubacteria desarrollaron diferentes estrategias evolutivas para explotar los ambientes hipersalinos; por un lado las arqueas balancean la fuerza iónica extracelular contra la concentración iónica intracelular al almacenar cationes de K^+ y expulsar los de Na^+ , asimismo modifican las proteínas solubles intracelulares y otras macromoléculas para que conserven su adecuada función aún en medios con alta fuerza iónica (Dennis & Shimmin, 1997). Por el contrario, las eubacterias mantienen constante la concentración intracelular de solutos y lo hacen a través de dos mecanismos complementarios y dependientes de energía: bomba respiratoria de Na^+ y bomba antiporte de Na^+/H^+ , el primero funciona en pH alcalino, mientras que el antiporte Na^+/H^+ lo hace en pH ácido, la conexión resulta debido a la producción de energía por la bomba respiratoria de Na^+ para el posterior movimiento de Na^+/H^+ (Ventosa et al, 1998);

sin embargo, estos mecanismos son insuficientes para mantener el balance osmótico por lo que muchas eubacterias también producen o acumulan solutos compatibles, definidos como pequeñas moléculas polares que proporcionan un efecto de estabilización general en las proteínas pero que no interfieren en el metabolismo celular; ejemplo de ellos son la glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína (Dennis & Shimmin 1997; Ventosa et al., 1998; Mata 2006).

Dentro de este marco y debido a que los mecanismos antes mencionados proporcionan capacidad diferente para desarrollarse en ambientes hipersalinos, Kushner y Kamekura (1988) agruparon a los microorganismos halófilos de acuerdo a la tolerancia o necesidad por la sal en: no halófilos, su crecimiento óptimo es por debajo del 1% de NaCl; ligeramente moderados, >1-3%; halófilos moderados, >3-15% y extremófilos que pueden crecer y desarrollarse en concentraciones >15-32% de NaCl.

La adaptabilidad metabólica de las bacterias halófilas moderadas a un amplio intervalo de salinidades les permite colonizar hábitats menos restrictivos que aquellos habitados por las archeas o extremófilas. Debido a esta plasticidad, en las últimas dos décadas el interés por su estudio ha ido en aumento.

El grupo de bacterias halófilas moderadas está ampliamente distribuido en diferentes géneros, por lo mismo, poseen gran heterogeneidad fisiológica. Las especies pueden ser cocos o bacilos Gram positivos o negativos, aerobios o anaerobios facultativos que utilizan el nitrato como aceptor final de electrones, son catalasa positiva y presentan respuesta variable a la oxidasa (Ventosa et al., 1998), de igual manera secretan polisacáridos extracelulares que contribuyen a mantener la homeostasis además pueden ser productores de enzimas hidrolíticas como amilasas, DNAsas, lipasas, proteasas y pululanases (Mata, 2006).

Por otro lado, las bacterias halófilas moderadas han sido consideradas como un grupo con enorme potencial biotecnológico debido a la producción de hidroxialcanoatos y exopolisacáridos así como a la capacidad de sus enzimas para mantener las funciones catalíticas aún bajo condiciones estresantes. Se han reportado usos prometedores en el ámbito farmacéutico (Amjres et al. 2010), ambiental (García et al., 2004) e industrial (Yang et al., 2010). Por lo mismo, muchas cepas han sido estudiadas con el propósito de conocer sus aplicaciones y características fisiológicas y bioquímicas dejando poco profundizado el estudio sistemático, lo que conlleva a que el grupo se encuentre bajo constantes modificaciones (De la Haba et al., 2010; Ventosa et al., 1998).

En 1970 Colwell propuso el término de “Sistemática polifásica” con el objetivo de estudiar la diversidad bacteriana de manera fiable agrupando la información genotípica y quimiotípica de las cepas e integrándola con la fenotípica que, antes de la era genómica, constituía los caracteres más estudiados (Prakash et al., 2007), desde entonces el método se ha consolidado paulatinamente debido a la aprobación de autores diversos como Stackebrandt et al. (2002), Arahall (2007), De la Haba et al. (2010). El enfoque tiene la ventaja de hacer más estable la sistemática de bacterias y de plasmar de manera global la realidad biológica de los microorganismos (Vandamme et al., 1996), dando como resultado un concepto de especie procarionte renovado y definido como: “Categoría que circunscribe a un grupo genómico coherente de cepas aisladas que comparten alto grado de similitud en (muchas) características independientes, las cuales son comparadas bajo condiciones altamente estandarizadas” (Rossello-Mora & Amann, 2001).

Bajo este enfoque polifásico, algunos de los criterios evaluados y solicitados por el “Comité *ad hoc* para la reevaluación de especie en bacteriología” (Stackebrandt et al., 2002) son los siguientes:

- a. *Fenotípicos*: Fueron los primeros caracteres en ser analizados, incluyen características morfológicas como forma, presencia de flagelos y respuesta a tinción de Gram; así como fisiológicos y bioquímicos, es decir, producción de compuestos extracelulares, crecimiento en diferentes sustratos de fuente de carbono y energía, rangos de pH, temperatura, concentración salina, entre otros (Vandamme et al., 1996).
- b. *Genotípicos*: Basados en el análisis de ácidos nucleicos, en especial la secuencia de nucleótidos de la región 16S del ADNr; para que esta secuencia sea aceptada debe contar con al menos 1,300 nucleótidos y tener una ambigüedad <0.5% de. A pesar de ser considerado la columna vertebral de la filogenia bacteriana, el 16S ADNr posee un elevado nivel de conservación, por lo mismo, su sensibilidad disminuye cuando se estudian cepas estrechamente relacionadas (Zeigler, 2003), para contrarrestar tal efecto se ha sugerido utilizar genes codificadores de proteínas o housekeeping (De la Haba et al., 2012) que, a diferencia del 16S ADNr, sólo presentan una copia en el genoma, tienen rango bajo de inserción/delección y pueden ser fácilmente divididos en sitios sinónimos y no-sinónimos (Santos & Ochman, 2004).

- c. *Quimiotaxonómico*: El término hace referencia al uso analítico de los constituyentes químicos de las bacterias. Dentro de los marcadores más utilizados se encuentran los componentes de la membrana celular y la proporción relativa de ácidos grasos, lipopolisacáridos, isoprenoides, quinonas y poliaminas (Prakash et al., 2007)

La resolución de cada parámetro es diferente, por lo que con cada uno se alcanza un nivel taxonómico distinto (**Figura 1**), pero al final coherente.

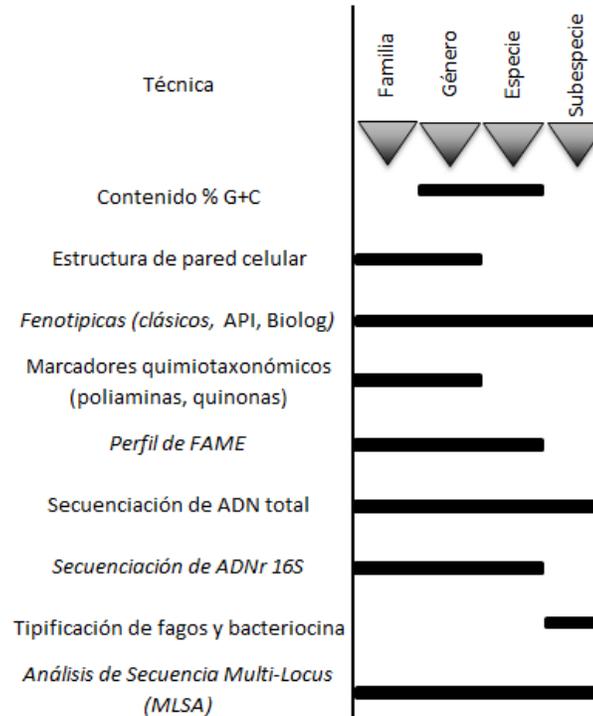


Figura 1. Capacidad de resolución taxonómica de algunas de las técnicas con mayor aplicación. Los nombres en itálicas denotan aquellas técnicas utilizadas en este estudio. FAME, esterios metílicos de ácidos grasos (por sus siglas en inglés). Modificado de Vandamme et al. (1996), Staley (2006) y Prakash et al. (2007).

En el caso de México, aunque escasos, hay estudios que respaldan el método polifásico. Las investigaciones más abundantes se han realizado en el norte del país, en ambientes salinos de Coahuila, especialmente Cuatro Ciénegas, donde se reportaron géneros como *Halomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Vibrio*, entre otros (Cerritos et al., 2008; Delgado-García et al., 2013; Souza et al., 2006); asimismo se han hecho estudios en la Exportadora de Sal (ESSA), localizada en Baja California Norte, municipio Guerrero Negro, en esta salinera se encontraron los géneros de *Salicola*, *Halovibrio*, *Halomonas*, y *Salinibacter* (Sabet et al., 2009); sin embargo, en lo que respecta al Pacífico central no se ha reportado ningún estudio sobre el tema.

Los ambientes hipersalinos, como los suelos de salinas marinas, son una fuente prácticamente inagotable de microorganismos halófilos, cuyo estudio contribuye a profundizar el conocimiento sobre la dinámica de los ecosistemas extremos y de la biodiversidad procariota, además de constituir modelos potenciales para el estudio de vida en otros planetas y poseer aplicaciones evolutivas y biotecnológicas. La manera más efectiva de abordar el estudio sistemático es identificando a los microorganismos bajo un enfoque multidisciplinario que incluya características fenotípicas, bioquímicas y moleculares para que de esta manera se evite obtener resultados erróneos. Bajo este razonamiento, el presente trabajo tiene como objetivo la caracterización genotípica, fenotípica y quimiotaxonómica de bacterias halófilas moderadas aisladas del suelo de una salinera en Manzanillo, Colima, constituyendo así el primer reporte en su tipo para el Pacífico mexicano.

OBJETIVOS

General:

- Caracterizar polifásicamente a los microorganismos halófilos moderados aislados de una salinera en Manzanillo, Colima.

Particulares:

- Aislar cepas halófilas moderadas con medio selectivo.
- Analizar la filogenia del gen 16S ADNr y genes codificadores de proteínas para su identificación sistemática.
- Determinar los rasgos fenotípicos de cada cepa.
- Obtener el perfil de ácidos grasos totales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas fueron sembradas en agar nutritivo al 7.5% y 10% de NaCl (p/v) e incubadas a 32°C, de esta manera se aislaron únicamente bacterias halófilas moderadas. Todas las pruebas se llevaron a cabo durante la fase de crecimiento exponencial y sólo con concentración de 7.5% NaCl.

La morfología de la cepa se analizó por tinción de Gram; una vez comprobada que existía un solo tipo de morfología -cocos o bacilos- la cepa se trasladó a tubos crioviales con caldo nutritivo y glicerol al 10%, en donde fue conservada a temperatura de -70°.

Análisis genético

El ADN de cada cepa fue aislado y purificado con la ayuda del kit ultraclean (*Mo Bio Technologies*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La evaluación del mismo se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y absorbancia de luz UV.

A partir del ADN genómico de las cepas se amplificó el gen 16S ADNr; una vez obtenidos los resultados se identificaron las cepas pertenecientes al género *Halomonas* ya que de acuerdo con lo establecido por el comité *Ad hoc* para la evaluación de las especies en bacteriología (Stackebrandt et al., 2002) y De la Haba et al. (2012) el género requiere de una caracterización más detallada donde se incluyan genes codificadores de proteínas;

siguiendo estas recomendaciones, además del 16S ADNr (Baker, Smith, & Cowan, 2003), también se amplificaron los genes *gyrB* y *rpoD* (**Cuadro 1**), que fueron elegidos porque de acuerdo con Zeigler (2003), su longitud es la adecuada para proporcionar valiosa información filogenética, se encuentran separados en el cromosoma principal y tienen buen grado de conservación, aunado a esto De la Haba et al. (2012) reportan que los árboles filogenéticos producen una topología similar por lo que son los más adecuados como marcadores filogenéticos en la familia Halomonadaceae.

Para la reacción de PCR punto final, se utilizó la DNA polimerasa *MyTaq* (Bioline). El volumen de reacción para la amplificación por PCR fue de 25µl de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de PCR se especifican en la Cuadro 1. Los productos de la reacción fueron evaluados en gel de agarosa al 1.2%; para estimar la longitud de los amplicones se utilizó el marcador de tamaño molecular KAPA Express Ladder Kit de 8,000pb.

Cuadro 1. Lista de oligos utilizados en la amplificación de los genes 16S ADNr, *gyrB* y *rpoD*. Las bases degeneradas están marcadas de acuerdo con el código de IUPAC.

Región amplificada	Oligos	Secuencia (5'→3')	Condiciones
16S ADNr Eubacterias	FD1Eubac	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	5min, 95°C; 30 x (30seg, 95°C; 1.10min, 57°C, 1.10min, 72°C)
	RD1Eubact	AGG GAG GTG ATC CAG CC	
Región interna 16S ADNr <i>Halomonas</i>	16SHaloF	GAC GAT CCG TAG CTG GTC TG	3min, 95°C 35 x (30seg, 95°C; 1.10min, 63°C, 1.10min, 72°C)
	16SHaloR	AGG GTK GCG CYC GTW VCG G	
Girasa subunidad B <i>Halomonas</i>	<i>gyrB</i> 216F	GAR GTB ATC ATG ACS GTG CT	3min, 95°C 35 x (30seg, 95°C; 1min, 50°C, 1min, 72°C)
	<i>gyrB</i> 1321R	GCR TCS GTC ATG ATG ATS AY	
Rpo subunidad σ <i>Halomonas</i>	rpoD88F	ATG ATY AAC GAC ATG GGY AT	3min, 95°C 35 x (30seg, 95°C, 50seg, 58°C, 1min, 72°C)
	rpoD1321R	TTS AKC TTR TTG ATG GTC TC	
Región interna 16S ADNr <i>Bacillus</i>	Bac6F	AGC CTG ATG GAG CAA CGC CG	3min, 95°C; 35 x (30seg, 95°C; 1.10min, 68°C, 1.10min, 72°C)
	Bac6R	TTG CGC TCG TTG CGG GAC TT	
Región interna 16S ADNr Eubacteria	E334-16S-F	CCR RAC TCC TAC GGG AGG CAG C	3min, 95°C; 32 x (30seg, 95°C; 1.00min, 63°C, 1.00min, 72°C)
	U1115R	AGG GTT GCG CTC GTT GCG	

La secuenciación de cada producto de PCR se realizó con el método por dideoxinucleótidos utilizando el kit Big Dye V3.1 en el equipo Applied Biosystems Hitachi 3130xl Genetic Analyzer. El alineamiento de secuencias se realizó con el software Geneious R7.1.3, en caso de ser necesario, se editó manualmente, posteriormente las secuencias se compararon en la base de datos de GenBank mediante la herramienta Blast. La reconstrucción filogenética se generó en el mismo software, sin embargo para conocer cuál era el modelo genético de distancia que mejor se ajustaba al alineamiento obtenido, se utilizó la herramienta en línea *find model HIV Database*: (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html). Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron tanto el programa *Mr. Bayes*, como el *Geneious Tree Builder* con un análisis de la probabilidad posterior (Bootstrap) de 100,000 repeticiones.

A partir de las secuencias obtenidas se identificaron, ocho especies de cuatro géneros de las cuales se eligió una cepa de cada especie para realizar la caracterización bioquímica, análisis quimiotaxonómico y fotomicrografía en Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Caracterización bioquímica

Pruebas fisiológicas

La capacidad de las cepas para crecer en diferentes concentraciones salinas fue evaluada en agar nutritivo a 0, 3, 7.5, 10, 15, 20 y 25% NaCl (w/v); asimismo se determinó el crecimiento a valores de pH de 6, 7, 8 y 9 ajustando el medio con HCl o NaOH según fuera el caso, finalmente, para el crecimiento a distintas temperaturas, las cepas se incubaron a 4°, 15°, 20°, 32°, 37° y 40°C durante una semana, con excepción de los 4°C donde las cepas se dejaron crecer por dos semanas (Mata et al., 2002)

Pruebas bioquímicas

La reacción de catalasa se realizó agregando gotas de H₂O₂ en portaobjetos que contenían a las cepas, si el líquido comenzaba a burbujear, era signo de la liberación de H₂O y O₂, por lo tanto la prueba se marcaba como positiva. Para la respuesta a oxidasa cada cepa se colocó en discos con NNN,N'-tetrametil, 1-4, fenileldiamina, la prueba se consideró positiva cuando la forma oxidada de citocromo C tiñó los discos de morado.

La hidrólisis de almidón se valoró en agar nutritivo suplementado con 1% de almidón y 7.5% NaCl, después de cuatro días de cultivo la prueba se reveló con Lugol tomando como respuesta positiva la presencia de halos traslúcidos alrededor de las colonia (Mata et al., 2002); para la hidrólisis de Tween 80 se preparó un buffer de fosfatos a 67mM y pH 7, posteriormente, por cada 100ml de buffer se agregaron 500µl de Tween 80 y 2ml de rojo neutro al 0.1%, la respuesta positiva del cambio en el color del medio de amarillo a rosa se observó a los 5 y 10 días de inoculación. El crecimiento en Citrato se evaluó con el medio del mismo nombre suplementado con 7.5% NaCl.

La tinción para detectar la presencia del ácido poli(3-hidroxitbutirato) se realizó en cultivos de cinco días siguiendo la técnica descrita por Ostle y Hotl (1982), posterior a lo cual se realizaron frotis que fueron observados en microscopia de fluorescencia invertida.

Pruebas nutricionales

Para los ensayos nutricionales se utilizó el medio Koser (1923), modificado por Ventosa et al (1982), consistió en (%p/v): NaCl, 7.5; KCl, 0.2; MgSO₄ 7H₂O, 0.02; KNO₃, 0.1; (NH₄)₂HPO₄, 0.1 y KH₂PO₄, 0.05. Los compuestos orgánicos utilizados como única fuente de carbono y/o energía fueron: maltosa, lactosa, D-manosa, D-rafinosa, D-glucosa, L-Ser y L-Ala; estos sustratos se esterilizaron por filtración y se agregaron al medio basal, los carbohidratos se utilizaron al 0.1% (p/v) mientras que los aminoácidos fueron al 0.2% (p/v), en este caso el medio basal contenía únicamente KNO₃ o (NH₄)₂HPO₄. Para cada sustrato se dejó un tubo sin inculo, el cual fue utilizado como testigo negativo; las cepas se cultivaron a 32°C por 72h siendo la turbidez del medio, comparada con el tubo testigo, el resultado de la asimilación del sustrato.

Caracterización morfológica

Se utilizó microscopía electrónica de barrido (MEB) para corroborar la morfología de los organismos y conocer su tamaño (Yang et al., 2010); debido a la fisiología de las cepas fue necesario realizar modificaciones en el protocolo de preparación de muestras. Se pesó aproximadamente 20mg de muestra a la cual se agregaron 500µl de solución salina a 7.5% de NaCl y 500µl de ácido acético al 8%, la muestra se homogenizó suavemente en vortex por 15min, posteriormente se centrifugó y se recuperó la pastilla, después de lo cual cada cepa fue fijada durante cuatro horas con una solución de glutaraldehído (2.5%) más cacodilato (100µM) ajustando el pH a 7, una vez terminado el tiempo se lavaron con

cacodilato (20%), finalmente se utilizó un tren de deshidratación de etanol al 50, 60, 70 y 96% v/v a temperatura ambiente durante dos horas.

Análisis quimiotaxonómico

A partir de cultivos jóvenes (3-4 días) se pesaron 50mg de bacteria, los cuales se agregaron junto con una mezcla de cloroformo: metanol (2:1) en un homogenizador tipo Potter de 3ml, para aumentar la polaridad de las fases se agregó 750µl de agua destilada, posteriormente, la mezcla se centrifugó por aproximadamente un minuto y se recuperó la fase inferior en viales para después ser evaporada a sequedad con ayuda de Nitrógeno. Una vez evaporado el solvente se adicionaron 500µl de BF₃ al 12% en metanol y 100µl de ácido heptadecanóico (1mg/ml), el cual fue utilizado como estándar; los viales se pusieron en baño de ebullición durante 20min, cuando la muestra se hubo enfriado se le agregó 500µl de hexano y se agitó en vortex, posteriormente se agregó 1ml de agua destilada y se volvió a agitar en vortex. Finalmente se desechó la fase acuosa y se conservó la muestra a -20°C en frascos ámbar.

El análisis cuantitativo de la totalidad de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) se realizó en un cromatógrafo de gases (CG) modelo 6850 equipado con una columna capilar HP-5MS con diámetro interno de 25mm y película de 0.25µm, el flujo de corrida fue de 1ml/min y la velocidad de 38cm/seg el CG se encontraba acoplado detector de espectro de masas (MS) modelo 5975C, el rango de masa detectado fue de 35-400 m/z, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C y la del cuadrupolo de 150°C, la energía de ionización fue de 70 electrones/Volt. En el CG/MS se inyectaron 2µl de muestra, el tiempo total de corrida fue de 23.50min con una temperatura inicial de 150°C por 2min, la corrida se realizó con tres rampas, la primera a 5°C/min hasta 200°C, la siguiente de 3°C/min hasta 215°C y la última de 10°C/min hasta 260°C por dos min; el tipo de inyección fue split y la temperatura del inyector fue de 250°C. Los FAME se identificaron de acuerdo al tiempo de retención en la columna del CG, en caso de que el resultado fuera dudoso, entonces se procedió a analizar su espectro de masas utilizando la librería de búsqueda NIST Data Base 08, distribuida por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

RESULTADOS

Se aislaron un total de 27 cepas de bacterias halófilas moderadas de una salinera en Manzanillo, Colima. De acuerdo con el análisis polifásico, las cepas se agruparon en cinco géneros y ocho especies (**Cuadro 2**) las cuales reflejan la heterogeneidad de éste grupo, pues las únicas características comunes que presentan son la respuesta positiva a catalasa y su incapacidad para desarrollarse en medio sin suplemento salino. A continuación se describen las características analizadas en cada género.

Cuadro 2. Variedad de géneros y especies aisladas de la salinera en Manzanillo, Colima, junto al respectivo número de cepas purificadas.

Género	especie	Número de cepas	Cepa caracterizada	
<i>Halomonas</i>	<i>salifodinae</i>	5	M1-2	M1-18
	<i>caseinilytica</i>	2	M1-16	M2
	<i>aquamarina</i>	1	M2-5	M2-8
<i>Virgibacillus</i>	<i>marismortui</i>	6	M4-14	
	<i>halodenitrificans</i>	7	M1-26	
<i>Salinicoccus</i>	<i>roseus</i>	2	M1-15	
<i>Brachybacterium</i>	<i>sp.</i>	2	M2-1	
<i>Oceanobacillus</i>	<i>picturae</i>	2	M3-1	
			M3-7	

Análisis genético

El criterio genético para que una cepa sea clasificada como cierta especie es que haya por lo menos, 97% de similitud en la secuencia de la región del 16S ADNr entre la nueva cepa y la especie de referencia, asimismo la secuencia no debe ser menor a los 1300 nucleótidos (Stackebrandt & Goebel, 1994; Staley, 2006), en todas las cepas aisladas estos requisitos se cumplieron cabalmente.

Halomonas

Sea por razones biotecnológicas, económicas o mero interés científico, las relaciones filogenéticas en *Halomonas spp.* han sido investigadas con más profundidad que en otros géneros, al punto que se han descubierto organismos que comparten 100% de similitud en el gen 16S ADNr y aún así, por su caracteres fenotípicos y quimiotaconómicos, son consideradas especies diferentes, por lo mismo, los lineamientos sistemáticos son más

estrictos, razón por la cual se decidió realizar el estudio polifásico en todas las cepas aisladas y no en una cepa por especie, como anteriormente se menciona.

Para las ocho cepas de *Halomonas spp.* se analizaron las secuencias de tres loci: 16S ADNr, *gyrB* y *rpoD* (genes codificadores de proteínas), para cada uno la longitud de las secuencias fue de 1,463pb, 1,028pb y 1,145pb, respectivamente.

La reconstrucción filogenética de cada locus generó una topología similar, siempre separando a las especies en tres grupos bien diferenciados (**Figura 2**). En el grupo 1 (azul) o *sensu stricto*, por tener a la especie tipo, se encuentran las cepas **M2-5** y **M2-8** con un porcentaje de similitud en 16S ADNr, respecto de *H. caseinilytica*, de 99.7% y 99.9%, respectivamente (**Figura 2**); por el contrario en el GenBank no existe secuencia de dicha especie para *gyrB* y *rpoD* por lo que al realizar la búsqueda por Blast las cepas se agruparon con la especie más próxima, *H. elongata* para *gyrB* y *H. eurihalina* para *rpoD* (**Figura 2b** y **2c**). En el grupo 2 (rosa) únicamente se encuentra una cepa, **M4-14**, la cual presentó una similitud en 16S ADNr de 99.8% con *H. aquamarina*. Por último, las cepas **M1-2**, **M1-16**, **M1-18**, **M1-27** y **M2** tuvieron un porcentaje de similitud con *H. salifodinae* por encima del 99% y al no existir secuencia en GenBank para *gyrB* y *rpoD* fueron agrupadas con *H. pacifica*. La **figura 2c** representa la concatenación de los tres loci, como en los casos anteriores, se observa que la topología se mantiene.

A pesar de que para cada gen todas las cepas tuvieron una similitud por encima de 99% con la especie más próxima, en los tres árboles se observa una relación más cercana entre ellas que con las especies ya reportadas.

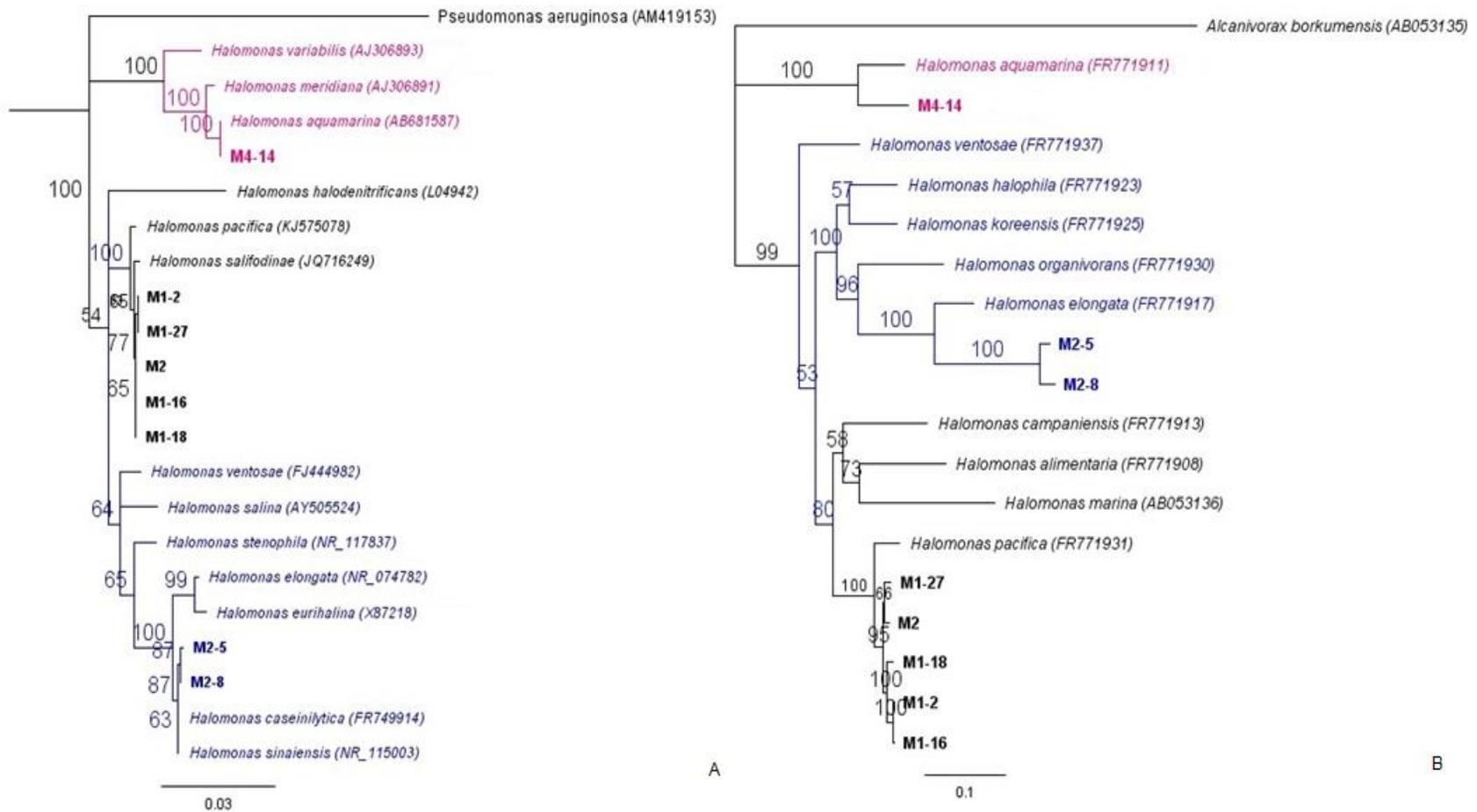


Figura 2. Árboles filogenéticos construidos con Mr. Bayes de las cepas agrupadas con el género *Halomonas*. A) 16S ADNr, el valor de la probabilidad posterior se obtuvo con el modelo Tamura-Nei con 100,000 repeticiones, B) *gyrB*, C) *rpoD* y D) secuencias de los tres loci concatenadas. El valor de probabilidad posterior se obtuvo con el modelo de sustitución General Time Reversible plus gamma con 100,000 repeticiones cada uno. El color en cada árbol representa los grupos en que se separó el género.

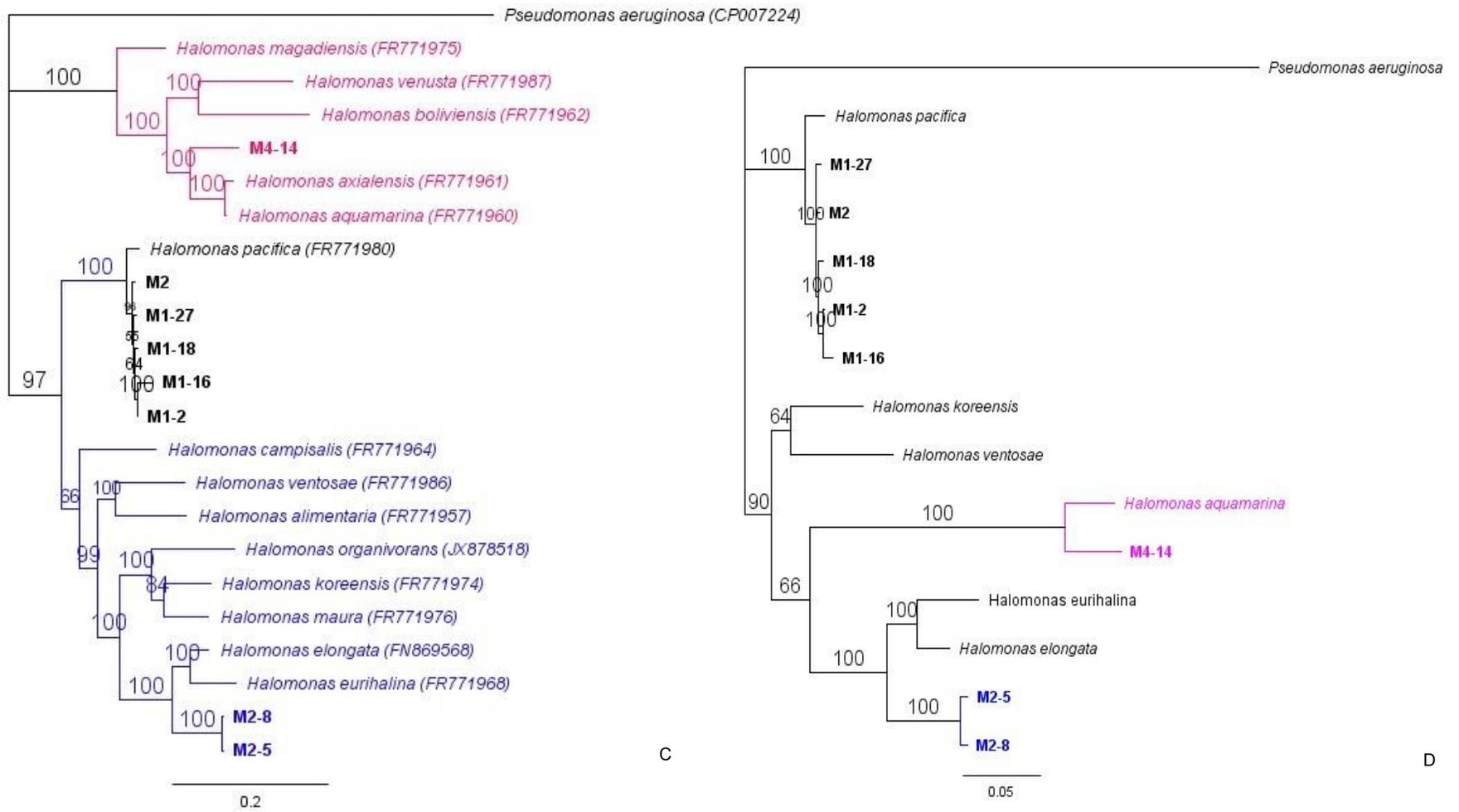


Figura 2. Continuación...

Virgibacillus y Oceanobacillus

De las cepas aisladas 13 correspondieron al género *Virgibacillus*, siete se agruparon con *V. halodenitrificans* y seis con *V. marismortui* (**Figura 3a**), en todos los casos el porcentaje de similitud estuvo por encima del 99%. En el árbol filogenético se observa cómo estas dos especies se separan en dos clados bien diferenciados, la razón de este fenómeno es que en la primera mitad del alineamiento de 16s ADNr las secuencias mostraron 21 cambios que en su mayoría, consistieron en mutaciones puntuales de transición; los nueve cambios restantes se encontraron a partir del residuo 913, siendo seis de ellos transversiones.

Las dos cepas agrupadas con *Oceanobacillus picturae* (**Figura 3b**) presentaron una situación similar a la de *Virgibacillus*, a pesar de que la cantidad de cambios fue menor (ocho en total), todos ellos se encuentran en la primer mitad del alineamiento de 16S ADNr y, en su mayoría, son transiciones. El porcentaje de similitud entre la cepas y *O. picturae* fue mayor al 99%, a pesar de esto la **Figura 3b** muestra que existe mayor similitud entre ellas que con la especie de referencia, esto apoyado con una probabilidad posterior de 63%.

Salinicoccus y Brachybacterium

Dos de las cepas aisladas presentaron más del 99% de similitud con el gen 16s ADNr de *Salinicoccus roseus*, en el árbol filogenético el valor de bootstrap fue de 83% (**Figura 3c**) el cual se considera como aceptable para establecer las relaciones filogenéticas (Choudhuri, 2014).

La única cepa que se agrupó con *Brachybacterium conglomeratum* fue **M3-1**, sin embargo el valor de probabilidad posterior de este clado fue de tan sólo 52% (**Figura 3d**). A lo largo de los 1,380 pb de longitud de las secuencias, **M3-1** únicamente tuvo cuatro cambios con *B. conglomeratum* y dos con *B. paraconglomeratum* y entre ambas se presentaron cuatro transiciones; lo anterior refleja la estrecha relación entre estas dos especies y, como bien indica Zeigler (2003), la poca sensibilidad en la subunidad pequeña del ADNr para discriminar entre especies con estrecha cercanía.

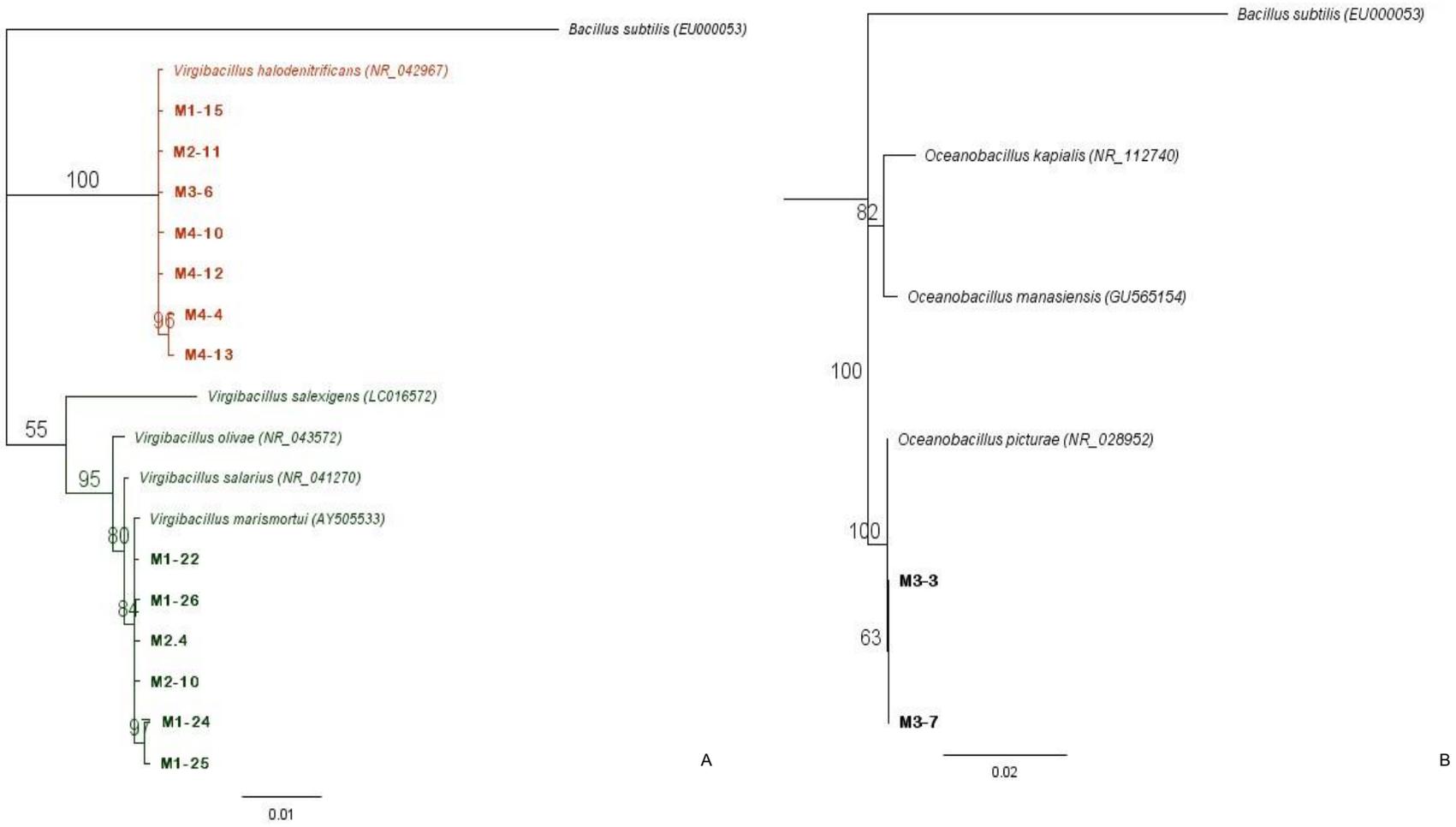
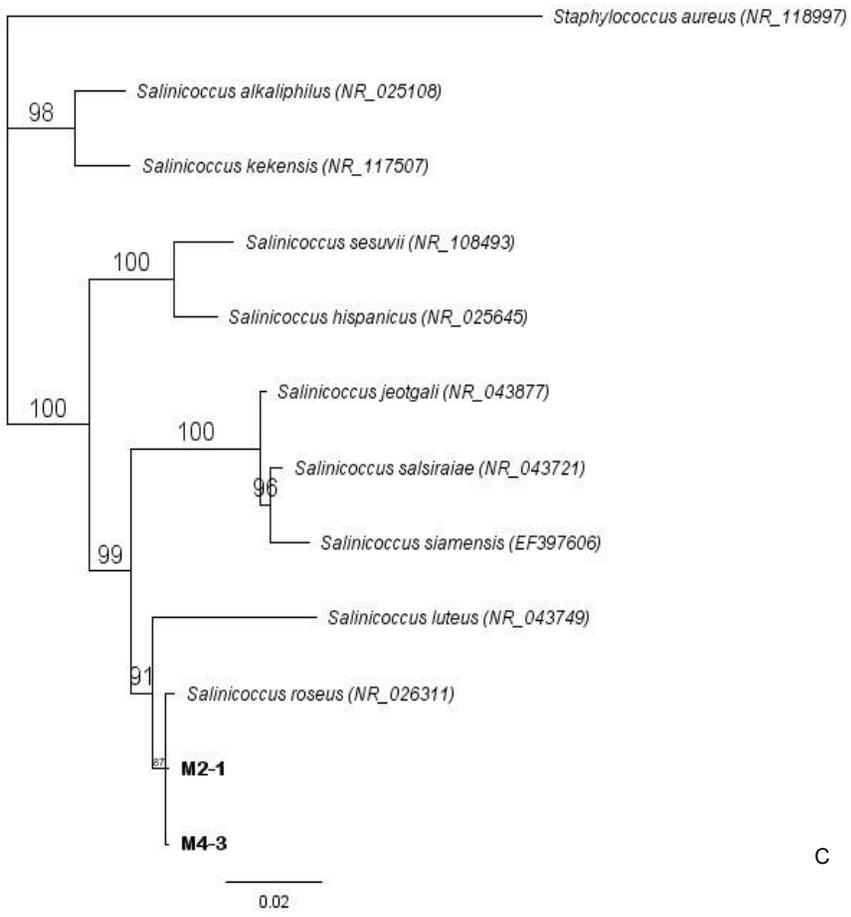
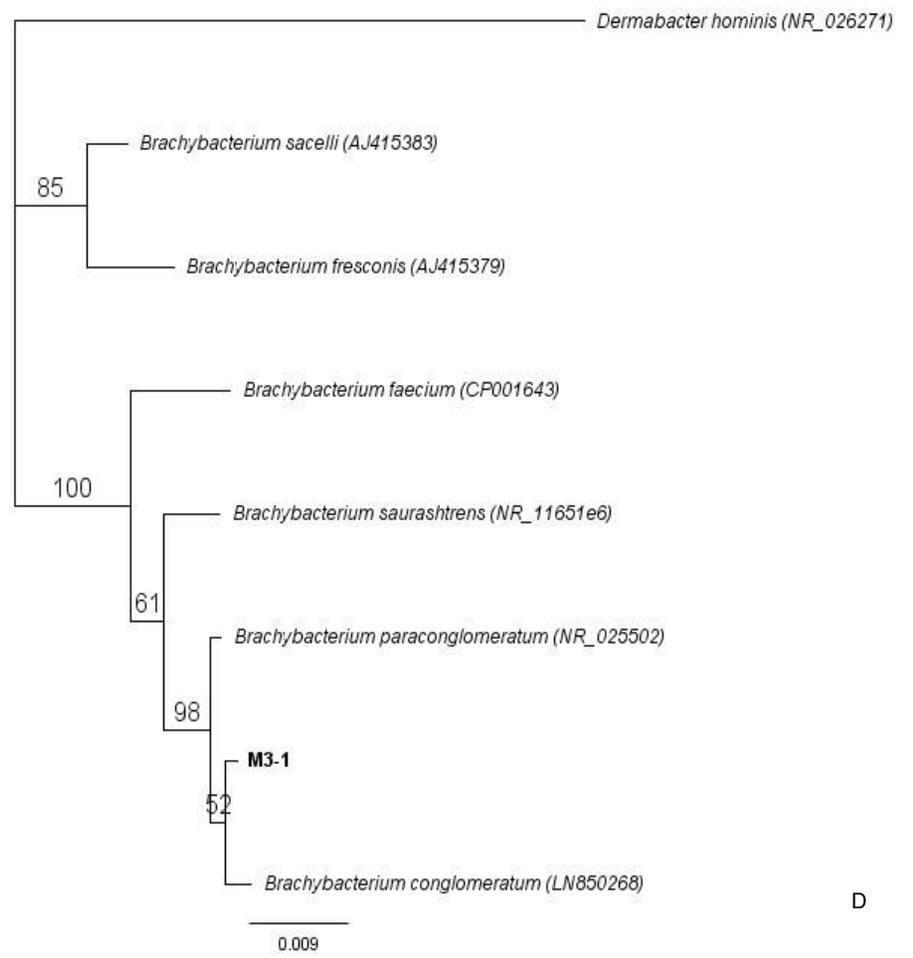


Figura 3. Filogenia de las cepas correspondientes al género A) *Virgibacillus*, B) *Oceanobacillus*, C) *Salinicoccus* y D) *Brachybacterium* reconstruida a partir de la comparación del gen 16S ADNr. El modelo estimado para todos los árboles fue General Time Reversible plus gamma, cada uno con 100, 000 repeticiones. Para *Virgibacillus*, se resalta en color la separación del género en dos grupos.



C



D

Figura 3. Continuación...

Caracterización bioquímica

Para conocer los caracteres fenotípicos de las cepas se aplicaron pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales en 12 de las 27 cepas aisladas, en cuanto al análisis nutricional se realizaron las pruebas que Mata et al (2002) sugieren para distinguir entre especies de *Halomonas* estrechamente relacionadas, por esta razón se recomienda aplicar pruebas estandarizadas (API, BIOLOG) en las cepas restantes a fin de que la caracterización sea más detallada.

Halomonas

En general, todas las cepas tuvieron caracteres fenotípicos consistentes con la especie agrupada en el análisis filogenético. De las 18 características analizadas, sólo hubo entre una y cinco diferencias por grupo, en especial en la capacidad para hidrolizar y asimilar sustratos; sin embargo, una diferencia constante en los tres grupos fue la capacidad de las cepas para desarrollarse hasta con 25% de NaCl (**Cuadro 3**).

Virgibacillus y Oceanobacillus

Entre la respectiva especie de referencia y **M1-15** y **M1-26** la diferencia más notable en cuanto a caracteres fenotípicos, fue la incapacidad de las cepas para asimilar sustratos como única fuente de carbono y energía. De los cinco sustratos utilizados por la especie tipo de *V. marismortui*, **M1-26** únicamente asimila dos (maltosa y D-manosa), mientras que **M1-15** fue incapaz de crecer y desarrollarse en ninguno de los sustrato utilizados (**Cuadro 3**).

Por otro lado, **M3-7** presentó características bastante consistentes con *O. picturae* con tan sólo la diferencia en la hidrólisis de almidón y el crecimiento en D-rafinosa.

Salinicoccus y Brachybacterium

Salinicoccus roseus presentó 12 similitudes, entre las 18 características analizadas, con la cepa **M2-1**, una vez más, las diferencias constaron en la capacidad para hidrolizar y asimilar sustratos, asimismo es importante mencionar la habilidad de **M2-1** para crecer y desarrollarse a partir de 4°C, ya que la especie tipo puede hacerlo sólo hasta los 15°C.

La cepa **M3-1** fue la única que se agrupó con *Brachybacterium*, sin embargo tanto en el análisis filogenético como en la caracterización fenotípica, no es posible diferenciar si corresponde a la especie *B. conglomeratum* o *B. paraconglomeratum*, pues como establecieron Takeuchi *et al.* (1995) los caracteres fenotípicos de ambas especies son lo bastante similar como para imposibilitar la diferenciación entre una y otra; aunado a esto, más de la mitad de las pruebas realizadas en este estudio no se habían aplicado con anterioridad a ninguna de las dos especies.

Como parte de las pruebas bioquímicas, se realizó la detección de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), el fluorocromo que se une al compuesto es negro sudan el cual se excita en el rango de luz verde (500-550nm) emitiendo la misma en el rango del rojo (650-700nm), por lo tanto los PHB se observan como puntos rojos-naranjas. La respuesta fue positiva para tres cepas del género *Halomonas* (**M2-15**, **M2-8** y **M4-14**), una del género *Virgibacillus* (**M1-15**) y la cepa agrupada con *Brachybacterium*, **M3-1** (**Figura 4**).

Caracterización morfológica

En la **Figura 5** se observa la morfología en MEB de las cepas agrupadas con el género *Halomonas*, en algunas, **Figura 5e** y **5g**, se pueden observar la presencia de PHB como una película que embebe a las células. Por otro lado, la **Figura 6** corresponde a las cepas agrupadas con *Virgibacillus*, mientras que la **Figura 7** representa a las cepas de *Oceanobacillus*, *Salinicoccus* y *Brachybacterium*.

Cuadro 3. Características fenotípicas entre cepas aisladas y la respectiva especie con la cual obtuvieron mayor similitud (columnas sombreadas) de acuerdo a los resultados del análisis filogenético. Todas las cepas fueron halófilas obligadas y positivas para catalasa. 1. *H. salifodinae*, 2. *H. caseinilytica*, 3. *H. aquamarina*.

Característica	M1-2	M2	M1-16	M1-18	1 ^a	M2-5	M2-8	2 ^b	M4-14	3 ^c
Morfología	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram-	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -	Bacilos Gram -
Tamaño µm	1.11-1.27 x0.33-0.44	1.2-1.7x 0.31-0.32	1.35-1.78 x 0.5-0.71	1.75- 2x0.5	4.0-6.0 x0.8-1.2	0.87-1x 0.3-0.45	0.83-0.91 x0.3-0.33	0.8-2.0 x 0.4-0.6		
Intervalo NaCl (%)	3-25*	3-20	3-25*	3-25*	0.5-20	3-25*	3-25*	0.5-15	3-25*	0.5-20
Temperatura (°C)	4-40°	15-40°	4-40°	4-40°	4-48°	4-40°	4-40°	4-48°	4-40°*	15-37°
pH	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	6-9	5-9	6-9	5-10
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
PHB	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Hidrólisis</i>										
Almidón	-*	-*	-*	-*	+	-	-	-	-*	+
Tween 80	-	+*	+*	+*	-	-	ND	-	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Crecimiento en:</i>										
Maltosa	+	+	+	+	+	-*	+	+	+*	-
Lactosa	+*	+*	+*	+*	-	-*	+	+	+	+
D-Manosa	-	-	+*	-	-	+	+	+	-	-
D-Rafinosa	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ser	-*	-*	-*	-*	+	+	+	+	+*	-
L-Ala	+	-*	-*	+	+	+	+	+	-*	+

A menos que se establezca de otra forma los datos fueron tomados de: ^aWang et al (2008), ^bWu et al (2008), ^cMata et al (2002). *Diferencias con respecto a la especie tipo.

Cuadro 3. Continuación 4. *V. halodenitrificans*, 5. *V. marismortui*, 6. *O. picturae*, 7. *S. roseus*, 8. *B. paraconglomeratum*. 9. *B. conglomeratum*.

Característica	M1-15	4 ^d	M1-26	5 ^f	M3-7	6 ^g	M2-1	7 ^h	M3-1	8 ⁱ	9 ⁱ
Morfología	Bacilos Gram+	Bacilos**	Bacilos Gram +	Bacilos Gram +	Bacilos Gram +	Bacilos Gram +	Cocos Gram +	Cocos Gram +	Cocos Gram +	Cocos Gram +	Cocos Gram +
Tamaño µm	1.42-2.5x 0.28-0.78	2.5-4x 0.6-0.8	1.54-2.2 x 0.5-0.54	2-3.6 x 0.5-0.7	1.15-1.47 x0.26- 0.31	2-6 x 0.5- 0.7	0.9-1.25	1-2.5	0.57-0.63	0.5-2	0.5-2
Intervalo NaCl (%)	3-15*	2-23	3-20	5-20	3-25	5-10 (óptimo)	3-25	0.9-25	3-15	2-15	2-15
Temperatura (°C)	15-40**	10-45°	15-40°	15-50°	15-40**	5-40°	4-40**	15-40°	15-40°	ND	ND
pH	6-9	5.8-9.6	6-9*	6.5-8	6-9	ND	6-9	6-9	6-9	ND	ND
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PHB	+	ND	-	ND	-	ND	-	ND	+	ND	ND
<i>Hidrólisis</i>											
Almidón	-	-	-	-	-*	Débil	-*	+	+	+	+
Tween80	+*	-	-	-	-	ND	-*	+	+	-	Variable
Citrato	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
<i>Crecimiento en:</i>											
Maltosa	-*	+	+	+	-	Varía	+*	-	+	ND	ND
Lactosa	-	Variable	-	+	-	Varía	-	-	+	ND	ND
D-Manosa	-*	+	+	+	+	Débil	+*	-	+	ND	ND
D-Rafinosa	-	-	-*	+	-*	+	-	-	+	ND	ND
D-Glucosa	-*	+	-*	+	-	-	-	-	+	ND	ND
L-Ser	-	ND	-	-	+	ND	-	-	+	ND	ND
L-Ala	-	ND	-	-	+	ND	-*	+	+	ND	ND

Datos tomados de: ^d Yoon et al. (2004), ^f Arahall et al. (1999), ^g Heyrman (2003), ^h Ventosa et al. (1990), ⁱ Takeuchi et al. (1995). *Diferencias respecto a la especie tipo. ** De acuerdo con Yoon et al. (2004) la respuesta a la tinción Gram es dependiente del estado de desarrollo de *V. halodenitrificans*. **PHB: Poli (3-hidroxibutirato)**

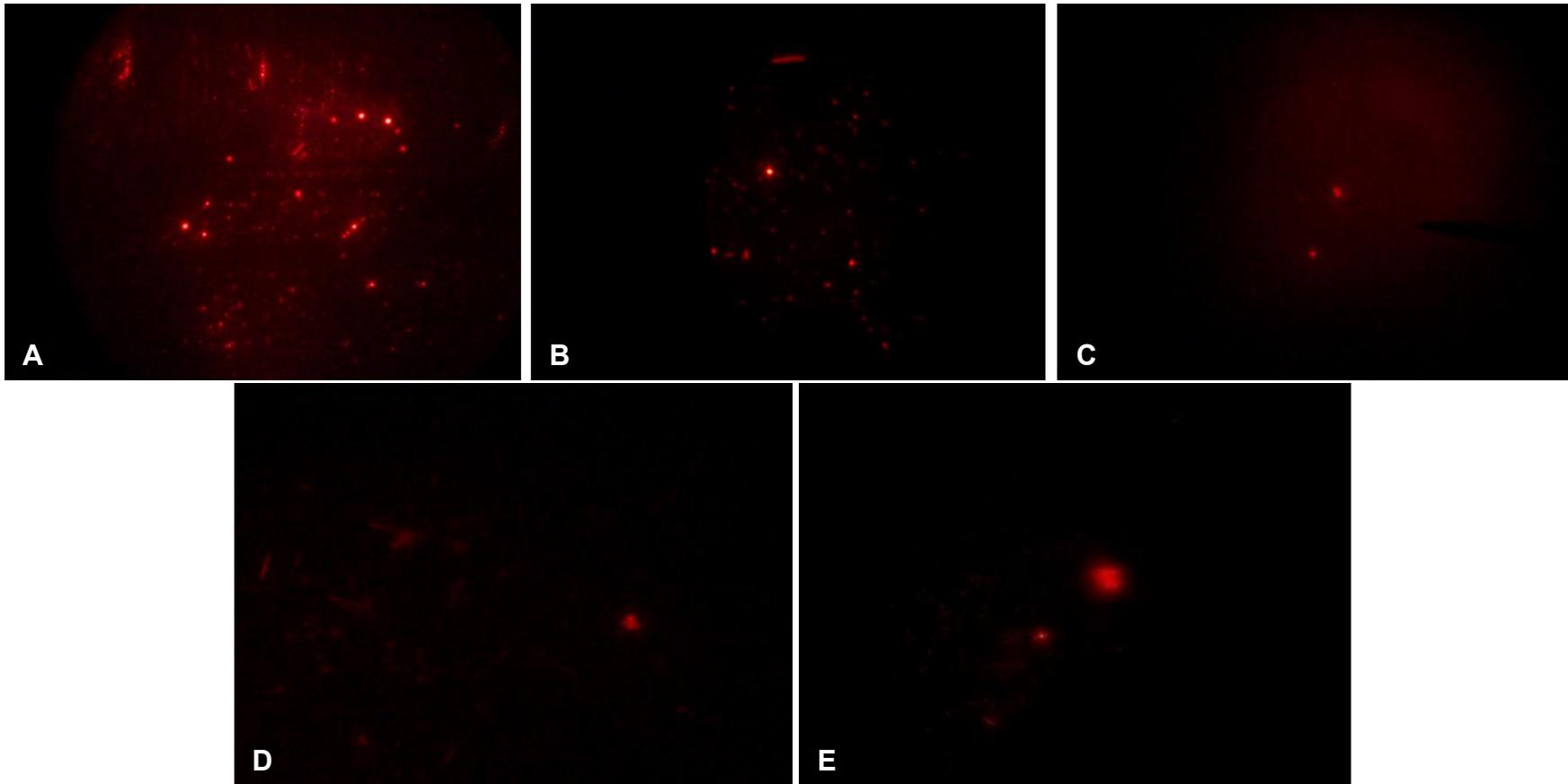


Figura 4. Detección positiva de PHB en las cepas A) **M2-5**, B) **M2-8** y C) **M4-14** correspondientes al género *Halomonas*, así como D) **M1-15** y E) **M3-1** agrupadas con *V. halodenitrificans* y *Brachybacterium sp.*, respectivamente

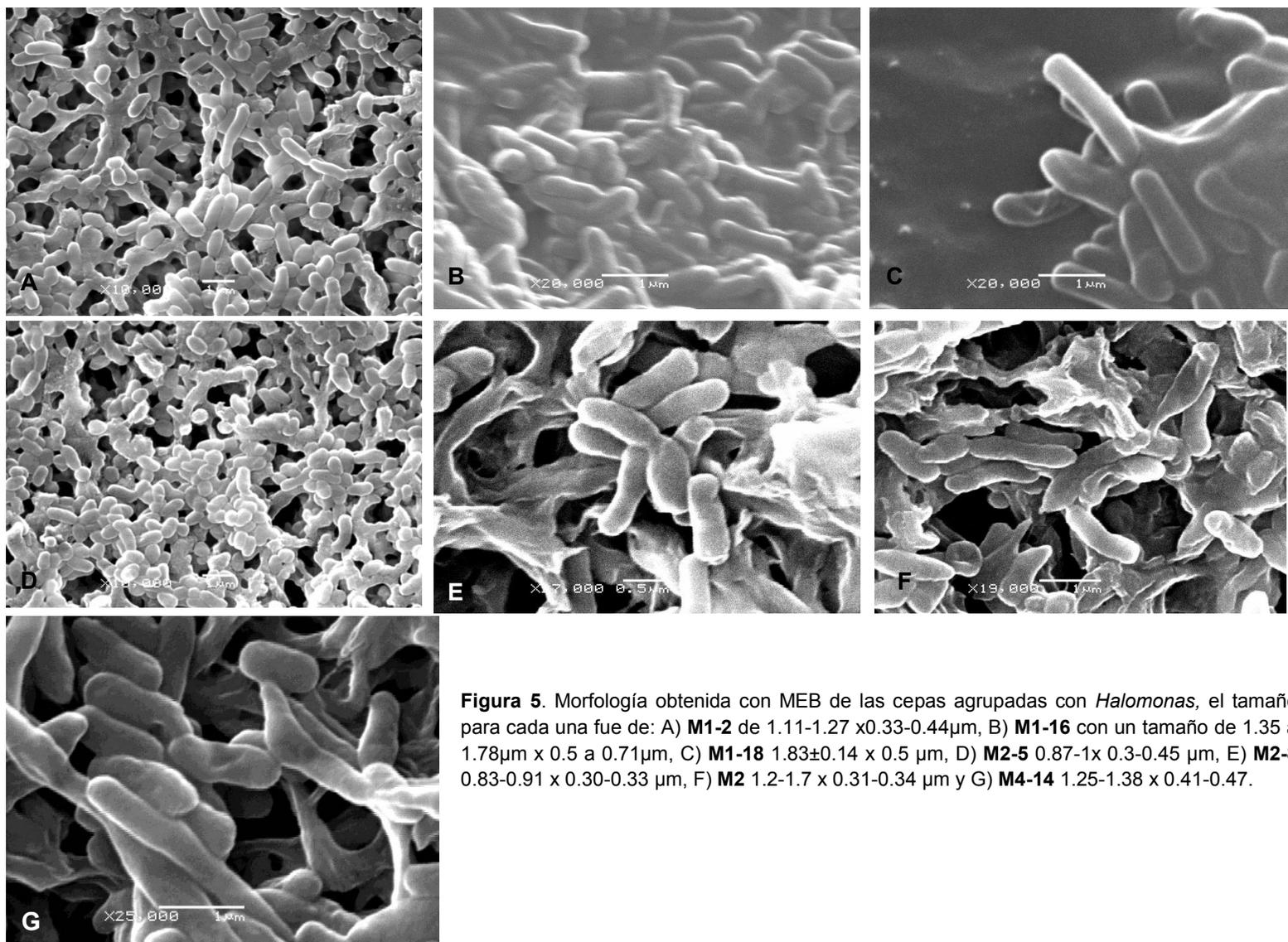


Figura 5. Morfología obtenida con MEB de las cepas agrupadas con *Halomonas*, el tamaño para cada una fue de: A) **M1-2** de 1.11-1.27 x 0.33-0.44 μ m, B) **M1-16** con un tamaño de 1.35 a 1.78 μ m x 0.5 a 0.71 μ m, C) **M1-18** 1.83 \pm 0.14 x 0.5 μ m, D) **M2-5** 0.87-1x 0.3-0.45 μ m, E) **M2-8** 0.83-0.91 x 0.30-0.33 μ m, F) **M2** 1.2-1.7 x 0.31-0.34 μ m y G) **M4-14** 1.25-1.38 x 0.41-0.47.

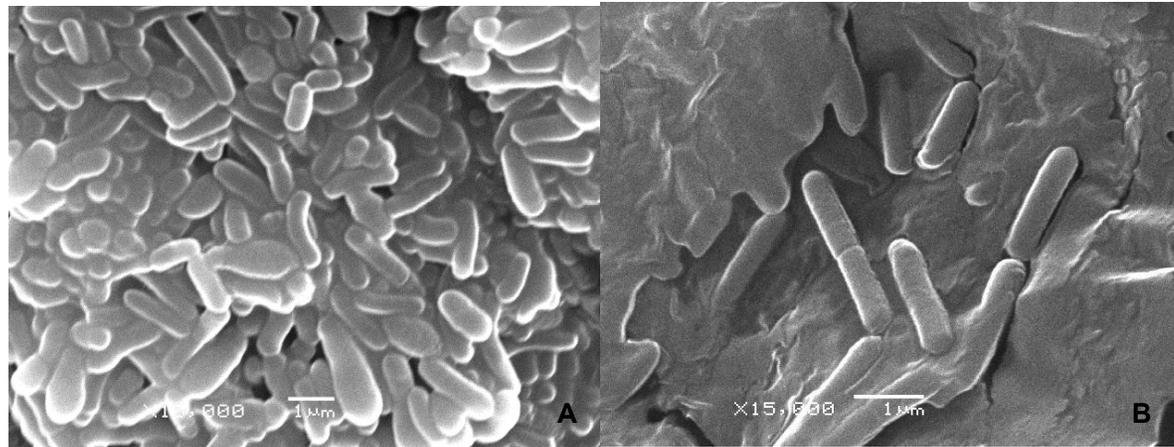


Figura 6. Micrografías en MEB. A) Cepa **M1-15**, correspondiente *V. halodenitrificans*. Las células tuvieron un tamaño entre 1.42 a $2.5\mu\text{m}$ x 0.28 a $0.78\mu\text{m}$. B) Cepa **M1-26**, relacionada con *V. marismortui*, el tamaño de las células es de 1.54 a $2.2\mu\text{m}$ x 0.5 a $0.54\mu\text{m}$.

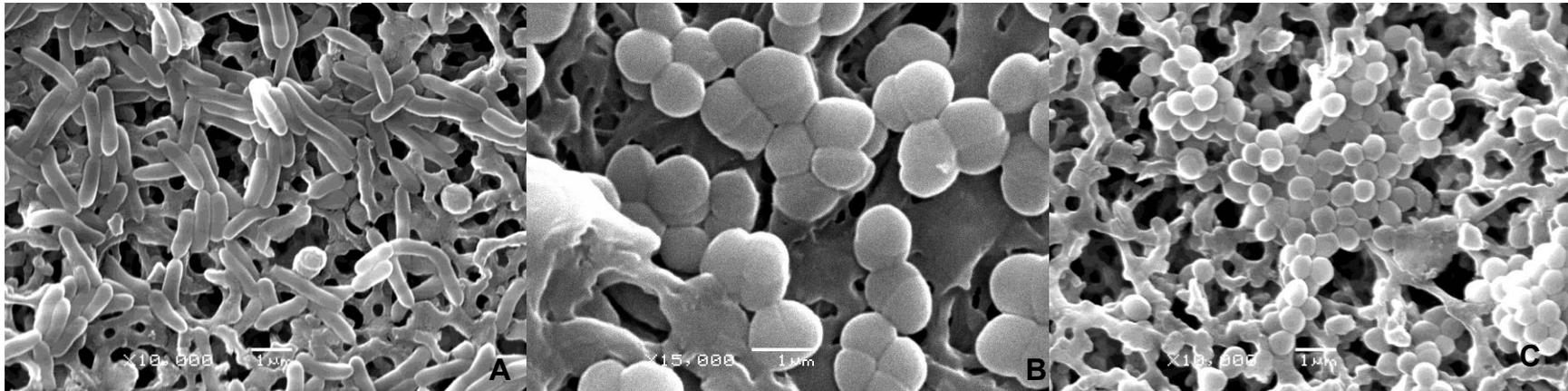


Figura 7. Fotomicrografías en MEB de las cepas A) **M3-7**, B) **M2-1** y C) **M3-1**, cuyos tamaños de células fueron 1.15 - 1.47 x 0.26 - 0.31 , 0.9 - 1.25 y 0.57 - $0.63\mu\text{m}$, respectivamente.

Análisis quimiotaconómico

Para el análisis quimiotaconómico las cepas, de cuatro días de crecimiento, fueron recuperadas de placas con agar nutritivo cuya fuente de energía fue peptona y extracto de carne, adicionado con 7.5% de NaCl que constituyó la fuente mineral. En general, todas las bacterias aisladas presentaron un perfil de ácidos grasos similar al de la especie más cercana, sin embargo, existieron variaciones en los porcentajes de abundancia, asimismo algunas cepas tuvieron ácidos grasos que no se habían reportado con anterioridad.

Halomonas

El ácido graso más abundante reportado para el género es C_{18:1}ω7c (ácido Cis-vaccénico), seguido por C_{16:0} (ácido Hexadecanoico) conformando, en conjunto, más del 50% del perfil de ácidos grasos de *Halomonas* (Mata et al., 2002). En el presente estudio, todas las cepas tuvieron ambos ácidos grasos (**Cuadro 4**) sin embargo, únicamente **M1-2**, **M2-8** y **M4-14** los presentaron en la abundancia señalada, las cepas restantes los presentan en abundancias distintas.

A pesar de que todas las cepas fueron cultivadas en las mismas condiciones, se observan diferencias notables en su perfil de ácidos grasos, siendo el más destacado el perfil de **M1-18**, que presentó C_{12:0}, C_{14:0} y C_{15:0} con 2.93%, 9.98% y 34.41%, respectivamente.

Cuadro 4. Composición de ácidos grasos en las especies de *Halomonas*. Las cepas fueron cultivadas en agar nutritivo suplementado con 7.5% de NaCl, el tiempo de incubación fue de tres días a 32°C.

Especie	% de ácidos grasos totales									
	C12:0	C12:0 3OH	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1 ω7c	C18:0	C18:1 ω7c	C19:1 ω9c	C19:1ω8c cíclico
<i>H. salifodinae</i>	-	-	-	-	24.2	15	1	56.4	-	3.4
M1-2	-	-	-	-	28.2	-	2.17	42.4	17.21	-
M1-16	-	-	-	-	52.27	-	-	26.8	20.95	-
M1-18	2.93	-	9.98	34.41	23.89	-	2.69	26.1	-	-
M2	-	-	-	-	34.31	12.43	10.93	27	15.27	-
<i>H. caseinilytica</i>	-	-	5.5	-	22.3	3.6	2.7	50.2	-	2.2
M2-5	-	-	3.91	-	42.9	-	14.03	37.2	1.9	-
M2-8	-	-	-	-	24.81	-	-	75.2	-	-
<i>H. aquamarina</i> *	-	8	4	-	16	11	>0.5	62	-	-
M4-14	-	-	26.2	-	19	-	-	54.8	-	-

*Datos tomados de Akagawa y Yamasato (1989).

Virgibacillus y Oceanobacillus

En el género *Virgibacillus* los ácidos grasos más abundantes son anteisoC_{15:0} y anteisoC_{17:0}, en el perfil lipídico de la cepa **M1-15** se obtuvieron ambos en porcentajes similares, sin embargo, a diferencia de la especie *V. halodenitrificans*, la cepa aislada presentó mayor proporción de ácido hexadecanoico (C_{16:0}) (**Cuadro 5**). En cuanto a la composición de ácidos grasos de la cepa **M1-26**, fue imposible obtener datos confiables por lo que se optó por omitirlos.

El perfil de ácido grasos de *O. picturae* y **M3-7** fue muy similar, pues presenta prácticamente los mismos ácidos grasos con abundancias similares; la única diferencia que existió fue en el tipo y proporción del lípido principal, *O. picturae* tiene a anteisoC_{15:0} como ácido graso más abundante (59.22%) por el contrario, en la cepa **M3-7** es isoC_{15:0} con 51.09%; la diferencia entre uno y otro es la posición del grupo metilo, en anteiso se encuentra en el antepenúltimo carbono mientras que, en iso está en el penúltimo carbono de la cadena.

Salinicoccus y Brachy bacterium

La principal característica en el perfil lipídico de *Salinicoccus roseus* es la presencia homogénea de ácidos grasos ramificados, es decir, aquellos que tienen un grupo metilo en el penúltimo o antepenúltimo carbono, siendo los tres predominantes en orden de abundancia: anteisoC_{15:0}, isoC_{15:0} y anteisoC_{17:0}; la cepa **M2-1** presentó estos ácidos grasos, pero con porcentajes distintos (**Cuadro 5**); otra diferencia es que la cepa aislada tuvo como ácido graso principal el ácido cis-vaccénico, uno de los más comunes para todas las bacterias (Christie, 2003), asimismo fue capaz de sintetizar ácidos grasos lineales tanto saturados como insaturados.

La presencia de ácidos grasos lineales y ramificados tanto con número par como impar en **M2-1** (**Cuadro 5**), arroja luz sobre la plasticidad de esta cepa para la síntesis lipídica.

En cuanto a **M3-1** sólo se pudieron detectar dos tipos de ácidos grasos: Anteiso C_{15:0} (58.52%) y C_{16:0} (41.47%). Para *B. conglomeratum* y *B. paraconglomeratum* Anteiso C_{15:0} es el ácido graso más abundante, lo que coincide con la cepa aislada, sin embargo C_{16:0} únicamente se presenta en *B. paraconglomeratum* (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Composición de ácidos grasos en los géneros *Brachy bacterium*, *Oceanobacillus*, *Salinicoccus* y *Virgibacillus*. ct, cantidades traza.

Especie	% ácidos grasos totales													
	Iso C14:0	C14:0	Iso C15:0	Anteiso C15:0	C15:0	C15:1	Iso C16:0	C16:0	C16:1 ω7c	Iso C17:0	Anteiso C17:0	C18:0	C18:1 ω7c	C18:2
<i>B. conglomeratum</i>	2.5	1.9	4.6	61.6	4.6	12.2	1.9	-	-	1.8	9	-	-	-
<i>B. paraconglomeratum</i>	0.9	2.1	2.8	57.1	5.8	4.1	6.9	6.4	-	0.9	5.1	4.6	3.1	-
M3-1	-	-	-	58.52	-	-	-	41.47	-	-	-	-	-	-
<i>O. picturae</i>	10.73	-	2.93	59.22	-	-	7.02	<1	4.24	-	11.91	-	-	-
M3-7	13.63	-	51.09	-	-	-	13.91	3.39	-	14.95	-	2.95	-	-
<i>S. roseus</i>	-	-	19.3	33.3	-	-	7.8	-	-	6.4	8.7	-	-	-
M2-1	3.15	-	8.15	12.29	-	-	1.88	10.20	1.78	2.03	3.17	8.9	43.1	5.24
<i>V. halodenitrificans</i> *	7.4	-	2.4	51.8	-	-	11.8	1.1	0.4	-	19.5	-	-	-
M1-15				40.36				39.83			19.79			

Datos tomados de: *Lee et al., 2006

DISCUSIÓN

Las salinas solares son uno de los principales ambientes salinos en el mundo (Oren, 2002), en ellas se encuentran prósperas comunidades bacterianas con creciente interés biotecnológico, evolutivo y ecológico. En México se cuentan con inmejorables condiciones geográficas y ambientales para estudiar, explotar y aprovechar a estos microorganismos, razón por la cual, en el presente estudio se hace una contribución al conocimiento de bacterias halófilas moderadas unificando el contexto sistemático a través de un enfoque polifásico.

La diversidad de microorganismos encontrados en la salinera de Manzanillo Colima (**Cuadro 2**) concuerda con las especies halladas en diferentes sitios salinos de México, por ejemplo, el antiguo Lago de Texcoco (Soto-Padilla et al., 2014), las lagunas de Cuatro Ciénegas (Castro et al. 2011), los suelos salinos de Coahuila (Delgado-García et al., 2013), así como la salinera “Guerrero Negro” en Baja California (Sabet et al., 2009) que si bien es cierto que no es un estudio polifásico, sí constituye el único trabajo de caracterización bacteriana para el Pacífico mexicano; en este punto es donde radica la importancia de la presente investigación, puesto que es la primera donde se caracteriza con un enfoque multidisciplinario a bacterias halófilas moderadas.

A continuación, se analizan las características más relevantes obtenidas en cada grupo.

Halomonas

Como anteriormente lo han reportado autores como Vreeland et al. (1992) y Ventosa et al. (1998) el género *Halomonas* es uno de las más abundantes y diversos de entre los microorganismo halófilos, siendo además ubicuo para los ambientes salinos. En el presente estudio se corrobora dicha característica, pues fue de este género del que se aisló el mayor número de especies (**Cuadro 2**).

En el análisis filogenético de *Halomonas* se observa que las cepas se separan en tres grupos (**Figura 2**) coincidiendo con lo que han reportado Arahall et al. (2002) y De la Haba et al. (2010) para el género. Basándose en secuencias de 16S y 23S ADNr y complementando el análisis con el análisis del contenido G+C mol% y algunos caracteres fenotípicos, estos autores concluyen que *Halomonas* se divide en el grupo *Sensu stricto* (Grupo 1) con 12 especies, Grupo 2 con 16 especies y, finalmente en otro grupo de siete especies que son indiferenciables, puesto que no se agrupan con un clado en específico. En este último grupo se encuentra *H.*

salifodinae, de cuya especie se caracterizaron cinco cepas, sin embargo contrario a lo que ha sido reportado, éstas cepas se mantuvieron en una posición fija en los árboles filogenéticos generados con las secuencias de 16S ADNr, *gyrB* y *rpoD*.

Otro aspecto importante que se observa en la **Figura 2a** es que las secuencias de 16S ADNr de las cepas aisladas forman un clado separado de la especie de referencia, lo que denota las diferencias intrínsecas de las especies de la Salinera (en **M4-14** esto no sucede pues fue la única cepa aislada de *H. aquamarina*). Esta separación de clados bacterianos pertenecientes a la misma especie fue notada por Staley y Gosnik (1999) y Staley (2006) en otros géneros, tanto parásitos como de vida libre, para las cuales acuñó el término “geovar”. Las cepas geovar son aquellas que están restringidas a un lugar geográfico en particular, es decir, a pesar de que *Halomonas* sea un género ubicuo para los ambientes salinos de origen marino, las características genéticas de las cepas europeas, son distintas a las presentadas por las cepas mexicanas. Para corroborar dicha información Staley y Gosnik (*op. cit.*) estipulan que el mismo agrupamiento debe ocurrir en la filogenia de genes codificadores de proteínas que, a diferencia del 16S ADNr, únicamente presentan una copia en el genoma, el radio de inserciones y deleciones es mínimo y además pueden ser fácilmente separados entre sitios sinónimos y no sinónimos (Santos & Ochman, 2004); la filogenia de *gyrB* y *rpoD*, observada en la **Figura 2b y 2c**, respectivamente, comprueba que esta diferenciación de clados se mantiene en los genes codificadores. Con el fin de que el análisis fuera más confiable, las secuencias de los tres loci fueron concatenadas (**Figura 2d**), obteniendo como resultado, la misma separación del género, es decir, la topología fue bastante similar a la de los árboles filogenéticos anteriores.

Aunado al hecho antes mencionado, se suman las particularidades de las cepas en los caracteres nutricionales, pues como se observa en la **Cuadro 2**, ninguna hidrolizó almidón, todas crecen hasta en 25% de NaCl y las cepas de *H. salifodinae* fueron incapaces de asimilar lactosa y L-Ser como única fuente de carbono y energía. Por todas estas características se propone que las especies de *Halomonas* aisladas de la Salinera en Manzanillo, Colima sean consideradas como especies geovar.

En cuanto a la composición de ácidos grasos, autores como Ventosa et al. (1998) han reportado la sensibilidad de esta composición a los cambios en la temperatura, el contenido de sales y el medio de cultivo utilizado; así, *H. salifodinae* y *H. caseinilytica* (Wang et al., 2008; Wu et al., 2008) fueron cultivadas en Medio HM, mientras que *H. aquamarina* (Akagawa & Yamasato, 1989) se mantuvo en caldo marino, en ambos medios la fuente de carbono y la composición de sales es distinta a la empleada en el presente estudio, lo cual puede explicar el

cambio en las proporciones de ácidos grasos (**Cuadro 4**). Con anterioridad, discrepancias como ésta han sido reportadas, por ejemplo Akagawa y Yamasato (1989) reportaron, para *H. aquamarina*, un perfil de ácidos grasos distinto al publicado por Franzman y Tindall (1990).

Aunque a nivel taxonómico las diferencias en el perfil de ácidos grasos parezcan muy marcadas, en el nivel fisiológico esto puede cambiar, tal es el caso de los ácidos C_{19:1}ω₉c y C_{19:1}ω₈c cíclico, el primero lo presentaron las cepas **M1-2**, **M1-16**, **M1-18** y **M2-5**, mientras que el segundo estuvo presente en *H. salifodinae* y *H. caseinilytica* (**Cuadro 4**); los ácidos grasos insaturados son los precursores de aquellos con anillo ciclopropano, estos últimos al retener al doble enlace en posición *cis* provoca que las características de ambos sean similares, dando como resultado una mejora en la viabilidad de las bacterias que habitan ambientes hostiles (Zhang & Rock, 2008).

Así como existieron diferencias respecto a la especie de referencia, también las hubo entre las cepas aisladas en este trabajo siendo la más destacable la composición de ácidos grasos de la cepa **M1-18** (**Cuadro 4**), si bien es cierto que las condiciones fueron homogéneas para todos los cultivos, estos resultados sugieren que las cepas difieren en los mecanismos que ajustan su composición lipídica y, por lo tanto, su homeostasis membranar lo cual es sumamente importante, puesto que de esto depende su supervivencia (Zhang & Rock, 2008).

Virgibacillus

En la secuencia de 16S ADN se encontró que de los 30 cambios, 21 de ellos están en la primer mitad siendo casi todos transiciones, por lo tanto fue esta primer parte la que aportó más sitios informativos para separar las cepas en dos especies: *V. halodenitrificans* y *V. marismortui* (**Figura 3a**), a pesar de la coherente separación entre especies, la resolución no fue la suficiente para distinguir entre cepas puesto que en el árbol filogenético se observa la topología de peine. Las características restantes se mantuvieron de acuerdo con lo establecido por Heyndrickx et al. (1998), Arahall et al. (1999) y Yoon et al. (2004).

Oceanobacillus

De las ocho especies en que se clasificaron las cepas aisladas en este trabajo, *Oceanobacillus picturae* merece una mención especial pues, de acuerdo con la búsqueda bibliográfica realizada, es la primera vez que se reporta esta especie en una Salinera, ya que originalmente se clasificó como *Virgibacillus picturae* siendo aislada en España a partir de una pintura mural deteriorada (Heyrman, 2003).

La filogenia de las cepas **M3-7** y **M3-3** basada en el gen 16S ADNr está soportada en un bootstrap de 63% (**Figura 3b**), en la secuencia nucleotídica la zona informativa, al igual que en *Virgibacillus*, fueron los primeros 600pb, en donde se encontraron cinco transiciones, dos transversiones y una deleción. Las características bioquímicas y quimiotaxonómicas de la cepa caracterizada fueron consistentes con las que se reportan para la especie (Lee et al., 2006), sin embargo, existió una discrepancia en cuanto a los ácidos grasos más abundantes, puesto que la cepa presenta a Iso_{15:0} e Iso_{17:0} como ácidos grasos principales, a nivel fisiológico, el cambio el grupo metilo genera una membrana con menor fluidez si se compara con lípidos anteiso (White et al., 2005).

Salinicoccus

La característica más destacable de la cepa **M2-1** es su perfil de ácidos grasos, puesto que tanto en el análisis genético como bioquímico mantuvo consistencia con los datos reportados para la especie tipo DSM5351^T (Ventosa et al., 1990).

A nivel de género, *Salinicoccus* tiene la propiedad de sintetizar toda una variedad de ácidos grasos: saturados, insaturados y ramificados iso y anteiso, de éstos, el patrón observado en las especies consultadas fue la presencia dominante de los ácidos grasos ramificados, con un porcentaje por encima del 50% (França et al., 2006; Chen et al. 2007; Pakdeeto et al. 2007; Amoozegar et al. 2008). Lo anterior discrepa con el perfil de lípidos de **M2-1**, pues en esta cepa dominó la presencia del ácido C_{18:1}ω7c con 43.1% (**Cuadro 5**), este escenario es poco común en cuanto al género, más no en cuanto a las bacterias como grupo, la razón de ello se desprende del mecanismo de síntesis lipídica.

Para generar ácidos grasos *de novo*, las bacterias llevan a cabo siete reacciones, cada una catalizada por una enzima diferente, una de las cuales utiliza al malonil-CoA como sustrato de la reacción de síntesis; la diferencia entre ácidos grasos ramificados y lineales estriba en el sistema utilizado, puesto que cada sintetasa tiene afinidad diferente por el compuesto de iniciación siendo, en el caso de ácidos lineales el acetil-CoA, mientras que para los ramificados son los derivados de α-cetoácidos ramificados y ácidos carboxílicos ramificados (Kaneda, 1991). *Bacillus subtilis* es el modelo de estudio empleado para entender el caso especial en el que, como en *S. roseus*, se sintetizan ácidos grasos de todo tipo, en este caso se ha reportado que *B. subtilis* posee dos isoenzimas de FabH, la enzima condensadora-iniciadora, que son: FabHA y FabHB, ambas isoenzimas son capaces de iniciar el ciclo de síntesis a partir de acetil-CoA, isobutiril-CoA, isovaleril-CoA así como α-metilbutiril-CoA (Fujita et al., 2007), es decir, el producto puede ser un ácido graso tanto lineal como ramificado; la siguiente fase es el

crecimiento de la cadena, donde FabA establece un equilibrio, a partir del décimo carbono, entre trans2- decenoil y cis3-decenoil, éste último es condensado e incorporado por FabF siendo el responsable de la formación de los dos ácidos grasos insaturados más comunes en bacterias: C_{16:1}ω7c y C_{18:1}ω7c (Zhang & Rock, 2008). Extrapolando este sistema al perfil lipídico de **M2-1**, se deduce que su sintetasa tuvo preferencia por el compuesto (o su precursor) más abundante en el medio de cultivo, posiblemente acetil-CoA, llevando a cabo el proceso antes mencionado y dando como resultado la gran proporción en C_{18:1}ω7c.

En este punto es importante mencionar la inconsistencia de resultados que se encontró durante la revisión bibliográfica; cada uno de los autores cuyo trabajo fue consultado (Amoozegar et al., 2008; Chen et al., 2007; Pakdeeto et al., 2007), reportaron un perfil de ácidos grasos distinto para la cepa DSM5351^T de *S. roseus*, por lo mismo se considera de vital importancia la estandarización en las condiciones de cultivo, establecida a nivel de género y de preferencia aceptada por el comité "Ad Hoc para la definición de especies en bacteriología", de esta forma los resultados de ácidos grasos pueden aportar mayor información y, al poder comparar los perfiles, ser de mayor utilidad en estudios futuros.

Brachybacterium

El resultado de la cepa **M3-1** es contradictorio, por un lado, en la reconstrucción filogenética de 16S ADNr es agrupado con *B. conglomeratum* (similitud de 97.5%, **Figura 3d**) con un valor de probabilidad posterior de 52%, lo cual indica que la precisión y exactitud en la topología del árbol para reflejar la filogenia verdadera es muy baja (Hillis & Bull, 1993); por otro lado, los caracteres fenotípicos tampoco fueron muy resolutivos, pues la mayoría de los analizados en este estudio no se habían reportado con anterioridad (**Cuadro 3**). En el perfil de ácido grasos la cepa **M3-1** presentó AnteisoC_{15:0} que es el más abundante para el género (Takeuchi et al., 1995), así como C_{16:0} el cual sólo se encuentra en *B. paraconglomeratum* sin embargo, la proporción en la cual lo presenta es totalmente distinta siendo, en la especie de 6.4%, mientras que en la cepa es de 41.47% (**Cuadro 4**).

El hecho de que la cepa **M3-1** obtuviera un perfil de ácidos grasos tan diferente a lo reportado para *B. conglomeratum* y *B. paraconglomeratum*, además de no haber características fenotípicas con las cuales comparar los resultados y haber obtenido una similitud en la secuencia de 16S ADNr apenas por encima de los requerido, sugiere que se trata de una nueva especie perteneciente al género *Brachybacterium*.

Finalmente, cabe mencionar la relevancia biotecnológica del poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), puesto que las cepas de *H. caseinilytica* (**M2-5** y **M2-8**), *H. aquamarina* (**M4-14**), *V. halodenitrificans* (**M1-15**) y *O. picturae* (**M3-7**) dieron positivos en la prueba de detección de dicho compuesto (**Figura 4**). El PHB es uno de los compuestos más comunes de los polihidroxi-alcanoatos (PHA) o plásticos bacterianos como también se conocen, estos compuestos son poliésteres que acumulan algunas bacterias en forma de gránulos internos amorfos cuando el medio en que se desarrollan tiene nutrientes limitados, pero es rico en fuente de carbono, es decir, las bacterias los utilizan como almacén de fuente de carbono y energía (Grage et al. 2009; Rehm 2010). Las características termoplásticas que poseen los PHA los colocan como una opción viable para reemplazar a los plásticos fabricados a base de petróleo (Rehm, 2010); por otro lado, se ha demostrado su utilidad en la purificación de proteínas y como cuentas micro y nanobiológicas, así como su biocompatibilidad con otros sistemas biológicos como los mamíferos por lo que tienen aplicaciones en el área médica, por ejemplo, para la administración de fármacos (Grage et al., 2009); asimismo se realizan estudios para que sean utilizados en biorremediación puesto que el conjunto de PHA's permite la acumulación de nutrientes y la sorción de xenobióticos (Flemming & Wingender, 2010).

Por los antecedentes anteriores, las cinco cepas aisladas de la salinera que son productoras de PHB podrían ser utilizadas en futuros estudios con el fin de indagar sus aplicaciones biotecnológicas.

CONCLUSIONES

- Este trabajo es el primer reporte de bacterias halófilas moderadas para el Pacífico central mexicano.
- De la salinera de Manzanillo, Colima fueron aisladas 27 cepas de bacterias halófilas moderadas que se agruparon en cinco géneros y ocho especies, de este total, se caracterizaron 12 cepas, con un enfoque polifásico.
- Las especies en que fueron clasificadas las cepas encontradas en la salinera de Manzanillo, Colima fueron: *H. salifodinae*, *H. caseinilytica*, *H. aquamarina*, *V. marismortui*, *V. halodenitrificans*, *S. roseus*, *Brachybacterium sp.* y *O. picturae*.
- Por primera vez, se reporta el aislamiento de *O. picturae* a partir de una fuente marina en el territorio mexicano.
- Los resultados de las pruebas realizadas en la cepa **M3-1** sugieren que representa a una nueva especie del género *Brachybacterium*.
- Debido a la alta sensibilidad de los ácidos grasos a las condiciones de cultivo, se propone la estandarización del método a nivel de género con el objetivo de que los resultados provean mayor información en estudios futuros.
- Debido a la producción de poli(3-hidroxi-butirato) en cinco de las cepas aisladas éstas podrían ser utilizadas, en estudios futuros, con fines biotecnológicos.

LITERATURA CITADA

- Akagawa, M., & Yamasato, K. (1989). Synonymy of *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *homari*, and *Deleya aesta*: *Deleya aquamarina* comb. nov. as the Type Species of the Genus *Deleya*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 462–466.
- Amjres, H., Béjar, V., Quesada, E., Abrini, J., & Llamas, I. (2010). Aplicaciones del exopolisacárido producido por la cepa HK30 de *Halomonas nitroreducens* en la industria farmacéutica. *ARS Pharmaceutica*, 3, 255–266.
- Amoozegar, M. A., Schumann, P., Hajighasemi, M., Ashengroph, M., & Razavi, M. R. (2008). *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 178–183. doi:10.1099/ijs.0.65221-0
- Arahal, D., Márquez, M., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., & Ventosa, A. (1999). *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 521–530.
- Arahal, D. R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Ventosa, A. (2002). Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 1), 241–249.
- Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., Bejar, V., Quesada, E., & Ventosa, A. (2007). Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 10), 2436–46. doi:10.1099/ijs.0.65430-0
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555. doi:10.1016/j.mimet.2003.08.009
- Castro, P. L., G. A. C. Flores, V. A. Rodríguez, G. M. A. Aguilar, G. C. N. A. y H. R. R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de Cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5), 33–43.
- Cerritos, R., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Herrera-Estrella, L., Alcaraz-Peraza, L. D., Arvizu-Gómez, J. L., Olmedo, G., Ramirez, E., Siefert, J. L., Souza, V. (2008). *Bacillus*

- coahuilensis sp. nov., a moderately halophilic species from a desiccation lagoon in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 4), 919–23. doi:10.1099/ijs.0.64959-0
- Chen, Y., Cui, X., Rüdiger, P., Li, H., Yang, Y.-L., Xu, L.-H., Weng, M.-L., Peng, Q., Jiang, C.-L. (2007). *Salinicoccus kunmingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt mine in Yunnan, south-west China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2327–2332. doi:10.1099/ijs.0.64783-0
 - Choudhuri, S. (2014). *Bioinformatics for Beginners* (1st ed.). Elsevier Inc.
 - Christie, W. W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. Pergamon Press.
 - Colwell RR (1970) Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species *J Bacteriol* 104: 410–433
 - De la Haba, R. R., Arahál, D. R., Márquez, M. C., & Ventosa, A. (2010). Phylogenetic relationships within the family Halomonadaceae based on comparative 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 4), 737–48. doi:10.1099/ijs.0.013979-0
 - De la Haba, R. R., Márquez, M. C., Papke, R. T., & Ventosa, A. (2012). Multilocus sequence analysis of the family Halomonadaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 3), 520–38. doi:10.1099/ijs.0.032938-0
 - Delgado-García, M., De la Garza-Rodríguez, I., Cruz H, M. A., Blagurusamy, N., Aguilar, C., & Rodríguez-Herrera, R. (2013). Characterization and selection of Halophilic microorganisms isolated from Mexican soils. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 8(6), 457–464.
 - Dennis, P. P., & Shimmin, L. C. (1997). Evolutionary Divergence and Salinity-Mediated Selection in Halophilic Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(1), 90–104.
 - Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623–33. doi:10.1038/nrmicro2415

- França, L., Rainey, F. A., Nobre, M. F., & Costa, M. S. D. (2006). *Salinicoccus salsiraiae* sp. nov.: A new moderately halophilic gram-positive bacterium isolated from salted skate. *Extremophiles*, 10(6), 531–536. doi:10.1007/s00792-006-0532-1
- Franzmann, P. D., & Tindall, B. J. (1990). A Chemotaxonomic Study of Members of the Family Halomonadaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(2), 142–147. doi:10.1016/S0723-2020(11)80161-X
- Fujita, Y., Matsuoka, H., & Hirooka, K. (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 66(4), 829–39. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x
- García, M. T., Mellado, E., Ostos, J. C., & Ventosa, A. (2004). *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1723–8. doi:10.1099/ijs.0.63114-0
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660–9. doi:10.1021/bm801394s
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., Vos, P. De, Forsyth, G., & Logan, N. A. (1998). *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1, 99–106.
- Heyrman, J. (2003). *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 501–511. doi:10.1099/ijs.0.02371-0
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*. doi:10.1093/sysbio/42.2.182
- Kaneda, T. (1991). Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. *Microbiological Reviews*, 55(2), 288–302.

- Kushner, D. J. & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In *Halophilic Bacteria*, vol. I, pp. 109–138. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lee, J.-S., Lim, J.-M., Lee, K. C., Lee, J.-C., Park, Y.-H., & Kim, C.-J. (2006). *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 1), 251–7. doi:10.1099/ijs.0.63734-0
- Litchfield, C. D. (1998). Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & Planetary Science*, 33(4), 813–9.
- Mata, J. A. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger*. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*. Universidad de Granada.
- Mata, J. A., Martínez-Cánovas, J., Quesada, E., & Béjar, V. (2002). A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(3), 360–75. doi:10.1078/0723-2020-00122
- Meseguer, S. I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, 8(2), 13-17.
- Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 1–7.
- Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 238–241.
- Pakdeeto, A., Tanasupawat, S., Thawai, C., Moonmangmee, S., Kudo, T., & Itoh, T. (2007). *Salinicoccus siamensis* sp. nov., isolated from fermented shrimp paste in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 9), 2004–8. doi:10.1099/ijs.0.64876-0
- Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S. K., Khanna, M., Lal, R. (2007). Polyphasic approach of bacterial classification

- An overview of recent advances. *Indian Journal of Microbiology*, 47(2), 98–108. doi:10.1007/s12088-007-0022-x
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(8), 578–92. doi:10.1038/nrmicro2354
 - Rossello-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 39–67.
 - Sabet, S., Diallo, L., Hays, L., Jung, W., & Dillon, J. G. (2009). Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, 13(4), 643–56. doi:10.1007/s00792-009-0247-1
 - Santos, S. R., & Ochman, H. (2004). Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environmental Microbiology*, 6(7), 754–759. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00617.x
 - Soto-Padilla, M. Y., Valenzuela-Encinas, C., Dendooven, L., Marsch, R., Gortáres-Moroyoqui, P., & Estrada-Alvarado, M. I. (2014). Isolation and phylogenetic identification of soil haloalkaliphilic strains in the former Texcoco Lake. *International Journal of Environmental Health Research*, 24(1), 82–90. doi:10.1080/09603123.2013.800957
 - Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Loret, L., Rodríguez-Martínez, J. M., Soberón, X., Dirzo, R., Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6565–70. doi:10.1073/pnas.0601434103
 - Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, A. D., Ka, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Roselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, (March), 1043–1047. doi:10.1099/ijs.0.02360-0.02360
 - Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846–849. doi:10.1099/00207713-44-4-846

- Staley, J. T., & Gosink, J. J. (1999). Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 53, 189–215.
doi:10.1146/annurev.micro.53.1.189
- Staley, J. T. (2006). The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1475), 1899–1909. doi:10.1098/rstb.2006.1914
- Takeuchi, M., Fang, C.-X., & Yokota, A. (1995). Taxonomic study of the genus. *Bangladesh J. Plant Taxon.*, 15(1), 47–61.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407–438.
- Ventosa, A., Márquez, M. C., Ruiz-Berraquero, F., & Kocur, M. (1990). *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a New Moderately Halophilic Gram-Positive Coccus. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(1), 29–33. doi:10.1016/S0723-2020(11)80177-3.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(2), 504–44.
- Vreeland, R. H., & Hochstein, L. I. (1992). *The Biology of Halophilic Bacteria* (Vol. 30). CRC Press.
- Wang, Y., Wu, Y. H., Wang, C. S., Xu, X. W., Oren, A., Zhu, X. F., & Wu, M. (2008). *Halomonas salifodinae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt mine in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(12), 2855–2858. doi:10.1099/ijs.0.2008/000729-0
- White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., & Rock. (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 791–831. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524
- Wu, Y.-H., Xu, X.-W., Huo, Y.-Y., Zhou, P., Zhu, X.-F., Zhang, H.-B., & Wu, M. (2008). *Halomonas caseinilytica* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a saline lake on the Qinghai-Tibet Plateau, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 5), 1259–62. doi:10.1099/ijs.0.65381-0
- Yang, C., Wang, Z., Li, Y., Niu, Y., Du, M., He, X., Ma, C., Tang, H., Xu, P. (2010). Metabolic versatility of halotolerant and alkaliphilic strains of *Halomonas* isolated from

alkaline black liquor. *Bioresource Technology*, 101(17), 6778–84.
doi:10.1016/j.biortech.2010.03.108

- Yoon, J.-H., Oh, T.-K., & Park, Y.-H. (2004). Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariáz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 6), 2163–7. doi:10.1099/ijs.0.63196-0
- Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1893–1900. doi:10.1099/ijs.0.02713-0
- Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 222–233. doi:10.1038/nrmicro1839

