



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**“Detección y análisis del Gen *ectD* de *Halomonas* spp., del Valle de
Zapotitlán Salinas, Puebla”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS ALBERTO LEÓN LEMUS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. ROFOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CD. MX., OCTUBRE 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**“Detección y análisis del Gen *ectD* de *Halomonas* spp., del Valle de
Zapotitlán Salinas, Puebla”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS ALBERTO LEÓN LEMUS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. NATHALIE ROBERTE CHANTAL CABIROL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. ROFOLFO DE LA TORRE ALMARAZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE 2018

OFICIO CPCB/535/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

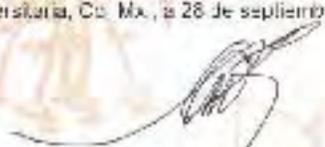
Lic. Ivonne Ramirez Wance
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informarle usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de julio de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **LEON LEMUS LUIS ALBERTO** con número de cuenta 305116295 con la tesis titulada "Detección y análisis del gen *ccfD* en *Halomonas* spp. del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA MARTINEZ GARCIA**:

Presidente:	DR. JOSÉ EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Vocal:	M en C. ALEJANDRO CRUZ MONSALVO REYES
Secretario:	DR. ROBERTO DE LA TORRE ALMARAZ
Suplente:	DRA. ROSALVA RANGEL CORONA
Suplente:	DR. FRANCISCO JOSÉ TORNER MORALES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Méx., a 28 de septiembre de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c. Excedente de (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme las bases necesarias para mi formación académica y brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de posgrado, además, de su excelencia académica y administrativa que demostraron diligentemente todos quienes lo conforman.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

En especial agradecimiento a mi tutora principal y directora de tesis, Dra. Martha Martínez García por sus enseñanzas, confianza y amistad, por creer en mí y por todo el esfuerzo y tiempo invertido en este proyecto, le estoy muy agradecido.

Para los miembros de mi comité tutor: Dra. Nathalie Roberte Chantal Cabirol y el Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, por la dedicación, las atenciones y el tiempo invertido a este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Posgrado en Ciencias Biológicas y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, institución de renombre mundial, columna vertebral de la profesionalización de las artes y las ciencias del país, además, máxima casa de estudios del pueblo mexicano y la universidad de la nación, siempre orgulloso de pertenecer a esta magna institución.

Para los miembros del jurado revisor para la presentación del examen de grado: Dra. Rosalva Rangel Corona, Dr. Jorge Eduardo Campos, M. en C. Alejandro Monsalvo Reyes, Dr. Francisco Torner y Dr. Rodolfo de la Torre por su participación, observaciones, consejos y aportaciones al proyecto.

Para los profesores: M. en C. Alejandro Monsalvo Reyes, Dr. Jorge Eduardo Campos y Dra. Elvia Gallegos Neyra por su valiosa colaboración y ayuda en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda y al Biól. Raul Bonilla Moreno del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Zacatenco, por su ayuda y asesoramiento en el proyecto.

Para todos los profesores del Posgrado en Ciencias Biológicas que me impartieron cátedra, gracias por su vocación y el tiempo que dedican a la formación de nuevos investigadores.

Al Laboratorio de Bioquímica Molecular, de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FESI.

A Juan Diego Hernández Cortés, por el asesoramiento y la ayuda recibida, además, por ser un trabajador orgulloso y promotor de la milenaria tradición de la producción y extracción de la sal en las salineras de Zapotitlan Salinas, Puebla.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar hasta aquí, todas las oportunidades que me ha dado, las personas que ha puesto en mi camino y el privilegio inefable de intentar comprender la infinita complejidad de la “vida”.

A mi hijo Caleb, para que sepa que desde el momento que supe que existía lo amé, que cuando pueda leer esto este orgulloso de este logro y que sea siempre un ejemplo para él.

A mi esposa Alejandra Rangel, por su apoyo, amor y comprensión que me brindó siempre que me fueron necesarios a lo largo de esta etapa como estudiantess de posgrado que compartí con ella, muchas gracias te amo.

A mis Padres, por todo el apoyo cariño y amor incondicional que me han brindado en el transcurso de mi vida, sin ellos jamás hubiera llegado hasta aquí y nada de esto ni de todo lo que he hecho hubiese sido posible, su sacrificio no se va sin ser reconocido, les estoy infinitamente agradecido.

A mi Hermana por su cariño, apoyo y confianza, además de su comprensión y amor por las ciencias biológicas uno de tantos gustos que ambos compartimos, gracias.

A mis Abuelos, por su consejo, cariño y comprensión a lo largo de mi vida y por estar siempre que los he necesitado.

A toda mi familia por todo el apoyo y todos los momentos que hemos compartido, que este sea un logro más para todos, ya que todos han sido parte esencial de mi vida y este triunfo también les pertenece a ellos.

“Jamás he negado la existencia de Dios. Pienso que la teoría de la evolución es totalmente compatible con la fe en Dios. El argumento máximo de la existencia de Dios, me parece la imposibilidad de demostrar y comprender que el universo inmenso, sublime sobre toda medida, y el hombre, hayan sido frutos del azar”.

Charles Darwin (1809-1882)

1. RESUMEN.....	1
1.1 Abstract.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Organismos halotolerantes y halófilos.....	3
2.2 Características del género <i>Halomonas</i>	3
2.3 Marcadores filogenéticos en bacterias.....	5
2.3.1 Gen rRNA 16S.....	5
2.3.2 Gen <i>cnp60</i>	5
2.4 Mecanismos osmoregulatorios y solutos compatibles.....	6
2.5 Ectoínas.....	7
2.6 Síntesis de ectoína e hidroxietoína.....	8
2.7 Descripción de los genes involucrados en la síntesis de ectoína.....	9
2.8 Organización de genes para degradación de ectoína	10
2.9 Mecanismos catabólicos y transportadores	11
2.10 Mecanismos para la degradación ectoína	12
2.11 Organización de genes para degradación de ectoína.....	13
2.12 Mecanismos de acción de ectoínas.....	14
2.13 Aplicaciones biotecnológicas de ectoínas.....	15
3. ANTECEDENTES.....	17
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. OBJETIVOS.....	19

6. MATERIALES Y MÉTODO	20
6.1 Área de estudio.....	20
6.2 Sitios de muestreo.....	20
6.3 Parámetros fisicoquímicos.....	23
6.3.1 Temperatura del agua (°C).....	23
6.3.2 Temperatura atmosférica (°C).....	24
6.3.3 pH.....	24
6.3.4 Conductividad (mS/cm).....	24
6.4 Análisis microbiológicos.....	24
6.4.1 Aislamiento de cepas.....	24
6.4.2 Morfología colonial y celular.....	25
6.5 Prueba fisiológica crecimiento.....	25
6.6 Análisis Bioquímicos.....	25
6.7 Análisis moleculares.....	25
6.7.1 Extracción de DNA.....	25
6.7.2 Diseño de primers.....	26
6.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR-punto final).....	26
6.8 Secuenciación.....	27
6.9 Análisis bioinformático.....	27
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Análisis microbiológico.....	29

7.1.1 Cultivos bacterianos.....	29
7.1.2 Morfología colonial y celular.....	29
7.2 Prueba fisiológica de crecimiento.....	30
7.3 Análisis Bioquímicos.....	30
7.4 Parámetros fisicoquímicos.....	32
7.4.1 Temperatura atmosférica.....	32
7.4.2 Temperatura del agua	32
7.4.3 pH.....	33
7.4.4 Conductividad (ms/cm).....	33
7.5 Análisis moleculares y bioinformáticos.....	33
7.5.1 Identificación del gen rRNA 16S.....	33
7.5.2 Detección del gen <i>cnp60</i>	34
7.5.3 Análisis y detección del gen <i>ectD</i>	35
7.5.4 Diseño de primers para <i>ectD</i>	35
7.5.5 Detección del gen <i>ectD</i>	36
7.5.6 Alineación de secuencias de <i>ectD</i>	38
7.5.7 Identificación del dominio conservado.....	39
7.5.8 Análisis y detección de <i>eutD</i>	39
7.5.9 Diseño de primers para <i>eutD</i>	39
7.5.10 Detección de <i>eutD</i>	40
7.5.11 Alineación de secuencias de <i>eutD</i>	41

7.5.12 Identificación del dominio conservados de <i>eutD</i>	42
8. DISCUSIÓN.....	43
8.1 Análisis fisicoquímicos, bioquímicos, morfológicos y fisiológicos.....	43
8.2 Análisis moleculares y bioinformáticos.....	44
8.2.1 Gen <i>cnp60</i>	44
8.2.2 Gen <i>ectD</i>	45
8.2.3 Gen <i>eutD</i>	49
9. CONCLUSIONES.....	51
10. LITERATURA CITADA.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Metabolismo de la ectoína e hidroxiectoína.....	9
Figura 2. Mecanismo de estabilización de solutos compatibles.....	15
Figura 3. Fotografía de la salinera “Las Chiquitas” el sitio de estudio dentro del área del Valle de Zapotitlán Salinas, parte de la reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán en el Estado de Puebla.....	22
Figura 4. Mapa de la ubicación geográfica de la reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, donde se muestra la localización del Valle de Zapotitlan Salinas en el Estado de Puebla.....	22
Figura 5. Imagen satelital (18°20'48.8"N 97°26'59.1"W) se muestra la salinera “Las Chiquitas”	23
Figura 6. Ensayo PCR punto final para el gen rRNA 16S realizado para la identificación molecular de <i>Halomonas</i> spp.....	34
Figura 7. Comparación de las secuencias obtenidas del gen rRNA 16S con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.....	34
Figura 8. Ensayo de PCR punto final para la identificación del gen <i>cnp60</i> de <i>Halomonas</i> spp.....	35
Figura 9. Comparación de las secuencias obtenidas del gen <i>cnp60</i> con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.....	35
Figura 10. Diseño de primers para el gen <i>ectD</i> de <i>Halomonas</i> spp., basados en el genoma completo de <i>Halomonas</i> sp. TD01 en la base de datos del NCBI.....	36
Figura 11. Electroforesis del ensayo de PCR punto final mostrando las amplificaciones de la primera y segunda sección del gen <i>ectD</i> realizada con los primer Nov1 y Nov2.....	37
Figura 12. Electroforesis del ensayo de PCR punto final mostrando las amplificaciones de la tercera sección del gen <i>ectD</i> realizada con los primer Nov 3.....	37
Figura 13. Comparación de las secuencias obtenidas del gen <i>ectD</i> con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.....	38
Figura 14. Alineamiento de secuencias obtenidas del gen <i>ectD</i> de la muestra No.1 de <i>Halomonas</i> spp., comparadas con el gen <i>ectD</i> de <i>Halomonas</i> sp. TD01.....	38

Figura 15. Traducción nucleótido aminoácido de la primera sección (Nov1) del gen *ectD* de *Halomonas* spp., señalando los aminoácidos que conforman el dominio conservado del gen en la ectoína hidroxilasa en *Halomonas* spp.....39

Figura 16. Diseño de primers del gen *eutD* para *Halomonas* spp., basados en el genoma completo de *Halomonas* sp. TD01 de la base de datos del NCBI.....40

Figura 17. Comparación de las secuencias obtenidas del gen *eutD* con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.....41

Figura 18. Alineamiento de la secuencia consenso del gen *eutD* de *Halomonas* spp., (muestra 1) con la secuencia de referencia de *Halomonas* sp. TD01.....41

Figura 19. . Secuencia de aminoácidos donde se muestra el dominio conservado para gen *eutD*...42

Figura 20. Localización del dominio conservado de *Halomonas* sp. TD01 dentro de una molécula de ectoína hidroxilasa reportado en la base de datos de la NCBI.....48

Índice de cuadros

Cuadro 1. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación por PCR punto final.....25

Cuadro 2 Temperaturas y ciclos utilizados en los diferentes ensayos de PCR.....26

Cuadro 3. Prueba fisiológica de crecimiento de *Halomonas* spp., en diferentes concentraciones de NaCl donde se muestra el crecimiento positivo (+) o negativo (-) en los diferentes gradientes.....29

Cuadro 4. Resultados de los análisis bioquímicos para las 8 cepas confirmadas de *Halomonas* spp.....30

Cuadro 5. Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo.....32

Cuadro 6. Comparación de los sitios de localización del dominio (DXaaHX₁₀₀aaH) dentro del gen *ectD* de ectoína hidroxilasa entre organismos previamente reportados (*V. salexigenes* y *Halomonas* sp. TD01) con *Halomonas* spp., de este estudio.....48

1. RESUMEN

Los microorganismos halófilicos aislados de ambientes salinos que se caracterizan por tener una alta resistencia osmótica y bajo potencial hídrico ofrecen una multitud de aplicaciones biotecnológicas potenciales, al hacer frente a estas condiciones a través de pequeñas acumulaciones de solutos compatibles; como las ectoínas, que son capaces de proteger enzimas, proteínas, membranas y células del estrés ambiental. Las ectoínas son enzimas codificadas por un grupo de genes conservados evolutivamente, *ectABCD*. Identificar las bacterias que poseen el gen *ectD* que sintetiza la enzima ectoína hidroxilasa para la producción de hidroxyectoína adquiere gran relevancia, porque no todos los organismos que sintetizan ectoína tienen el gen *ectD*. Se ha informado que muchas bacterias del género *Halomonas* poseen estos mecanismos y, por lo tanto, tienen un potencial importante en aplicaciones biotecnológicas. El objetivo del presente estudio fue detectar y analizar el gen *ectD* en *Halomonas* spp., del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Se aislaron ocho cepas bacterianas, realizando una caracterización, bioquímica, morfológica y fisiológica, confirmada posteriormente por análisis de PCR para los genes 16S rRNA y *cnp60* como pertenecientes al género *Halomonas*. Una vez confirmados, se analizaron mediante PCR con primers específicos para el gen *ectD*. El gen *ectD* se detectó en las ocho cepas confirmadas de *Halomonas*. Los dominios conservados, DXaaHX100aaH, se detectaron en la secuencia de aminoácidos que codifica *ectD*. Además, se analizó y detectó el gen *eutD* para la degradación de ectoína y se determinó su dominio conservado HEXaaXaaH. Esto demostró que nuestras cepas tienen la capacidad de producir y degradar el soluto compatible ectoína y que muestran un potencial biotecnológico considerable para estudios futuros.

1.1 Abstract

Halophilic microorganisms isolated from saline environments that are characterized by high osmotic strength and low water potential offer a multitude of potential biotechnological applications, cope with these conditions through small accumulations of compatible solutes; such as ectoins, which are capable of protecting enzymes, proteins, membranes and cells from environmental stress. Enzymes that biosynthesize ectoin are encoded by an evolutionarily conserved gene cluster, *ectABCD*. Identifying bacteria possessing *ectD* coding for hydroxyectoin acquires great relevance, since not all of the ectoin synthesizing organisms can produce it. It has been reported that many bacteria of the genus *Halomonas* possess these mechanisms and therefore have an important potential in biotechnological applications. The objective of the present study was to detect and analyse the *ectD* gene in *Halomonas* spp., Of the Valley of Zapotitlán Salinas, Puebla. Eight strains of bacterians were isolated, performing a, biochemical, morphological and physiological characterization, the Straits identity was later confirmed by PCR analysis for the 16S rRNA and *cnp60* chaperonin genes as belonging to the *Halomonas* genus. Once confirmed, they were analyzed by PCR with primers specific for *ectD*. The *ectD* gene was detected in the eight confirmed strains of *Halomonas*. The conserved domains, DXaaHX100aaH, were detected in the translated amino acid sequence encoding *ectD*. In addition, the gene for degradation of ectoine *eutD* was analyzed and detected and its conserved domain HEXaaXaaH was determined. This demonstrated that our strains have the potential to produce and degradate solute compatible ectoin and that they show a considerable biotechnological potential for future studies.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Organismos halotolerantes y halófilos

Los microorganismos halotolerantes o halófilos, capaces de vivir en ambientes salinos, ofrecen una multitud de potenciales aplicaciones en diversos campos (Margesin y Schinner, 2001). Estos microorganismos son generalmente aislados de ambientes salinos que se caracterizan por tener alta fuerza osmótica y poco potencial hídrico. La mayoría de las eubacterias halófilas/halotolerantes hacen frente a estas condiciones mediante pequeñas acumulaciones de compuestos orgánicos altamente solubles en agua, los denominados solutos compatibles (Brandon et al., 2006).

Los cuerpos de agua con soluciones de sales concentradas como: lagos salinos, lagunas costeras y salineras hechas por el hombre pueden considerarse ambientes extremos, habitados por sólo unas pocas formas de vida, pero generalmente mantienen densas poblaciones microbianas que comprenden especies de los tres dominios de la vida (Oren et al., 2008).

Los depósitos de sal globales muestran que la evaporación de agua salada marina y el desarrollo de hábitats hipersalinos ha sido un proceso continuo durante millones de años, proporcionando tiempo suficiente para la evolución de las bacterias y archeas halófilas que pueden sobrevivir y proliferar en altas concentraciones de sal.

Las bacterias moderadamente halófilas son microorganismos extremófilos que crecen óptimamente en medios que contienen 3-15% de NaCl (Kushner y Kamekura, 1988), aunque la mayoría de ellos pueden crecer en un rango muy amplio de salinidades. Constituyen un grupo filogenéticamente muy heterogéneo que incluye una gran variedad de bacterias (Ventosa et al., 1998).

2.2 Características del género *Halomonas*

El género *Halomonas* incluye bacilos Gram-negativos que pueden ser móviles o no móviles, positivas a la catalasa y aeróbicas, aunque algunas cepas pueden crecer anaerobicamente en presencia de nitrato (Vreeland et al., 1980; Dobson y Franzmann, 1996). Contienen ubiquinona-9 como la quinona respiratoria mayor (Franzmann y Tindall, 1990). Este género fue propuesto por Vreeland et al., (1980) con una sola especie, *Halomonas elongata*, que incluía algunas bacterias

moderadamente halófilas aisladas de una salina situada en las Antillas Holandesas. Más tarde, Baumann et al., (1983) propuso el género *Deleya* para acomodar algunas especies marinas del género *Alcaligenes* y *Pseudomonas marina*. Las especies de los dos géneros *Halomonas* y *Deleya* se incluyeron en la familia Halomonadaceae (Franzmann et al., 1988). Otros géneros relacionados que se propusieron incluir como bacilos gramnegativos ligeramente o moderadamente halofílicos son: *Halovibrio* (Fendrich, 1988), *Chromohalobacter* (Ventosa et al., 1989) y *Volcaniella* (Quesada et al., 1990). Dos estudios basados en las comparaciones de secuencias de rRNA 16S, llevaron a la conclusión de que las especies de los géneros *Volcaniella*, *Deleya* y *Halovibrio*, así como las especies *Paracoccus halodenitrificans*, deberían considerarse miembros del género *Halomonas* (Mellado et al., 1995; Dobson y Franzmann, 1996). Las especies del género *Halomonas* han sido aisladas de diferentes ambientes terrestres y acuáticos, principalmente con altas concentraciones de sal y pH alcalino. La especie tipo es *Halomonas elongata*, que se ha utilizado ampliamente durante las últimas décadas como un organismo modelo para estudios fisiológicos y osmorreguladores.

El género *Halomonas* es uno de los grupos de bacterias más representativos dentro de los organismos halófilos moderados. Se encuentra incluido en el *phylum* Proteobacteria, clase Gamma-Proteobacteria, orden Oceanospirillales, familia Halomonadaceae (Vreeland et al., 1980).

En la actualidad el género *Halomonas* contiene más de 70 especies, 12 de ellas han sido descritas desde los 80`s (Quesada et al. 1990). Debido a éste alto número de especies la heterogeneidad fenotípica entre ellas también es elevada (Mata et. al., 2002), en cuanto al contenido GC (Guanina-Citosina) tiene un rango de 52-68 % (Arahal et. al., 2002), otros autores han reportado rangos similares en *Halomonas venusta* y *Halomonas hydrothermalis* de 56.0% y 41.2%, respectivamente (Romano et al., 2006) y en *Halomonas elongata* (Schwibbert et al., 2011), reporta un alto contenido 63,6% de GC.

El contenido de GC (% en moles) en el género *Halomonas* presenta un rango amplio, teniendo en cuenta que lo generalmente aceptado en el contenido de GC entre miembros de un mismo género no debe diferir más de un 10% (Owen y Pitcher, 1985). De manera generalizada, se puede decir que se trata en su mayoría de bacterias halófilas moderadas que presentan un requerimiento de NaCl para su óptimo crecimiento que oscila entre un 3-15% (p/v).

2.3 Marcadores filogenéticos en bacterias

2.3.1 Gen rRNA 16S

Las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y la composición de las especies de las comunidades microbianas. En particular, la variación de secuencia en rRNA se ha explotado para inferir relaciones filogenéticas entre microorganismos y para diseñar sondas de nucleótidos específicas para la detección de taxones microbianos individuales en hábitats naturales (Amann et al., 1990). Constituyen la clonación del DNA de la copia ribosomal o mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del RNA ribosómico (rRNA) seguido del análisis de la secuencia de los clones resultantes (Ward et al., 1990). El rRNA 16S es el componente estructural central de la subunidad ribosómica 30S de bacterias y archeas y se requiere para el inicio de la síntesis de proteínas y la estabilización del emparejamiento correcto de codón-anticodón en el sitio A del ribosoma durante la traducción del RNAm (Woese y Fox, 1977). Debido a la constancia funcional y la naturaleza altamente conservada del gen 16S rRNA, ha sido un importante marcador filogenético, y se utilizó para definir los tres dominios de la vida (Woese et al., 1990).

2.3.2 Gen *cpn60*

Las chaperonas moleculares son un grupo ubicuo y abundante de proteínas que han sido implicadas en el plegamiento y el transporte postraduccional de proteínas recién sintetizadas dentro de la célula (Ellis y van der Vies, 1991). Las chaperoninas, un subconjunto de chaperonas moleculares que se encuentran en bacterias, cloroplastos y mitocondrias, incluyen dos familias de proteínas, *cpn60* y *cpn10*. Los miembros de cada familia están relacionados entre sí a través de una extensa homología de secuencia de aminoácidos y comparten en común una serie de características estructurales y funcionales. La evidencia que apunta a la participación de *cpn60* en la maduración postraduccional de una variedad de proteínas ha sido recopilada a partir de experimentos *in vivo* (Cheng et al., 1989; Laminet et al., 1990).

El gen chaperonin-60 (*cpn60*, o *groEL* en *E. coli*) es un gen de aproximadamente 1650 pares de bases (pb) cuyo producto funciona para acompañar el plegamiento de proteínas en procariontas y eucariotas (Hemmingsen et al., 1988). Este es el chaperón GroEL (también conocido como chaperonina), es un complejo de 14 subunidades idénticas en dos anillos que ayudan a plegar las

proteínas encapsulándolas temporalmente en las cavidades centrales de los anillos. Esto les permite a las proteínas tener un plegamiento correcto en un entorno en el que están protegidas contra la agregación y que favorece el estado plegado. Alrededor del 20% de los genomas bacterianos secuenciados contienen más de un gen *groEL* (Gould, et al., 2007). Se ha demostrado que varias de estas proteínas exhiben un grado relativamente alto de conservación evolutiva en sus secuencias de ADN y aminoácidos, así como en su compartimentalización subcelular. Esta conservación de la estructura y localización dentro de la célula sugiere que estas proteínas realizan funciones similares en las diferentes especies en las que se encuentran (Mcmullin & Hallberg, 1988; Gould, et al., 2007)

El gen *groEL*, que codifica una subunidad de 60 kDa (conocida como GroEL, chaperonina de 60 kDa y proteína de choque térmico 60 “Cnp60”) de un complejo que ayuda con el plegamiento tridimensional de proteínas bacterianas, tiene el potencial de servir como marcador filogenético general, debido a su ubicuidad y conservación en la naturaleza (Segal & Ron, 1996).

Este gen está presente en prácticamente todas las bacterias, el objetivo universal *cpn60* 549-567 pb (183-189 aminoácidos) es accesible desde cualquier aislado o de una comunidad microbiana con un conjunto de primers de amplificación universales (Harvey et al., 2002). Además, la secuencia que se amplifica es muy distinta entre los organismos y hay una extensa base de datos de información de secuencias de *cpn60* en múltiples microorganismos que está disponible (Hill et al., 2004). Dado que las secuencias *cpn60* son tan distintas, lo suficientemente cortas para ser secuenciadas en una sola reacción y accesibles usando un conjunto universal de cebadores de amplificación, las hacen ideales para la comparación filogenética de organismos evolutivamente emparentados.

2.4 Mecanismos osmoregulatorios y solutos compatibles

Las bacterias halófilas y archaeas han desarrollado dos mecanismos osmoreguladores básicamente diferentes para hacer frente a la fuerza iónica y el considerable estrés hídrico, a saber, el mecanismo de "sal en el citoplasma" y el mecanismo de los solutos compatibles (Oren, 2002).

El ajuste osmótico de la célula puede lograrse aumentando la concentración de sal KCl en el citoplasma de acuerdo con la osmolaridad ambiental. Por el contrario, los microorganismos que

aplican el mecanismo de los solutos compatibles mantienen su citoplasma, en gran medida, libre de KCl y el diseño del interior de la célula permanece básicamente sin cambios. En su lugar, los organismos de este grupo acumulan compuestos orgánicos altamente solubles en agua, con el fin de mantener un equilibrio osmótico con el medio circundante (Roberts, 2006).

Estas moléculas no alteran el metabolismo de las células, ni siquiera a altas concentraciones citoplasmáticas, y por lo tanto se denominan adecuadamente "solutos compatibles" (Brown, 1976).

Los solutos predominantes compatibles en las bacterias halófilas son los derivados de aminoácidos glicina-betaína y ectoína (Roberts, 2006; Oren, 2008). La mayoría de las bacterias quimioheterotróficas pueden utilizar fácilmente la glicina-betaína como un soluto compatible si está disponible en el medio ambiente. Sin embargo, sólo unos pocos son capaces de sintetizar *de novo* la glicina-betaína (Nyssölä et al., 2000).

Los solutos compatibles son beneficiosos para las células bacterianas no sólo como solutos osmorreguladores, sino también, como protectores de proteínas al mitigar los efectos perjudiciales de la congelación, la desecación y las altas temperaturas (Borges et al., 2002).

2.5 Ectoínas

La ectoína fue descubierta como un soluto compatible en las bacterias extremadamente halófilas *Ectothiorhodospira halochloris* (Galinski et al., 1985) y, posteriormente, se detecta también en *Halomonas elongata* (Peters et al., 1990). Mientras que la hidroxiectoína fue descubierta originalmente en la bacteria productora de actinomicina-D *Streptomyces parvulus* (Inbar et al., 1988).

La mayoría de los procariontes sintetizan el derivado de aspartato, ectoína (1,4,5,6, ácido tetra-2-metil-4-pirimidoncarboxílico) como su principal soluto compatible (Roberts et al., 2006), que también puede ser utilizado como fuente de energía por bacterias halófilas como *Halomonas elongata* y *Chromohalobacter salexigens* (Vargas et al., 2006).

El efecto beneficioso se explica por la interacción desfavorable de solutos compatibles con el esqueleto peptídico de la proteína. La menor afinidad de los solutos compatibles, en comparación con el agua, para la superficie de la proteína, se denomina efecto osmóforo y da como resultado

una fuerza termodinámica que contribuye al plegamiento de proteínas y al aumento de la estabilidad de la proteína. La ectoína posee propiedades protectoras adicionales en comparación con otros solutos compatibles y estabiliza incluso células enteras contra tensiones tales como radiación UV o citotoxinas (Bolen y Baskakov, 2001).

La Ectoína (y su derivado hidroxilado, hidroxiectoína) están presentes en bacterias halófilas/halotolerantes pertenecientes a los grupos Actinobacteria, Firmicutes, y Proteobacteria (da Costa et al., 1998; Ventosa et al., 1998).

Sus propiedades protectoras hacen a la ectoína un compuesto valioso, que se comercializa en la atención de la salud y productos para el cuidado de la piel. El producto Ectoine se produce anualmente en una escala de toneladas por industria en un proceso biotecnológico con la γ -proteobacteria halófila *H. elongata* usada como cepa productora (Lentzen y Schwarz, 2006).

2.6 Síntesis de ectoína e hidroxiectoína

La ectoína se sintetiza a partir del aspartato-semialdehído, el intermedio central en la síntesis de aminoácidos pertenecientes a la familia del aspartato (Figura 1). La formación de ectoína comprende tres etapas enzimáticas (Ono et al., 1999).

En primer lugar, el aspartato-semialdehído es transaminado al ácido 2,4-diaminobutírico (DABA) con glutamato como donante del grupo amino. La transaminación es catalizada por la transaminasa DABA (EctB). A continuación, un grupo acetilo se transfiere a DABA a partir de acetil-CoA por DABA-N-acetiltransferasa (EctA) con el fin de sintetizar ácido N-acetil-1,4-diaminobutírico. Finalmente, la ectoína sintasa (EctC) cataliza la condensación cíclica del ácido N-acetil-1,4-diaminobutírico, lo que conduce a la formación de ectoína. Bajo ciertas condiciones de estrés (por ejemplo, temperaturas elevadas) *H. elongata* convierte parte de la ectoína en 5-hidroxiectoína por ectoína hidroxilasa (EctD) (Wohlfarth et al., 1990).). La capacidad de un microorganismo dado para sintetizar 5-hidroxiectoína invariablemente depende de su capacidad para producir ectoína, lo que sugiere que la formación de 5-hidroxiectoína se produce ya sea directamente de ectoína o de uno de sus intermedios biosintéticos (Prabhu et al., 2004; García-Esteva et al., 2006).

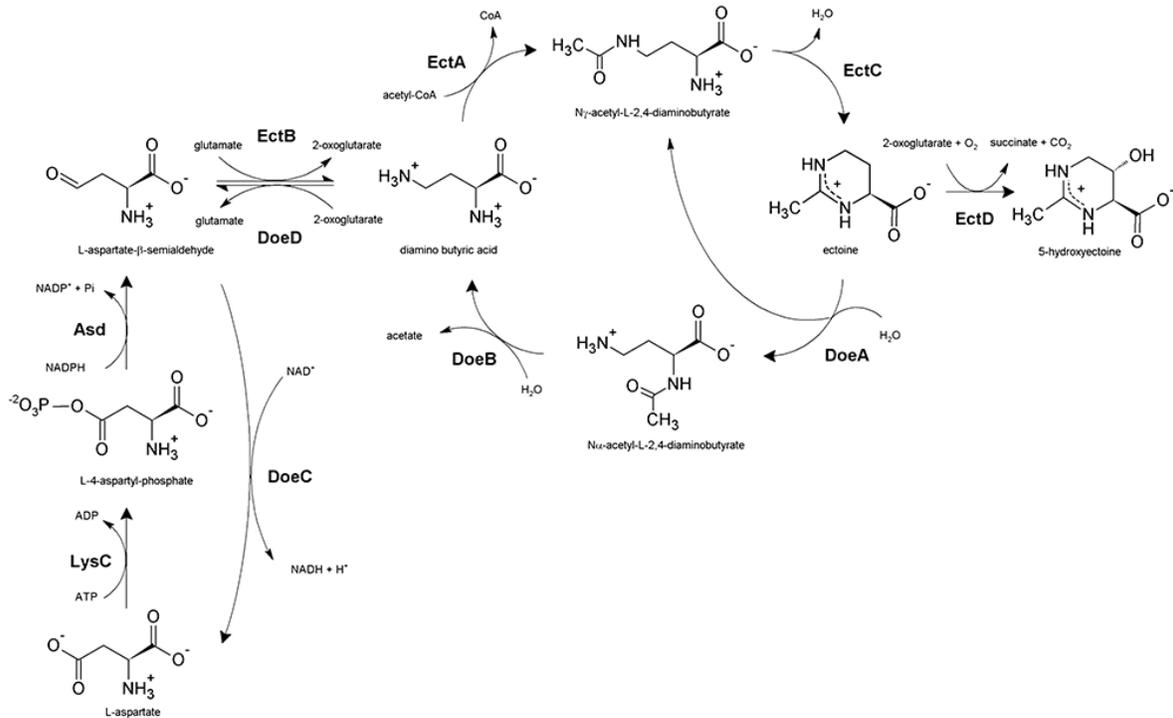


Figura 1. Ruta metabólica completa de ectoína e hidroxiectoína en *Halomonas elongata* (Schwibbert et al., 2011).

2.7 Descripción de los genes involucrados en la síntesis de ectoína

El gen *ectA* codifica una proteína de 192 residuos con una masa molecular calculada de 21,2 kDa. De acuerdo con los estudios de (Ono et al., 1999), la DABA-acetiltransferasa EctA muestra una alta especificidad para su sustrato DABA. EctA de *H. elongata* es una proteína bastante ácida con un valor pI (punto isoeléctrico) calculado de 4.8.

Se pueden encontrar proteínas EctA ácidas similares en la mayoría de las bacterias marinas y halófilas (por ejemplo, *C. salexigens*, pI 5.3, *Bacillus halodurans*, pI 5.5, *Halorhodospira halophila*, pI 5.4 y *Blastospirellula marina* pI 4.7), así como en bacterias del suelo de Actinomyces (Por ejemplo, *Nocardia farcinica*, pI 5.0, *Mycobacterium gilvum*, pI 5.9, *Streptomyces coelicolor*, pI 5.0) (Ono et al., 1999).

El gen *ectB* codifica una proteína de 421 residuos con una masa molecular de 46,1 kDa, que requiere K⁺ para su actividad transaminasa y para la estabilidad de la proteína. Los experimentos de filtración en gel con proteína purificada de *H. elongata* indican que la DABA aminotransferasa EctB podría formar un homohexámero en el estado nativo (Ono et al., 1999). El donante de grupo

amino preferido de EctB en la formación de DABA es glutamato, mientras que en la reacción inversa DABA y γ -aminobutirato son los donantes de grupos amino preferidos para α -cetoglutarato (Ono et al., 1999).

El gen *ectC* codifica la ectoína sintasa, una proteína de 137 residuos con un peso molecular calculado de 15.5 kDa y un valor pI de 4.9. La proteína EctC pertenece a la familia de enzimas de las liasas de carbono-oxígeno. Experimentos *in vitro* con EctC purificada revelaron que la actividad de ectoína-sintasa y afinidad con su sustrato están fuertemente afectadas por NaCl (Ono et al., 1999). Los aminoácidos N-acetilados que tienen un esqueleto de carbono con uno (derivados de ornitina) o dos (derivados de lisina) más átomos que el ácido N-acetil-diaminobutírico no son sustratos adecuados para EctC. Galinski et al., (1997) que describieron por primera vez la vía de la biosíntesis de la ectoína demostraron la reversibilidad de la reacción de la ectoína sintasa cuando se midieron en extractos de células crudas de *Halorhodospira* (anteriormente *Ectothiorhodospira halochloris*) (Peters et al., 1990). Sin embargo, Ono et al., (1999) caracterizó a EctC purificado de *H. elongata* como una enzima que es incapaz de llevar a cabo la reacción inversa de la ectoína al ácido N-acetil-diaminobutírico cuando la ectoína se ofreció como sustrato en el intervalo de 10 mM a 1 M (Ono et al., 1999).

La ectoína hidroxilasa codificada por *ectD* consta de 332 aminoácidos y tiene un peso molecular de 37.4 kDa. La proteína EctD es un miembro de una subfamilia de oxigenasa dentro de la superfamilia de dioxigenasa dependiente de hierro (II) y α -cetoglutarato que no contiene grupo hemo. Se demostró que la ectoína hidroxilasa catalizaba la hidroxilación directa de ectoína a 5-hidroxiectoína (Bursy et al., 2007).

2.8 Organización de *ectABCD* en diferentes procariontas

Los genes *ectABCD* y las proteínas para la síntesis de ectoína son muy conservados entre las bacterias productoras de ectoína. Un estudio publicado recientemente por Lo et al., (2009) analizó la distribución filogenética de los genes *ect* y mostró que la organización prevalente de estos genes está en un solo grupo de al menos tres genes (*ectABC*). Sin embargo, la comparación del genoma de *H. elongata* con otros genomas reveló que los genes *ectABC*, no siempre están organizados de esta manera. Un primer análisis realizado por Vargas et al., (2008) con el genoma de *C. salexigens* llegó a un resultado similar. En este estudio se encontró que en *Nitrosococcus oceani*, *ectC* se encuentra en un sitio diferente de *ectAB*. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

DSM 11845 [anteriormente *aquaeolei* VT8 (Márquez y Ventosa, 2005)], lleva tres ORCs (Complejo de Reconocimiento de Origen) *ectC*, pero éstos se encuentran en diferentes sitios dentro del genoma y ninguno está cerca de *ectAB*. En *Alkalilimnicola ehrlichii*, el gen *ectC* se encuentra aguas abajo de *ectAB* pero en la hebra opuesta. En todos los otros genomas que se consideraron en este estudio, los componentes de *ectABC* se agruparon similar a *ectABC* de *Halomonas elongata*. *Bacillus halodurans*, *Ruegeria* [anteriormente *Silicibacter* sp. TM1040, y todas las especies de *Vibrio* analizadas en el estudio (Yi et al., 2007) poseen un solo grupo *ectABC* y falta de *ectD* que codifica la ectoína hidroxilasa.

En *H. elongata* y otros dos miembros de Oceanospirillales (*C. salexigens*, *Alcanivorax borkumensis* SK2), en la γ -proteobacteria *Saccharophagus degradans* y en *B. clausii*, el grupo *ectABC* y el gen *ectD* se pueden encontrar en sitios separados dentro del genoma. *C. salexigens* difiere de *H. elongata* y de los otros miembros de este grupo al tener un segundo ORF (Marco abierto de lectura) similar al *ectD* denominado *ectE*. Similar a *ectD*, el locus *ectE* se separa de *ectABC* en *C. salexigens* (Yi et al., 2007).

2.9 Mecanismos catabólicos y transportadores

Las células no dependen solamente de la síntesis *de novo* de ectoína para su adaptación a ambientes salinos altos, sino que también pueden tomar solutos o precursores compatibles del mismo a partir del medio. Para habilitar la absorción de soluto, *H. elongata* está equipado con un conjunto de transportadores de soluto compatibles de los cuales sólo uno acepta ectoína como sustrato, a saber, el transportador específico ectoínico TeaABC (Kunte et al., 2004)

TeaABC no sólo es necesario para la acumulación osmorreguladora de ectoína externa, sino que también contrapesa un sistema desconocido responsable de excretar la ectoína endógena al medio (Grammann et al., 2002). El descubrimiento de este sistema se basó en el hallazgo de que cepas de *H. elongata* con un transportador TeaABC inoperable y liberación constante de ectoína al medio circundante. A pesar de esto, las células de éste mutante son capaces de mantener la concentración de ectoína interna en el mismo nivel que la cepa de tipo salvaje. Aparentemente, la mutación de TeaABC no sólo causa la excreción de ectoína al medio, sino que también da como resultado una sobreproducción de ectoína. Esta observación condujo a la hipótesis de que TeaABC podría estar relacionado con la regulación de la síntesis de ectoína (Kunte et al., 2004) y ayudó a diseñar una cepa de producción de ectoína de *H. elongata* con mayor productividad en la síntesis

de ectoína que la cepa de tipo salvaje (Kunte et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo de la excreción de ectoína es todavía desconocido. Debido a la importancia industrial de la ectoína y su organismo productor *H. elongata*, es necesario obtener una visión más profunda del transporte de ectoína a través de la membrana citoplásmica, el metabolismo ectoico y los flujos metabólicos en *H. elongata* con el fin de aumentar la producción de ectoína usando modificaciones genéticas metabólicas (Marin-Sanguino et al., 2009).

2.10 Mecanismos para la degradación ectoína

La ectoína puede ser acumulada hasta la concentración molar por *H. elongata* dependiendo de la salinidad del medio circundante. Además, la ectoína también puede utilizarse como fuente de carbono y de nitrógeno por *H. elongata* y cuando se ofrece ectoína como nutriente, todavía sirve como soluto compatible (Göller et al., 1999). Con el fin de averiguar cómo la ectoína se degrada, el genoma de *H. elongata* se comparó con *Sinorhizobium meliloti* (Göller et al., 1999).

En *S. meliloti*, se describió un grupo de cinco ORFs denominadas *eutABCDE* con funciones hipotéticas en el catabolismo de ectoína (Jebbar et al., 2005). No se ha asignado ninguna función exacta a ninguno de estos cinco ORF, pero sus secuencias de aminoácidos deducidas indican que son similares a arilmalonato decarboxilasas (*eutA*), treonina deshidratasa (*eutB*), ornitina ciclodeaminasa (*eutC*), aminopeptidasas (*eutD*) y glutamato-desuccinilasa/aspartoacilasas (*eutE*). Se puede encontrar un homólogo para cada uno de los genes *eutBCDE* dentro del cromosoma de *H. elongata*, pero no se pudo identificar ningún homólogo de *eutA*. Los homólogos de *eutBC* (Helo_3660, 3659) y *eutDE* (Helo_3665, *doeA*; Helo_3664, *doeB*) están organizados en dos grupos que están separados por tres ORFs. Estas tres ORFs son homólogos de genes anotados como reguladores transcripcionales (Helo_3663, *doeX*), deshidrogenasa (Helo_3662, *doeC*) y transaminasas (Helo_3661, *doeD*), respectivamente.

Las ORFs Helo_3665, Helo_3664, Helo_3662 y Helo_3661 fueron elegidas para experimentos de mutación, ya que la función enzimática prevista de sus productos génicos les haría candidatos para la descomposición de ectoína en aspartato. Se suprimieron los cuatro ORFs (mutación nula en el marco) y los mutantes resultantes eran incapaces de utilizar la ectoína como fuente de carbono o mostraban un crecimiento reducido en la ectoína. Por lo tanto, se nombró el grupo *doeABCD* (degradación de la ectoína ABCD). Con base en los experimentos y la homología de secuencias, se han denominado a estos ORFs *doeA* (Helo_3665, ectoína hidrolasa), *doeB* (Helo_3664, N α -acetil-I-

2,4-diaminobutirato deacetilasa), *doeC* (Helo_3662, aspartato-semialdehído deshidrogenasa) y *doeD* (Helo_3661, transaminasa de ácido diaminobutírico). Una quinta ORF perteneciente al grupo de *doe* se encuentra entre *doeB* y *doeC*, y se denomina *doeX* (Helo_3663). La delección de Helo_3660 (*eutB*) y Helo_3659 (*eutC*) no perjudica el crecimiento de los mutantes correspondientes en la ectoína y sugiere de estos resultados que *eutBC* no participa en la degradación de la ectoína. En estudios previos, analíticos mutacionales y adicionales han llegado a la conclusión de que la degradación de la ectoína procede de la hidrólisis de ectoína (DoeA) al nuevo compuesto ácido N α -acetil-1,4-diaminobutírico, desacetilación de N α -acetil-1,2,4-Diaminobutírico (DoeB) a ácido 1,2,4-diaminobutírico, y una reacción de transaminasa (DoeD) que conduce al aspartato-semialdehído. Finalmente, el aspartato-semialdehído es oxidado por DoeC al aspartato (Pastor et al., 2010).

El gen *doeA* (Helo_3665) es un homólogo de *eutD* y codifica una proteína 399 aa (44.9 kDa, pI 5.0) que pertenece a la familia peptidasa-M24. Dentro de esa familia, DoeA es similar a la creatinina (creatina amidinohidrolasa), que cataliza la hidrólisis de la creatina a sarcosina y urea (Coll et al., 1990). La delección de *doeA* crea un mutante incapaz de crecer en la ectoína como fuente de carbono (Pastor et al., 2010, Jebbar et al., 1992).

2.11 Organización de genes para degradación de ectoína.

A partir de datos genómicos comparativos, la vía de degradación de ectoína descrita para *H. elongata* es empleada principalmente por organismos no halófilos que, según su composición genética, son incapaces de sintetizar ectoína *de novo*. Los sitios *doeA* / *eutD* y *doeB* / *eutE* podrían encontrarse dentro de los genomas de 18 bacterias, todas pertenecientes a las proteobacterias. Los homólogos de los sitios *doeA* y *doeB* de *H. elongata* se pueden encontrar en muchas otras Bacterias, predominantemente en las Rhizobiales del dominio α -proteobacteria y en las Burkholderiales de las β -proteobacterias. En análisis posteriores, se han seleccionado sólo unos pocos representantes de conjuntos más grandes de secuencias muy similares, procedentes de especies como *Burkholderia*, que aparecen sobre representados en la lista de genomas completamente secuenciados. El conjunto reducido de secuencias contiene 18 miembros, que comparten una similitud relativamente alta (48% a > 80% de identidad de secuencia) con *doeA* de *H. elongata* (Helo_3665) (Schwibbert et al., 2011).

2.12 Mecanismo de acción de Ectoínas

Los solutos compatibles son anfífilicos por naturaleza y capaces de "humedecer" las proteínas hidrófobas. Se ha sugerido que los solutos compatibles interrumpen la inhibición osmótica porque aumentan el contenido total de agua y, por lo tanto, el volumen citoplásmico de las células (Cayley et al., 1992). Las propiedades de formación de estructuras y de rotura de solutos compatibles influyen indirectamente en las "conchas" de hidratación y, por lo tanto, en las actividades de las proteínas implicadas (Wiggins, 1990).

Existen diferentes teorías para explicar la función protectora de los solutos compatibles en un entorno de bajo nivel de agua. El modelo de exclusión preferencial fue propuesto como un mecanismo universal de estabilización de proteínas (Arakawa y Timasheff, 1985; Timasheff et al., 2002).

Este modelo propone que debido a la interacción desfavorable con la superficie de las proteínas, los osmolitos protectores son excluidos de éstos, en contraste con los solutos desnaturalizantes que están en contacto con su superficie. De este modo, las moléculas de solutos compatibles son expulsadas de la capa de hidratación inmediata de las proteínas y en consecuencia, el despliegue necesita energía adicional y es desfavorecido termodinámicamente (Kurz, 2008; Lee y Timasheff, 1981). Esto, a su vez, conduce a una hidratación preferente de la proteína porque se ve obligada a ocupar un volumen menor para minimizar su superficie expuesta, promoviendo así su conformación nativa. Debido a que los solutos compatibles no interactúan directamente con la superficie de la proteína, la actividad catalítica permanece inalterada (Galinski et al., 1997; Kolp et al., 2006).

Según este modelo, el llamado efecto "osmóforo" explica cómo este efecto puede ser universal (Bolen y Baskakov, 2001). Los enlaces de hidrógeno, Van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas son responsables del plegamiento de proteínas. Además, se argumentó que la interacción desfavorable del soluto con el esqueleto peptídico proporciona la base molecular para la exclusión de los solutos y, posteriormente, el efecto estabilizador (Liu y Bolen, 1995; Wang y Bolen, 1997).

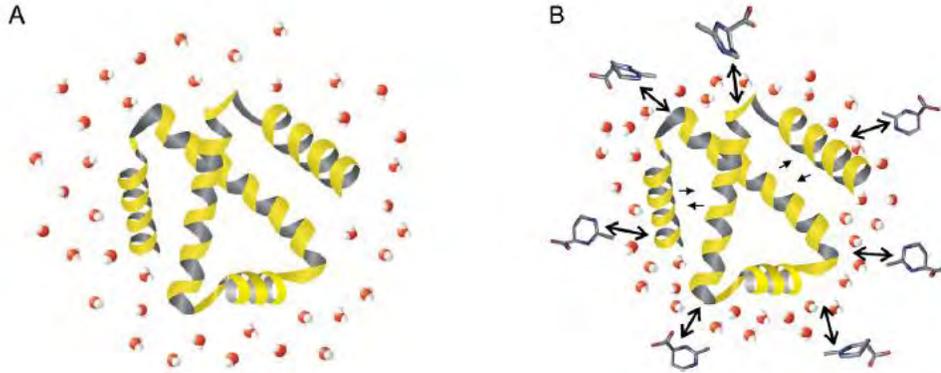


Figura 2. Mecanismo de estabilización de solutos compatibles. Con base en el modelo de exclusión preferencial, la conformación nativa de una proteína (A) se ve favorecida por la presencia de las moléculas de solutos compatibles (B). Se genera una proteína plegada compacta al expulsar los solutos compatibles de la capa de hidratación inmediata de la proteína, minimizando el volumen del cual debe excluirse el soluto. Las esferas pequeñas representan moléculas de agua y las cadenas principales representan solutos compatibles (ectoína) (Pastor et al., 2010).

Por otra parte, la teoría del reemplazo de agua (Clegg et al., 1982, Crowe et al., 1990) se basa en la observación de que muchos organismos son capaces de perder más del 50% del agua celular y volver a la actividad completa después de la rehidratación. Las estructuras proteicas son protegidas por la acumulación de ciertos solutos compatibles y sus interacciones con las superficies. Puesto que, en este modelo, el agua es reemplazada por solutos, parece ser el completo opuesto de la teoría de la interacción preferencial. La sustitución parece ser una situación muy especial en actividades con un nivel de hidratación extremadamente bajo, mientras que el modelo de interacción es válido para el rango más diluido de concentraciones de soluto. La importancia de este modelo reside en el hecho de que la afinidad relativa de un soluto hacia agua o proteína puede ser dependiente de la concentración, especialmente cuando hay desecación (Kaniyas y Acker, 2006).

2.13 Aplicaciones biotecnológicas de ectoínas

Los aspectos termodinámicos de la estabilización de proteínas por hidroxiectoína se estudiaron mediante calorimetría de barrido diferencial y ribonucleasa-A bovina (Knapp et al., 1999). La estabilización significativa de la RNasa-A por hidroxiectoína, hace que sea un estabilizador interesante en los procesos biotecnológicos en los que las enzimas se aplican en presencia de desnaturalizantes o a alta temperatura (Knapp et al., 1999). Hidroxiectoína también es capaz de proteger la deshidrogenasa de lactato (LDH) de la oxidación catalizada por metal y contra la

oxidación por peróxido de hidrógeno (Andersson et al., 2000), indicando que la protección es independiente de la fuente de daño oxidativo.

El efecto acumulativo de factores externos como radiación, viento, humedad y temperaturas extremas lleva al envejecimiento de la piel (Rabe et al., 2006). Se ha demostrado que la ectoína protege y estabiliza las membranas de las células pretratadas contra el efecto perjudicial de los tensioactivos, así como la piel humana a los factores de estrés que normalmente conducirían a la deshidratación de la piel (Graf et al., 2008). Así, la ectoína funciona como un hidratante más potente que el glicerol y presenta una eficacia hidratante a largo plazo (Graf et al., 2008). Además, una exposición a largo plazo a las radiaciones UVA podría conducir a la fotocarcinogénesis (Sander et al., 2004), la inmunosupresión (Wang et al., 2001), las fotodermatitis y el fotoenvejecimiento (Fourtanier et al., 2006). Las ectoínas protegen la piel de los efectos de la radiación UVA inducida por el daño celular en una serie de diferentes mecanismos. Uno de los mecanismos de la exposición y los daños provocados por los rayos UVA es la formación de ceramida mediada por oxígeno molecular. La exposición de queratinocitos primarios humanos a la UVA produce un nivel de ceramida incrementado y, en consecuencia, se activa una cascada de señalización intracélular que conduce a la expresión de la molécula de adhesión intercelular proinflamatoria. Estos efectos negativos se evitan con éxito mediante la ectoína debido a sus propiedades de agotamiento del oxígeno molecular (Buenger y Driller, 2004, Grether-Beck et al., 2005).

3. ANTECEDENTES

Karin Goëller (1998) generó un mutante de *H. elongata* sensible a la sal alterando la biosíntesis de la ectoína. Este mutante no logró crecer en medio mínimo con concentraciones de NaCl superiores a 4%, lo anterior demostró que la bacteria requería de la ectoína para sobrevivir en un medio salino

García-Esteva (2006) demostró mediante experimentos de inducción a diferentes concentraciones NaCl que en *Chromohalobacter salexigens*, la síntesis de hidroxiectoína es llevada a cabo por el gen *ectD* y que es esencial para la osmoprotección.

Jan Bursy (2007) identificó el gen estructural (*ectD*) para la ectoína hidroxilasa en *Salibacillus salexigens*, sus resultados demostraron que los niveles de transcripción del operón *ectABC* y del gen *ectD* en particular aumentaron exponencialmente en función de la salinidad indicando inequívocamente que la expresión del *ectD* tiene un papel fundamental en este proceso.

Karin Schwibbert, (2010) reconstruye completamente la biosíntesis de ectoína a partir de glucosa y amoníaco, anotando los genes que codifican las enzimas metabólicas centrales y las vías que conducen a los precursores de ectoína. Además, identifican una vía para la degradación de la ectoína y se muestra su conexión cíclica a la síntesis de ectoína. Comprueban que la delección del gen *doeA* (*eutD*), que codifica la proteína ectoína hidrolasa, que cataliza el primer paso en la vía de degradación de la ectoína, ha conducido a un aumento de la productividad volumétrica de la ectoína.

Cai (2011) reporta las secuencias del genoma de *Halomonas* sp. TD01 y aporta información sobre el metabolismo, la relación evolutiva de Polihidroxicanoatos (PHA) y solutos osmorreguladores ectoínas de bacterias halófilas, al realizar un análisis detallado y sistemático *in silico* en los genes relevantes PHA y *ectABCD* proporciona abundantes ideas en sus clasificaciones, funciones y filogenia además de enfatizar en los mecanismos de osmorregulación, que se discuten a través de la comparación de la distribución genómica para proponer nuevas formas en la aplicación de numerosas tecnologías post-genómicas para acelerar el trabajo en la optimización genética de *Halomonas* sp. TD01 con el objetivo de mejorar la producción industrial de PHA, acompañada con la coproducción de ectoínas.

4. JUSTIFICACIÓN

Ha sido demostrado que los solutos compatibles, especialmente las ectoínas, son capaces de proteger enzimas, membranas y células en general, contra tensiones causadas por la exposición a altas concentraciones de sal, al calor, la congelación y la desecación, por ello existe un creciente interés en el uso de solutos compatibles en el campo de la biotecnología. Identificar bacterias que posean el gen *ectD* adquiere gran relevancia debido a que no todos los organismos sintetizadores de ectoínas pueden formar hidroxiectoína. Las bacterias del género *Halomonas* además de su importancia en diversos aspectos ecológicos, tienen potencial en aplicaciones biotecnológicas debido a la producción de estos metabolitos. Este es el primer reporte de los genes *ectD* y *eutD* en *Halomonas* a nivel nacional, ya que, en México no se tiene registro alguno que demuestre que las bacterias del género *Halomonas* que han sido reportadas dentro del territorio nacional tengan presentes o ausentes estos genes. La identificación de especies bacterianas dentro del género *Halomonas* spp., recolectadas y aisladas de muestras de agua y sedimento en la salinera “Las chiquitas” del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, es el primer paso para lograr la detección y el análisis de los genes *ectD* y *eutD* involucrados en el metabolismo anabólico y catabólico de la ectoína e hidroxiectoína. La identificación de organismos que posean dichas enzimas brinda, nos permitirá proporcionar información de la biología molecular de estas bacterias, así como, poseer un conocimiento potencial para ser empleadas en futuros estudios enfocados a la obtención de estos metabolitos para su uso en aplicaciones biotecnológicas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar el gen *ectD* en cepas de *Halomonas* spp., del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Objetivos particulares

Aislar cepas bacterianas de la salinera de “Las chiquitas” del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla para su identificación como *Halomonas* spp., mediante morfología colonial, pruebas bioquímicas y el análisis de secuencias de rRNA 16S y *cnp60*.

Determinar la secuencia nucleotídica parcial del gen *ectD* y *eutD* en cepas de *Halomonas* spp., del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Identificar los dominios conservados en la secuencia del gen *ectD* y *eutD* de las cepas de *Halomonas* spp., de Zapotitlan Salinas, Puebla y contrastarlos con especies que presenten una arquitectura similar en el dominio estudiado.

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Área de estudio

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán es una de las regiones áridas más importantes por su diversidad biológica y cultural. Este valle constituye una zona de clima arido a semi-arido localizada en el sureste del estado de Puebla y el noreste de Oaxaca, abarca 490,186 hectáreas distribuidas en 21 municipios del estado de Puebla y 30 de Oaxaca y es considerado una de las zonas de mayor diversidad biológica y cultural de México. La zona pertenece y se encuentra en la Sierra Madre del Sur. Se caracteriza por su relieve accidentado, donde sierras que no rebasan los tres mil metros sobre el nivel del mar rodean los extensos valles de Tehuacán y Zapotitlán, así como la Cañada de Cuicatlán. Casi la totalidad de la reserva forma parte de la cuenca alta del río Papaloapan, uno de los más caudalosos de México, aun cuando en esta zona la humedad del ambiente no alcanza a formar grandes corrientes de agua. El Papaloapan recibe las aguas de numerosos riachuelos que nacen en las montañas de la Sierra de Tehuacán y la Sierra Mixteca, entre ellos habría que citar el río Tehuacán, el Calapa y el Zapotitlán. (CONAP-SEMARNAT-INEGI)

El clima de la región es cálido semiseco y cálido semi-tropical en la región de la Cañada cuicateca, con lluvias moderadas a escasas en el verano. En las partes altas de la sierra es frecuente ver que las montañas están coronadas de una espesa neblina que en escasas ocasiones llega a condensarse para formar una modesta llovizna (CONAP-SEMARNAT).

Adicionalmente, esta región ha tenido gran importancia para la reconstrucción de la prehistoria de la región cultural conocida como Mesoamérica, pues en algunas de sus cuevas se ha encontrado la evidencia más antigua de domesticación de plantas y origen de agricultura en el Nuevo Mundo (MacNeish, 1967). Los hallazgos, realizados por MacNeish, se encuentran asociados a ciertos artefactos líticos y fueron encontrados en diversos abrigos montañoses de la zona. Hay que señalar que uno de los factores que contribuyeron a la conservación de los restos vegetales en el valle de Tehuacán fue precisamente la extrema aridez de su clima. Durante el desarrollo precolombino de la civilización mesoamericana, la zona estuvo ocupada por pueblos de filiación otomangueraana.

Los milenios de ocupación humana en este sitio, ha permitido el desarrollo de las comunidades indígenas: mixtecos, cuicatecos, ixcatecos, nahuas, chocholtecos, popolocas, chinantecos y ma

zatecos (Casas et al., 1995). La zona fue declarada Reserva de la Biosfera el 11 de septiembre de 1998 por el presidente de México en turno, Ernesto Zedillo Ponce de León (CONAP-SEMARNAT). No obstante, los gobiernos de Puebla y Oaxaca habían declarado Zonas Sujetas a Conservación Ecológica al Valle de Cuicatlán (1996), el Valle de Tehuacán y el Valle de Zapotitlán (1997) que constituyeron el núcleo de la nueva Reserva de la Biosfera. Este valle es considerado como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y recientemente ha sido decretado como una Reserva de la Biósfera (CONAP-SEMARNAT)

Debido a gran tamaño del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y a los antecedentes de estudios microbiológicos realizados anteriormente, el trabajo de investigación se realizó en la región del Valle de Zapotitlán Salinas. El municipio de Zapotitlán Salinas está localizado al sureste del Valle de Tehuacan, entre 18°07'18" y 18°26'00"N y entre 97°19'24" y 97°39'06"O. Ocupa una superficie de 484,77 km², el clima es árido con promedios de 542,5mm de precipitación anual y 19.8°C de temperatura anual promedio (CONAP-SEMARNAT). Entre la vegetación se encuentran algunas comunidades propias de climas áridos y semiáridos de Norteamérica, además de exhibir una gran influencia de flora tropical del sur. La zona de estudio se encuentran principalmente tres tipos de vegetación (Rzedowski, 1978): Matorral xerófilo, bosque espinoso y bosque tropical caducifolio. El grupo humano dominante son mestizos descendientes de Popolocas. La población de Zapotitlán Salinas se estimó en 8900 habitantes en el 2000, 4145 hombres y 4755 mujeres (INEGI, 2005). La ocupación de la gente está dividida en varias actividades como la agricultura, recolección de leña, artesanía en talleres de ónix, extracción de sal, albañilería y en los últimos años, la industria textil se ha desarrollado en la comunidad.



Figura 3. En la fotografía se observa la salinera “Las Chiquitas” el sitio de estudio dentro del área del Valle de Zapotitlan Salinas parte de la reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán en el Estado de Puebla.

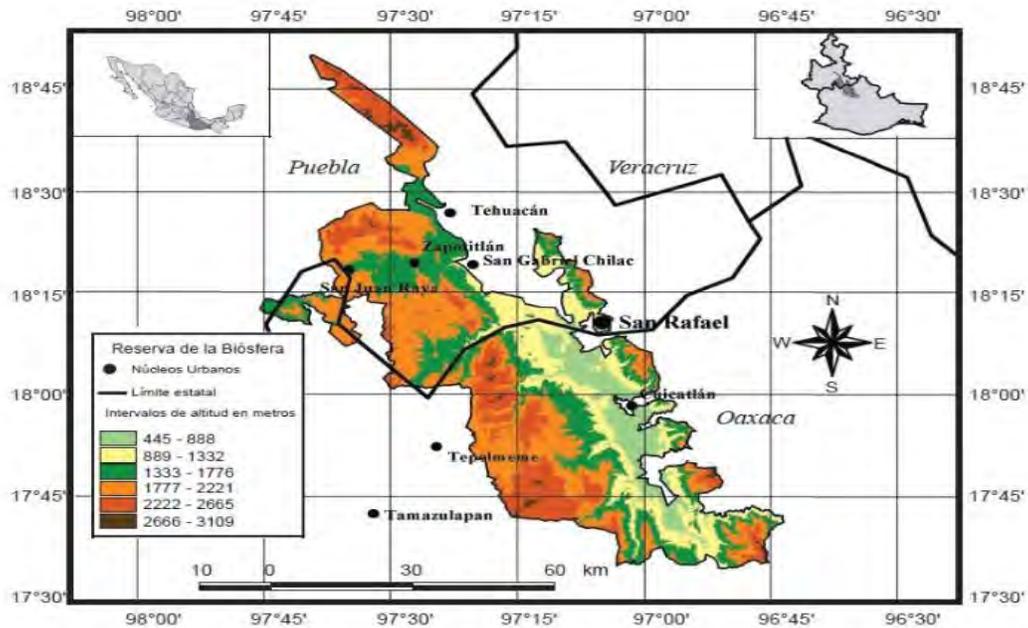


Figura 4. Mapa de la ubicación geográfica de la reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, donde se muestra la localización del Valle de Zapotitlan Salinas en el Estado de Puebla (Canales et al. 2006)

6.2 Sitios de muestreo

Se recolectaron 20 muestras de agua y sedimento en 5 sitios de muestreo de la salinera “Las chiquitas” del Valle de Zapotitlan Salinas, Puebla. Los 5 sitios de muestreo se delimitaron arbitrariamente tratando de que cada uno de los sitios tuviese igual número de piletas las cuales

conformaban el complejo de la salinera (Figura 5). Una vez delimitados los sitios de muestreo se realizó un muestreo aleatorio en cada una de las piletas que conforman cada sitio, así se obtuvo un muestreo homogéneo de cada uno de los sitios.



Figura 5. En la imagen satelital ($18^{\circ}20'48.8''N$ $97^{\circ}26'59.1''W$) se muestra la salinera "Las Chiquitas", cada ovalo de color representa el área que delimita a cada uno de los sitios de muestreo numerados del 1 al 5: verde-1, negro-2, amarillo-3, azul-4 y rojo-5 (Imágenes Digital Globe, Google Earth, 2018).

6.3 Parámetros fisicoquímicos

El registro de las lecturas de los parámetros fisicoquímicos puntuales del sitio de muestreo se tomaron para determinar su relación con la presencia de *Halomonas* spp., se realizaron las determinaciones *in situ* de la temperatura atmosférica y del agua ($^{\circ}C$), pH y conductividad (mS/cm) de las diferentes piletas de agua que componen la salinera las chiquitas y la temperatura atmosférica al momento de la colecta.

6.3.1 Temperatura del agua ($^{\circ}C$)

La temperatura de las diferentes piletas de agua fue medida con un termómetro digital Hanna H 19040, se tomaron los valores de la temperatura del agua en tres puntos diferentes de cada una de ellas y se hizo un promedio para establecer la temperatura final para cada sitio, esto para identificar el gradiente de temperaturas a la cual prolifera *Holomonas* spp.

6.3.2 Temperatura atmosférica (°C)

Esta medición fue hecha con un termómetro digital Hanna H 19040, a diferencia de la medición anterior, en ésta el sensor fue expuesto al ambiente. Este parámetro se estableció para posteriormente establecer si la temperatura atmosférica tenía un efecto en la temperatura del agua que pudiera afectar a la presencia de las bacterias del género *Halomonas*.

6.3.3 pH

Se midió con un potenciómetro digital de campo pH/EC/TDS Waterproof Hanna Instruments. Esta medición se hace para determinar si las condiciones de pH en el ambiente pueden determinar la presencia de bacterias del género *Halomonas*.

6.3.4 Conductividad (mS/cm)

Este parámetro fue medido con un conductímetro digital Hanna H 19040 calibrado previo a la medición. Este parámetro depende de la cantidad de iones minerales disueltos en el agua, principalmente sulfatos y carbonatos.

6.4 Análisis microbiológicos

6.4.1 Aislamiento de cepas

En el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO (Unidad de Biotecnología y Prototipos), FES Iztacala UNAM se llevó a cabo el aislamiento microbiológico. Las muestras fueron tomadas directamente del sedimento recolectado pesando 1 g de sedimento y diluido en gradientes 1:10, 1:100 y 1:1000. Se tomó 1ml de la dilución 1:1000 y se colocó en placas Petri esteriles utilizando agar nutritivo adicionado con 5% de NaCl. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente 23-25 °C por 48 horas. Después de obtener cultivos bacterianos se seleccionaron colonias que presentaron morfología de colonias semejantes a las reportadas para el género *Halomonas*. Dichas colonias fueron aisladas y sembradas en placas Petri estériles con el medio antes mencionado y se dejaron incubar bajo las mismas condiciones.

6.4.2 Morfología colonial y celular

Una vez obtenidos los aislados de las colonias se realizaron pruebas de tinción de Gram para observar e identificar la morfología celular. Las colonias bacterianas que resultaron positivas en estos ensayos fueron conservadas en refrigeración a 4°C para los posteriores análisis.

6.5 Prueba fisiológica crecimiento

Se realizaron pruebas de crecimiento en agar nutritivo a distintas concentraciones de NaCl en intervalos de 5%, 10%, 15% y 20%, para comprobar cual es la concentración de NaCl óptima y los límites de tolerancia para el crecimiento de *Halomonas* spp.

6.6 Análisis Bioquímicos

Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para la caracterización de las 8 cepas de *Halomonas* spp., utilizando kits de prueba miniaturizados BD BBL Crystal® Identification Systems.

(ARA) Arabinosa, (MNS) Manosa, (SUC) Sacarosa, (MEL) Melibiosa, (RHA) Ramnosa, (SOR) Sorbitol, (MNT) Manitol, (ADO) Adonitol, (GAL) Galactosa, (INO) Inositol, (PHO) p-n-p-fosfato, (BGL) p-n-p α - β -glucosido, (NPG) p-n-p- β -galactosido, (PRO) Prolina nitroanilida, (BPH) p-n-p bis-fosfato, (BXY) p-n-p-xilósido, (AAR) p-n-p- α -arabinosido, (PHC) p-n-p-fosforilcolina, (GLR) p-n-p- β -glucuronido, (NAG) p-n-p-N-acetil glucosaminida, (GGL) γ -L-glutamil p-nitroanilida, (ESC) Esculina, (PHE) p-nitro-DL-fenilalanina, (URE) Urea, (Gly) Glicina, (CIT) Citrato, (MLO) Acio malonico, (TTC) Cloruro Trifenil Tetrazolio, (ARG) Arginina y (LYS) Lisina.

Adicionalmente, se realizaron pruebas bioquímicas estándar: MIO (prueba de movilidad), (IND) Indol, (ORN) Ornitina, V.P., R.M., Krigel, Producción de gas, (OXI) Oxidasa, (CAT) Catalasa

6.7 Análisis moleculares

6.7.1 Extracción de DNA

El DNA genómico bacteriano fue extraído utilizando el kit “Ultra Clean® Tissue and cells DNA Isolation” marca Mo Bio® siguiendo las instrucciones del fabricante, el DNA templado fue verificado en cuanto a su calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en una solución buffer TBE ajustado a pH 8.5 en proporción 0.5X teñido en una solución de bromuro de etidio.

6.7.2 Diseño de primers

Se utilizó el programa Geneious ver. 7.1.3.® para el diseño de los primers para la amplificación de *eutD* producto ectoína hidrolasa y *ectD* producto ectoína hidroxilasa se realizó basado en el genoma de *Halomonas* sp. TD01 (número de acceso de NCBI/GeneBank [AFQW000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AFQW000000000)) con el acceso a los genes específicos *ectD*, ([EGP18127](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EGP18127)) y *eutD* ([EGP21610.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EGP21610.1)). Para *eutD* se diseñaron tres pares de primers, dos primers interiores que dividían y amplificaban al gen a la mitad (Int1-*eutD* Int2-*eutD*) y un primer exterior (ext-*eutD*) que amplificaba la totalidad del gen (Figura 18). En cuanto a *ectD* se diseñaron tres pares de primers (nov1-*ectD*, nov2-*ectD*, nov3-*ectD*) que dividían al gen en tres secciones (Figura 11).

Cuadro 1. Secuencias de los primers utilizados para la amplificación por PCR punto final.

Gen	Primers	F	R	Producto
<i>ectD</i>	nov1- <i>ectD</i>	GCAACAGTCTACCCAGCTA	GATTATCGGCGGTGACCCTT	629pb
	nov2- <i>ectD</i>	GCAGCAAACGGTTCAACACA	CGGTGGTTAAAGGTCGGGAT	763pb
	nov3- <i>ectD</i>	TCGGTCAAGATCAGTGAGGC	TGGGCATATTTGTCTTGGCT	812pb
<i>eutD</i>	Int1- <i>eutD</i>	ACACGCATTTGGAGGTTAT	CCCACTCACTTCTCCGCTT	820pb
	Int2- <i>eutD</i>	GCCCAGCGTACCTAACCTAC	CCATCGCAATATCCGCCGTA	730pb
	Ext- <i>eutD</i>	TCGGTGCTAGTATCGCCCTA	CGCAGTTGGTTCGGTTGAAG	980pb
rRNA 16S	F <i>Eubac</i> R <i>Eubac</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AAGGAGGTATCCAGCC	1400pb
<i>Cnp60</i>	<i>Cnp60</i>	GAIIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC	YKIYKITCICCRAAICCGGIGCYTT	580 pb

6.7.3 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR-punto final).

Mediante un análisis de PCR punto final utilizando el kit MyTaq® con las especificaciones del fabricante en un termociclador marca BIO RAD mod. T100, se amplificaron los segmentos del gen rRNA 16S, *cnp60*, gen *ectD* y el gen *eutD* utilizando los pares de primers mencionados anteriormente. Los ensayos de PCR fueron realizados con las siguientes especificaciones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Temperaturas y ciclos utilizados en los diferentes ensayos de PCR.

PCR	<i>ectD</i>	<i>eutD</i>	rRNA 16S	<i>cnp60</i>
Temperaturas	30 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	30 ciclos
Desnaturalización	95° C / 5 min.	94° C / 5 min.	95° C / 4 min.	96° C / 5 min.
	95° C / 30 seg.	94° C / 15 seg.	95° C / 1 min.	96° C / 1 min.
Alineamiento	55° C / 30 seg.	50° C / 15 seg.	57.5° C / 1 min.	60° C / 30 seg.
	72° C / 1 min.	72° C / 15 seg.	72° C / 1 min.	72° C / 1 min.
Extensión	72° C / 5 min.	72° C / 6 min.	72° C / 5 min.	72° C / 7 min.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel utilizando un gel de agarosa horizontal al 1.2% (p/v) (Sigma®, St. Louis, MO, EE. UU.) En tampón de ácido Tris-base-etilendiaminatetraacético (TBE 0.5X) (80 voltios durante 45 minutos). Los geles se tiñeron luego con Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe®) y se visualizaron con un transiluminador UV (UVP Inc., San Gabriel, CAS, EE. UU.).

6.8 Secuenciación

La secuenciación de los amplicones correspondientes de rRNA 16S, *cnp60*, *eutD* y *ectD* se realizó mediante el kit de secuenciación Big Dye Terminator versión 3.1, y procesado en un equipo ABI / Hitachi 3130xl Genetic Analyzer en el laboratorio de Bioquímica Molecular UBIPRO-FESI-UNAM.

6.9 Análisis bioinformático

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos se implementó una búsqueda en la base de datos de la NCBI (National Center for Biotechnology Information), empleando el algoritmo BLASTid (Basic Local Alignment Search Tool), para comparar las secuencias nucleóticas entre *Halomonas* spp., del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla y las reportadas en la base de datos de nucleótidos del GenBank.

Para encontrar diferencias entre las secuencias reportadas y las obtenidas se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el algoritmo Geneious Alignment® con una alineación tipo Global con Gaps Libres en el programa Geneious 7.1.3.®

Se realizó una traducción nucleotídeo-aminoácido a partir de las secuencias de la región que codifica *ectD* y *eutD* para cada cepa analizada, mediante el programa Geneious 7.1.3.®

Para determinar el dominio conservado del producto del gen *eutD* y *ectD* la secuencia consenso resultante se sometió a un BLAST en la base de datos de proteínas. Además, las secuencias protéicas consenso fueron analizadas con la herramienta de dominios conservados CDD (Conserved Domains Database) del NCBI.

7. RESULTADOS

Se llevó a cabo un muestreo en la salinera “Las chiquitas” en el Valle de Zapotitlan Salinas, Puebla en el mes de abril de 2016. En el muestreo se recolectaron 20 muestras de agua y sedimentos en distintos puntos de cada una de las piletas que comprenden el sistema de la salinera. Los puntos de muestreo se observan en la figura 5, fueron designados con los números 1 al 5. Las 20 muestras fueron procesadas y se obtuvieron un total de 12 crecimientos bacterianos (55%) sembrados en el medio selectivo, de éstos se pudieron identificar 15 colonias bacterianas. Se identificaron las características bioquímicas, morfológicas coloniales y celulares típicas para el género. Por medio del análisis molecular del gen rRNA 16 S y *cnp60* mediante ensayos de PCR punto final se procesó el total de aislados que presentaron características similares al género para confirmar que pertenecían al grupo de las *Halomonas*. Plenamente identificadas, se procedió a la detección del gen *ectD* y *eutD*.

7.1 Análisis microbiológico

7.1.1 Cultivos bacterianos.

La presencia de *Halomonas* spp., se determinó por el crecimiento de colonias bacterianas en medio nutritivo adicionado con 5% de NaCl así como la presencia de la morfología colonial típica para *Halomonas*, considerando aquellas que presentaban formas y características parecidas a las del género. Un total de 15 colonias fueron seleccionadas como posibles candidatas. La mayoría de los crecimientos coloniales fueron evidentes a los dos días después de que éstos habían sido sembrados e incubados a temperatura ambiente (23° C). Las placas fueron incubadas hasta un máximo de 72 horas después de sembradas, las que no presentaron crecimiento en este lapso fueron descartadas.

7.1.2 Morfología colonial y celular

La morfología celular que presentaban los aislados fue de bacilos Gram negativos cortos y pequeños de 2 a 3 µm. La morfología colonial mostraba colonias de 1 a 2 mm de diámetro a las 24 horas de crecimiento a 23° C, estas colonias eran convexas con un color que variaba de marrón oscuro a un color crema claro, todas ellas con una consistencia viscosa. La mayor presencia de *Halomonas* spp., fue registrada para el sitio de muestreo 4 donde 4/4 muestras resultaron positivas; seguidas por el sitio de muestreo 5 con 75% de muestras positivas y el sitio 2 con 25%.

7.2 Prueba fisiológica de crecimiento

Las cepas confirmadas de *Halomonas* spp., fueron sometidas a una prueba fisiológica de crecimiento en medio nutritivo adicionado con diferentes concentraciones de NaCl en un gradiente de 5, 10, 15 y 20 % para determinar la concentración óptima para su crecimiento y los límites fisiológicos que presentaban cada una de las cepas. El resultado de esta prueba determinó que las cepas tenían un umbral de crecimiento variado que abarcaba todas las concentraciones de NaCl (5-20%). Todas las cepas de las ocho muestras tenían un crecimiento positivo hasta una concentración de 10% de NaCl y sólo cinco de las ocho cepas lograron crecer a concentraciones de 20% NaCl (Cuadro 3).

Cuadro 3. Prueba fisiológica de crecimiento de *Halomonas* spp., en diferentes concentraciones de NaCl donde se muestra el crecimiento positivo (+) o negativo (-) en los diferentes gradientes

No. Muestra	ID. Muestra	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
1	5bD2	+	+	+	+
2	4aD5	+	+	+	+
3	5cD5	+	+	+	+
4	4cD43	+	+	+	-
9	5cD41	+	+	-	-
10	4bD21	+	+	-	-
11	4cD6	+	+	+	+
12	2bD5	+	+	+	+

7.3 Análisis bioquímicos

Los análisis bioquímicos realizados a las ocho cepas confirmadas de *Halomonas* spp., por rRNA 16S, arrojaron resultados contundentes en cuanto a su tipo de metabolismo aeróbico ya que todas las cepas analizadas fueron catalasa y oxidasa positivas (Cuadro 4). Todas las cepas analizadas resultaron positivas a la prueba de movilidad (MIO) lo cual es evidencia de la presencia de estructuras flajelares de locomoción en las cepas analizadas.

Cuadro 4. Resultados de los análisis bioquímicos para las ocho cepas confirmadas de *Halomonas* spp.

Prueba	Muestra							
	1	2	3	4	9	10	11	12
MIO	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-
ORN	-	-	-	-	-	-	-	-
V.P.	-	-	-	-	-	-	+	+
R.M.	-	-	-	-	+	-	+	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-
Krigel	-	-	-	-	Glu-Lac		Glu-Lac	
P. gas	+	+	+	+	+	+	+	+
OXI	+	+	+	+	+	+	+	+
CAT	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	-	+	-	-	-	-	-	-
MNS	+	+	-	+	-	-	+	+
SUC	+	+	-	+	+	-	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-
MNT	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	-	-	-	-	+	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-
PHO	+	+	+	+	+	+	+	+
BGL	+	+	+	+	+	+	+	+
NPG	-	+	+	+	+	+	+	+
PRO	-	-	-	-	-	+	-	-
BPH	+	-	+	+	+	+	+	+
BXY	+	+	+	-	+	+	+	+

Prueba	Muestra							
	1	2	3	4	9	10	11	12
AAR	-	-	-	-	-	-	-	-
PHC	-	-	-	-	-	-	-	-
GLR	-	-	-	-	-	-	+	-
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+
GGL	+	+	+	+	+	+	+	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+
PHE	+	+	+	+	+	+	+	+
URE	-	-	+	-	+	-	+	+
GLY	-	-	-	-	-	+	-	-
MLO	-	-	+	-	-	+	+	+
TTC	+	+	+	+	+	-	+	+
ARG	+	+	+	+	+	+	+	+
LYS	+	+	+	+	+	+	+	+

7.4 Parámetros fisicoquímicos

Todos los parámetros fisicoquímicos puntuales del sitio de muestreo medidos se sitúan dentro del rango en el que *Halomonas* han sido reportadas, el resultado de las mediciones indican un ambiente propicio para el desarrollo y la proliferación de bacterias este género. En el cuadro 5 se observan los resultados generales de las mediciones realizadas en el muestreo.

7.4.1 Temperatura atmosférica

La temperatura atmosférica en promedio de cinco mediciones fue de 23.3 °C esta medida se mantienen dentro de los intervalos óptimos que requiere *Halomonas* spp.

7.4.2 Temperatura del agua

Las temperaturas registradas en los sitios de muestreo son un factor que propicia y promueve el desarrollo y la proliferación de *Halomonas*, la temperatura mínima registrada en el agua fue 20.8 °C medida en el sitio 1 y la máxima fue de 21.9 °C tomada en el sitio 5, habiendo un intervalo entre la temperatura máxima y mínima de 1.1 °C al momento del muestreo.

El resultado de estas mediciones demuestran que la temperatura de los sitios de muestreo están dentro del rango en el cual esta reportado que *Halomonas* muestra un crecimiento óptimo.

7.4.3 pH

El pH mínimo registrado en el muestreo fue de 9.23 en el sitio 3 y el máximo registrado fue de 9.92 en el sitio 3 habiendo un intervalo de 0.69, lo que denota un ambiente estable con gran cantidad de sales disueltas que propicia y promueve el crecimiento óptimo para las *Halomonas*.

7.4.4 Conductividad (ms/cm)

En cuanto a la conductividad registrada en los sitios de muestreo se registraron en cada uno de ellos valores que excedían la capacidad de medición del instrumento utilizado que es de 10 ms/cm por lo que se prevé que todos los sitios de muestreo tienen una conductividad muy alta, mayor a los 10 ms/cm.

Cuadro 5. Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo.

Sitio de muestreo	pH	Temperatura °C del agua	Temperatura atmosférica (°C)	Conductividad (ms/cm)
1	9.84	20.8	23.3	>10.3
2	9.79	20.7	23.3	>10.2
3	9.54	21.4	23.3	>10.2
4	9.60	21.2	23.3	>10.4
5	9.93	21.9	23.3	>10.1

7.5 Análisis moleculares y bioinformáticos

7.5.1 Identificación del gen rRNA 16S

El gen rRNA 16S fue analizado para la identificación genética de *Halomonas* spp., mediante ensayos de PCR punto final en las 15 cepas bacterianas aisladas que cumplían las características fisiológicas y morfológicas típicas para el género. Los amplicones obtenidos en el ensayo que mostraban el número de bases acordes al tamaño del gen (Figura 6) fueron posteriormente enviados a secuenciar para la obtención de las secuencias nucleotídicas consenso, después fueron

analizadas y comparadas en la base de datos de la NCBI. De las 15 cepas que se analizaron ocho de ellas fueron confirmadas como pertenecientes al género *Halomonas* con un 95% de homologías (Figura 7).

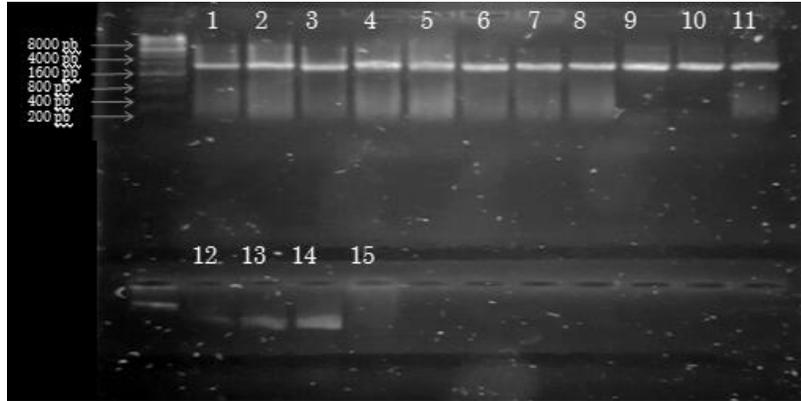


Figura 6. Ensayo PCR punto final para el gen rRNA 16S realizado para la identificación molecular de *Halomonas* spp. de las 15 cepas aisladas inicialmente, que presentaban características típicas del género

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download Get Best Graphics Customize results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Halomonas sp. G29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	830	830	79%	0.0	95%	EF554888.1
Uncultured Halomonas sp. gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: 68d71	824	824	79%	0.0	95%	LC140852.1
Halomonas venusta strain HN18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	824	824	79%	0.0	95%	KU561612.1
Halomonas sp. Exo7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	824	824	79%	0.0	95%	KT238984.1
Halomonas meridiana strain X36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	824	824	79%	0.0	95%	JX122625.1

Figura 7. Comparación de las secuencias obtenidas del gen rRNA 16S con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.

7.5.2 Detección del gen *cnp60*

El análisis molecular de PCR punto final para el gen *cnp60* se realizó en las ocho cepas confirmadas mediante el rRNA 16S, fue realizado como una prueba de identificación molecular adicional del género *Halomonas*. Los amplicones resultado (Figura 8) fueron seleccionados en base al número de pares de bases que se aproximaran al tamaño esperado del gen de 800 pb, éstos fueron enviados a secuenciar, y la secuencia nucleotídica consenso fue analizada y comparada en la base de datos de la NCBI. Solo tres de las ocho cepas identificadas anteriormente por el gen rRNA 16S resultaron tener una homología significativa de 100% de cobertura (546 pb) con 99% de

homología del gen *cnp60* con varias especies de *Halomonas* específicamente con *Halomonas* sp. N3- 2A reportadas en la base de datos del NCBI (Figura 9).

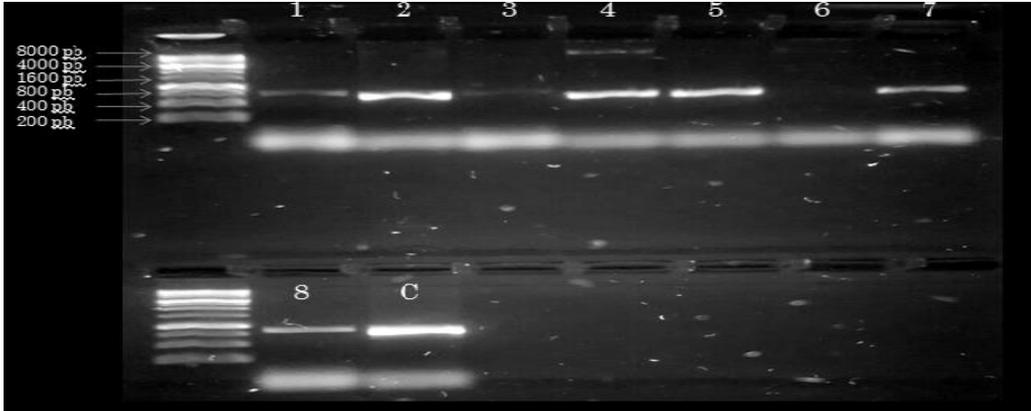


Figura 8. Ensayo de PCR punto final para la identificación del gen *cnp60* de *Halomonas* spp.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance from results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Halomonas sp. N3-2A genome	968	968	100%	0.0	99%	CP022286.1
Halomonas campaniensis strain LS21, complete genome	968	968	100%	0.0	99%	CP007757.1
Halomonas sp. GT, complete genome	841	841	100%	0.0	95%	CP020562.1
Halomonas sp. GFAJ-1 chromosome, complete genome	669	669	100%	0.0	89%	CP016490.1
Halomonas sp. 'Soap Lake #6' chromosome, complete genome	652	652	100%	0.0	88%	CP020469.1
Halomonas sp. 'Soap Lake #7', complete genome	652	652	100%	0.0	88%	CP019915.1
Halomonas sp. KO116, complete genome	641	641	100%	5e-180	88%	CP011052.1
Halomonas ventosae strain NRS2HaP1 genome	616	616	100%	3e-172	87%	CP022737.1
Halomonas sp. R57-5 genome assembly HalomonasR57-5, chromosome :1	616	616	100%	3e-172	87%	LN813019.1

Figura 9. Comparación de las secuencias obtenidas del gen *cnp60* con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.

7.5.3 Análisis y detección del gen *ectD*

7.5.4 Diseño de primers para *ectD*

El gen *ectD* de 980 pb (Lei Cai et al. 2011) fue dividido en tres partes para realizar el diseño de los primers y así obtener amplicones de menor tamaño con la finalidad de que la secuenciación de dichos amplicones fuera de una calidad mayor. El gen fue dividido en tres secciones para cada par de primers (Novo 1, 2 y 3), estos primers se diseñaron basados en el genoma de *Halomonas* sp.

TD01 (Figura 10) que se encuentra en la base de datos del NCBI con el número de acceso EGP18127. Los primers se diseñaron utilizando el programa bioinformático Geneious 7.0.1.

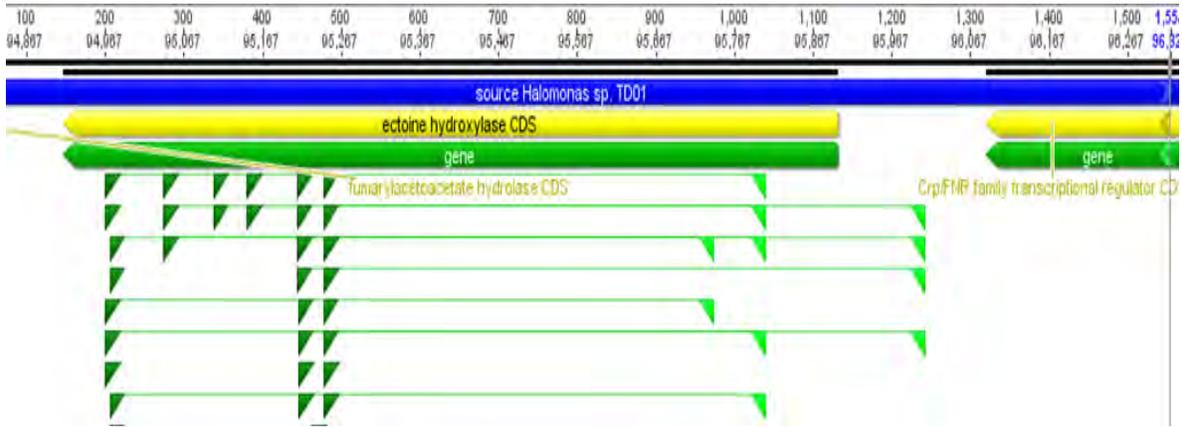


Figura 10. Diseño de primers para el gen *ectD* de *Halomonas* spp., basados en el genoma completo de *Halomonas* sp. TD01 en la base de datos del NCBI

7.5.5 Detección del gen *ectD*

Posteriormente al diseño de los primers, se realizaron ensayos de PCR punto final de cada par de primers en cada una de las ocho cepas confirmadas como *Halomonas* spp., para detectar si el gen *ectD* estaba presente. La amplificación de la primera y segunda sección del gen, utilizando los primer Nov1 y Nov2 tuvo resultados positivos en las muestras No. 1, 2, 3 y 9 (Figura 11), en las cuales se detectaron fragmentos con un número de pb similar al peso esperado del fragmento. Estos amplificados posteriormente se enviaron a secuenciación para obtener la secuencia nucleotídica, una vez obtenida fue analizada y comparada en la base de datos de la NCBI. Las secuencias de las cuatro muestras resultaron tener una similitud de 85-92% con una cobertura de 80-85% en la alineación con diferentes especies de *Halomonas* reportadas en la base de datos de la NCBI.

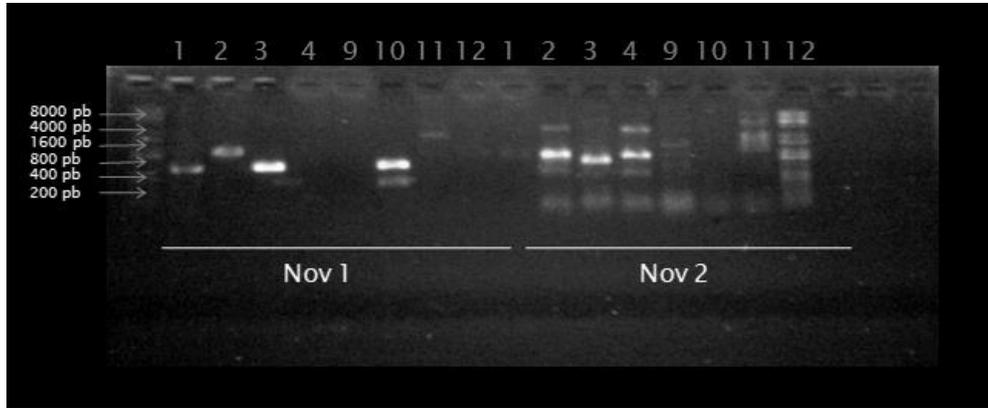


Figura 11. Electroforesis del ensayo de PCR punto final mostrando las amplificaciones de la primera y segunda sección del gen *ectD* realizada con los primer Nov1 (629 pb) y Nov2 (763 pb). El número de identificación de cada muestra se observa en la parte superior de cada carril.

La amplificación de la tercera sección del gen *ectD* utilizando el primer Nov 3 en las ocho muestras confirmadas como *Halomonas* spp., tuvo resultados positivos en las muestras No. 1, 2, 3,4, 9, 10 y 11 (Figura 12) en las cuales se logró detectar fragmentos con un número de pb similar al peso esperado del fragmento de la tercera región del gen *ectD*. Los fragmentos amplificados fueron enviados a secuenciación para obtener la secuencia nucleotídica, después las secuencias se analizaron y compararon con las reportadas en la base de datos de la NCBI. Los resultados del análisis de las secuencias de estas muestras tuvieron una cobertura de 72-87% y una identidad de 75-91% (Figura 13) en los alineamientos con diferentes especies previamente reportadas de *Halomonas* en la base de datos de la NCBI.

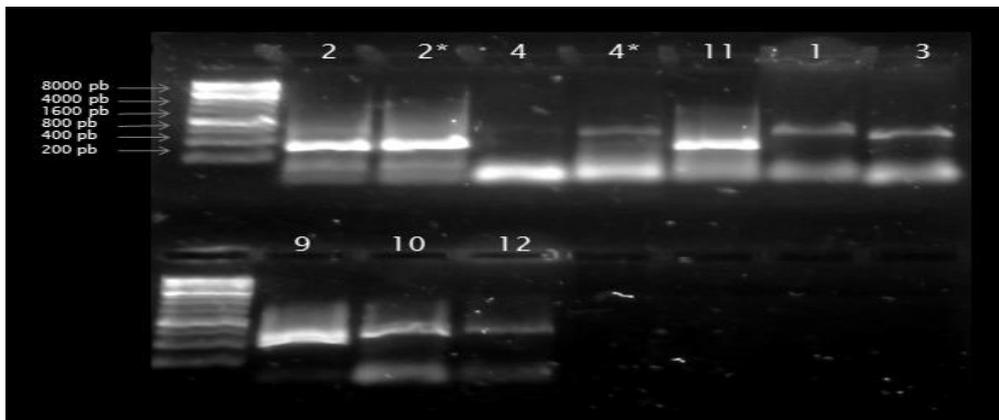


Figura 12. Electroforesis del ensayo de PCR punto final mostrando las amplificaciones de la tercera sección del gen *ectD* de 812 pb realizada con los primer Nov 3. El número de identificación de cada muestra se observa en la parte superior de cada carril.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments: [Download] [Graphics] [Distance tree of results]

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Halomonas sp. KO116 complete genome	134	134	51%	2e-27	70%	CP011052
Halomonas sp. HL-93 genome assembly, chromosome 1	131	131	52%	3e-26	70%	LT593974
Halomonas sp. R57-5 genome assembly HalomonasR57-5, chromosome 1	109	109	59%	9e-20	68%	LN813019

Figura 13. Comparación de las secuencias obtenidas del gen *ectD* con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.

7.5.6 Alineación de secuencias de *ectD*

Las tres secuencias obtenidas con los primers diseñados para el gen *ectD* basados en el genoma de *Halomonas* sp. TD01 fueron alineadas con la secuencia de referencia para comparar el número de secuencias homólogas y el porcentaje de similitud entre ambas secuencias. De las 996 pb de la secuencia de referencia de *Halomonas* sp. TD01, 486 pb (50.1%), de las secuencias amplificadas por los tres pares de primers que se diseñaron mostraron una homología idéntica a la secuencia de referencia (Figura 14).

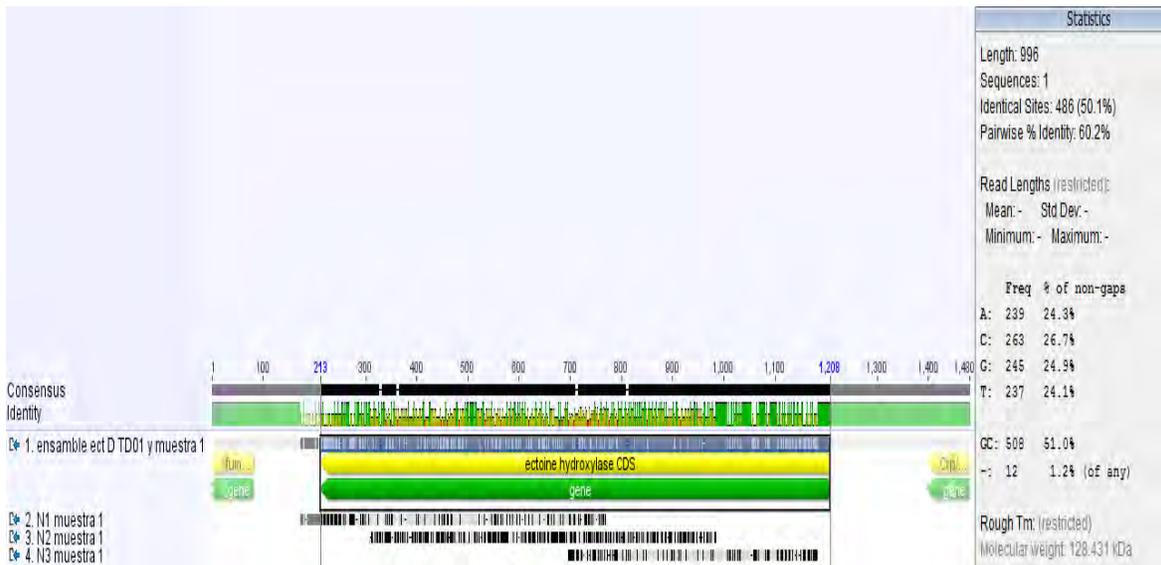


Figura 14. Alineamiento de secuencias obtenidas del gen *ectD* de la muestra No.1 de *Halomonas* spp., comparadas con el gen *ectD* de *Halomonas* sp. TD01

7.5.7 Identificación del dominio conservado de *ectD*

De la secuencia total obtenida del gen *ectD* de *Halomonas* spp., se realizó una traducción nucleótido-aminoácido. Una vez obtenida la traducción de la secuencia se inició la búsqueda del dominio conservado (HXaaD100aaH), reportado anteriormente para diferentes especies del género *Halomonas*. El dominio conservado para *ectD* fue detectado en la cepa de la muestra 1 en la primera región (Nov1) del gen en *Halomonas* spp., en la posición: H Histidina 49, Xaa, D Aspartato 51 y H Histidina 149 (Figura 15).

```
*GKYRNYEVFLYGDFRLHYPAPPEEAMISTLFGHPHG*RSCSQDD*HDKHVDTQIGGKIGA*  
SMQRVEANCNSPPAFPFALMPGFPTSVATGSGHGTPTSCALGQRFVLSSGVSPQRGTYS  
ECESGISTTVR*THGFGSEWRSTAGMHM*HLSFGCIVSNQMPVNALQRTDYSHAGLGP*R  
RAEVI*RGRSG*EGPRIGVRGGVGVAKSFVG
```

Figura 15. Traducción nucleótido aminoácido de la primera sección (Nov1) del gen *ectD* de *Halomonas* spp., muestra 1, señalando los aminoácidos que conforman el dominio conservado del gen en la ectoína hidroxilasa en *Halomonas* spp., (Los * que se presentan en la secuencia son secuencias de paro)

7.5.8 Análisis y detección del gen *eutD*

7.5.9 Diseño de primers para *eutD*

Para el gen *eutD* de aproximadamente 1200 pb se diseñaron tres pares de primers, uno de ellos (*eutD*-Ext) amplificaba a la totalidad del gen, los dos restantes lo dividieron en dos secciones (*eutD*-Int1 y *eutD*-Int2) (Figura 16) de aproximadamente 750 pb cada uno. El diseño de estos primers se basó en el genoma completo de *Halomonas* sp. TD01 de la base de datos de la NCBI con número de acceso [EGP21610.1](#). Los primers se diseñaron utilizando el programa bioinformático Geneious 7.0.1.

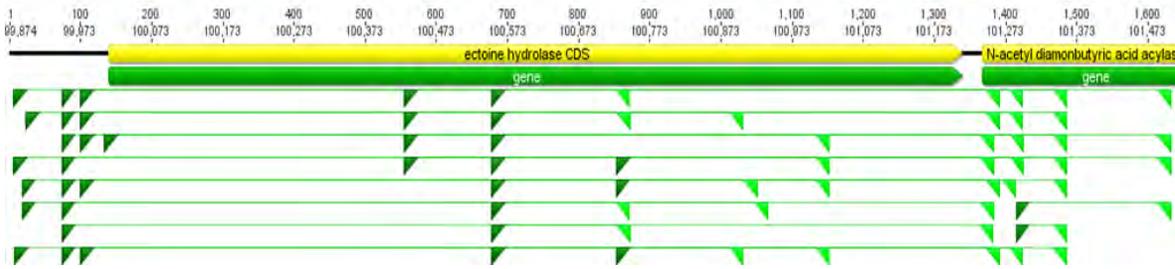


Figura 16. Diseño de primers del gen *ectD* para *Halomonas* spp., basados en el genoma completo de *Halomonas* sp. TD01 de la base de datos del NCBI

7.5.10 Detección del gen *ectD*

Posteriormente al diseño de los primers fueron realizados ensayos de PCR punto final en tres de las ocho muestras. La muestra número 1, 3 y 9 fueron designadas para realizar las pruebas de detección del gen *ectD*, debido a que en estas tres muestras se detectó con anterioridad las tres secciones del gen *ectD* lo que indicaba con toda seguridad que éste se encontraba presente en estas tres cepas. Los tres primers para *ectD* fueron probados a diferentes temperaturas para encontrar la óptima de alineación, la cual demostró tener un amplio rango de 52° a 61° C donde se notaban amplificación. Las muestras número 1, 3 y 9 sometidas al ensayo de PCR arrojaron resultados positivos en cuanto a la presencia del gen *ectD*.

Las amplificaciones del gen *ectD* fueron enviadas a secuenciación para obtener la secuencia nucleotídica. Una vez obtenidas las secuencias éstas se analizaron y compararon con las reportadas en la base de datos de la NCBI mediante un alineamiento con el algoritmo de búsqueda de homologías BLAST ID. Los resultados del análisis de las secuencias de estas muestras tuvieron una cobertura que variaba de 95-99% y una identidad de 83-99% en los alineamientos con diferentes especies previamente reportadas del género *Halomonas* en la base de datos de la NCBI ver (Figura 17). El análisis de estos resultados confirmaba que nuestras secuencias obtenidas de los amplificadores del gen *ectD* de las tres muestras de *Halomonas* spp., que fueron analizadas tienen una gran similitud con secuencias de *ectD* de otras especies del género, además de demostrar que nuestras cepas de *Halomonas* spp., tienen este gen que codifica a la ectoína hidrolasa que tiene un importante papel en el metabolismo catabólico de la ectoína.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Halomonas campaniensis strain LS21, complete genome	1657	1657	99%	0.0	99%	CP007757.1
Halomonas sp. R57-5 genome assembly HalomonasR57-5, chromosome 1	824	824	97%	0.0	83%	LN813019.1
Halomonas sp. KO116, complete genome	795	795	97%	0.0	83%	CP011052.1
Sinorhizobium meliloti GR4 plasmid pRmeGR4d, complete sequence	82.4	82.4	16%	2e-11	76%	CP003937.2

Figura 17. Comparación de las secuencias obtenidas del gen *eutD* con la base de datos del NCBI utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST ID.

7.5.11 Alineación de secuencias de *eutD*

Las secuencias obtenidas con los primers que se diseñaron para la amplificación del gen *eutD* basados en el genoma de *Halomonas* TD01 de la base de datos de la NCBI fueron alineadas con la secuencia de referencia para poder identificar el número de secuencias homólogas y el porcentaje de similitud entre ambas secuencias. De las 1200 pb que conforman el gen *eutD* de la secuencia de referencia de *Halomonas* sp. TD01, 778 pb (89.1%), de las secuencias amplificadas por los distintos pares de primers que se diseñaron mostraron una homología idéntica a la secuencia de referencia (Figura 18).

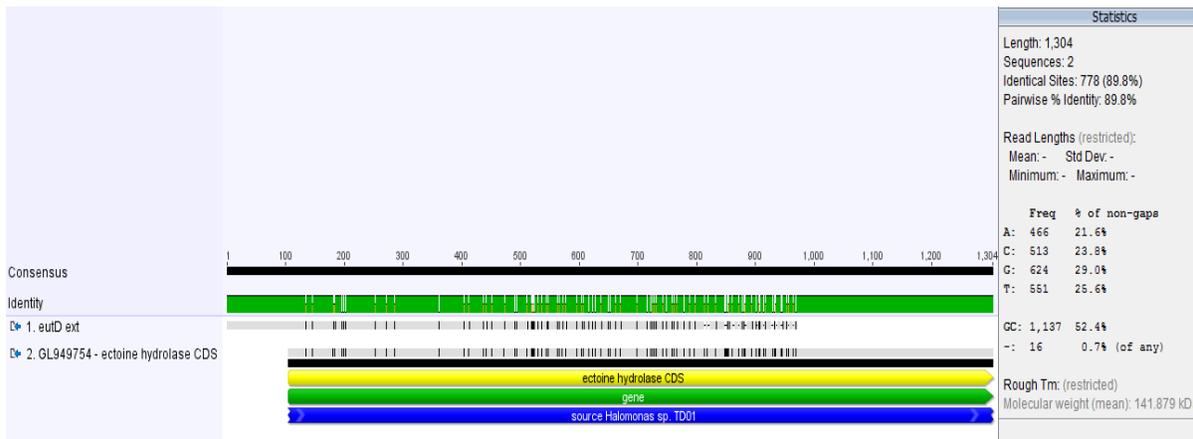


Figura 18. Alineamiento de la secuencia del primer fragmento concenso del gen *eutD* de *Halomonas* spp., (1) con la secuencia de referencia de *Halomonas* sp. TD01 (2).

7.5.12 Identificación del dominio conservado de *eutD*

Una vez obtenida la secuencia total del gen *eutD* de *Halomonas* spp., se realizó una traducción nucleótido-aminoácido. Después de realizar la traducción de la secuencia se inició la búsqueda del dominio conservado característico para *eutD* (His-Glu-Xaa-Xaa-His), reportado anteriormente para diferentes especies del género *Halomonas* y otros géneros relacionados. El dominio conservado para el gen *eutD* se detectó en la cepa de la muestra 1 en la primera región (*eutD*-Int1) del gen en *Halomonas* spp., en la posición: H Histidina 279, E Acido glutámico 280, Xaa, Xaa y H Histidina 283 (Figura 19).

```
MFNRQISTISLCCVPKNTCAASRVVALDTPAFRRRASLAKWRVVPKGKCAQQRLYLATSQVWQDN  
RRQTPCHSRQIPRCRRGKFTPAYFLAARVQ*LPKYACAYLQQFLLPHAYKLFLAAT*SPGTNSRV  
RWHP*NAHGEAHVKGFDRL*QRSSYPSPYPHRYANRGRA*SIGQDTPLDAYPDFEHSNPDSR*Y  
YRGLSSRCAARRWHPYGGQTIQVRLQGPPIHIDEHKTNRRSRSTTPCWRGH*QSARQCHGQPFLLH  
APSTSD*HTLHA*KAGKPQSSGNSPSKITKNQRHLL*VRYAGPQDRPGHPRRAP*
```

Figura 19. . Secuencia de aminoácidos traducida de la primera región (*eutD*-Int1) donde se muestra el dominio conservado para gen *eutD* (Los * que se presentan en la secuencia son secuencias de paro)

8. DISCUSIÓN

A partir de 12 aislados bacterianos obtenidos de las 20 muestras de agua recolectadas en la salinera “Las Chiquitas” en el Valle de Zapotitlan Salinas en el Estado de Puebla, se obtuvieron 15 colonias que presentaban características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas similares a *Halomonas* reportadas en estudios previos (Ventosa et al., 1998; Zanjirband et al., 2008; Widderich et al., 2014). Sin embargo, solamente ocho de las 15 colonias pudieron confirmarse como pertenecientes al género *Halomonas* spp., mediante la identificación genética y molecular que se realizó llevando a cabo la amplificación y secuenciación del gen rRNA 16S y complementariamente el gen *cnp60*. Teniendo identificadas las cepas de *Halomonas* spp., se realizaron ensayos de PCR para lograr la detección del gen *ectD* y *eutD* en el genoma de las bacterias.

8.1 Análisis fisicoquímicos, bioquímicos morfológicos y fisiológicos

La temperatura registrada para cada uno de los sitios de muestreo se mantenía en el rango de 20.8 °C mínima y 21.9 °C máxima. Estas mediciones se encuentran dentro del rango reportado para el género *Halomonas* que es de 10.0–43.0 °C además la temperatura óptima reportada para el género es de 25 °C (Zanjirband et al., 2008). Las mediciones de pH realizadas en los sitios de muestreo se mantuvieron en rangos óptimos de 9-10. Estos rangos concuerdan con lo reportado en el estudio de Zanjirband et al., (2008) donde se reporta un rango de pH para el crecimiento óptimo de *Halomonas* entre 7.0-10.0.

El aislamiento exitoso de *Halomonas* en el medio nutritivo selectivo adicionado con NaCl al 5% demostrando que esta técnica de cultivo es efectiva para lograr el crecimiento de las *Halomonas* y excluir muchos otros organismos con poco o ninguna tolerancia a esta concentración de NaCl, de este modo Zanjirband et al., (2008) obtuvo aislados de 45 colonias de *Halomonas* en agar y caldo nutritivo modificándolo con la adición de NaCl a una concentración final de 5% dejándolas incubar a 25°C durante 24 horas. En su estudio y en otros como el de Ventosa et al., (1998) indican que esa concentración es la óptima para el crecimiento de organismos de este género.

En cuanto a la prueba fisiológica de crecimiento, Zanjirband et al., (2008) llegan a la conclusión de que a una concentración de 20% de NaCl, todos sus aislados de *Halomonas* mostraban un crecimiento mínimo, proponiendo que el límite fisiológico de tolerancia para el género es de 20%

NaCl, lo que concuerda con nuestros resultados de las prueba fisiológica de crecimiento, ya que, tres de las ocho cepas sometidas en este ensayo no presentaron crecimiento alguno en el medio con concentración al 20% de NaCl y las cinco restantes presentaban un crecimiento mínimo a las 24 horas de uncubación a 25°C.

Los resultados de las pruebas bioquímicas además de complementar la caracterización de *Halomonas* spp., también son decisivos en cuanto a la identificación del género ya que las pruebas de catalasa, lisina descarboxilasa y citocromo oxidasa son utilizadas en estudios previos como método de identificación debido al metabolismo característico aeróbico que presenta el género *Halomonas* (Zanjirband et al., 2008). El metabolismo de carácter aeróbico que presentan nuestras *Halomonas* spp., Elucidado del resultado de las pruebas bioquímicas de Catalasa y Oxidasa positivas es de carácter fundamental en el metabolismo de las ectoínas, debido a que, la reacción enzimática catalizada por *ectD* depende estrictamente de un centro mononuclear de hierro ferroso que promueve la descarboxilación oxidativa dependiente de O₂ de 2-oxoglutarato, una secuencia de eventos acoplada con una oxidación de dos electrones del sustrato ectoína. Como se esperaba de la reacción dependiente de oxígeno de la enzima ectoína hidroxilasa nunca está presente en genomas de anaerobios obligados, aunque no está presente universalmente en especies aeróbicas o facultativas (Widderich et al., 2014) estos mismos autores reportan también la utilización de la prueba con tinción de Gram que fue otro de los criterios tomados para la identificación preliminar de *Halomonas* spp., que al igual que en nuestros resultados, ellos mostraron la típica forma de bacilos Gram negativos característicos de género.

8.2 Análisis biomoleculares y bioinformáticos

8.2.1 Gen *cnp60*

Los resultados del análisis molecular por PCR punto final para el gen *cnp60* realizado en las ocho cepas de *Halomonas* spp., que previamente habían sido identificadas mediante el gen rRNA 16S lograron confirmar que tres de estas cepas tienen un gen homólogo a *cnp60* característico, utilizable para su identificación. El gen *groEL* es un homólogo del gen *cnp60* que caracteriza a muchas especies de bacterias (Gould et al., 2007). Los homólogos GroEL y GroES existen en casi todas las bacterias para las que están disponibles secuencias completas del genoma, con la excepción de algunos de los micoplasmas.

Debido a estas características que conserva el gen *groEL* (*cnp60*) fue utilizado como gen de identificación filogenético para tener una mayor certeza de que las bacterias aisladas pertenecían al género de *Halomonas*. Estudios sobre la idoneidad de un fragmento de una región conservada del gen *groEL* para análisis filogenéticos e identificación de especies de los géneros: *Bifidobacterium*, *Helicobacter*, *Rickettsia*, *Staphylococcus*, *Macrococcus* y *Vibrio*, entre otros, han sido publicados. Estos estudios han demostrado que, a pesar de la naturaleza conservada del gen *groEL*, el nivel de variación de secuencia *groEL* entre especies es mayor que el del gen 16S rRNA, proporcionando una mejor resolución para la clasificación de especies (Kärenlampi et al., 2004).

En concreto, sólo se confirmaron cuatro cepas de *Halomonas* usando ambas regiones, es probable que las otras no se lograra que *cnp60* coincidiera con *Halomonas* debido a la calidad de la secuencias, por lo cual en algunos casos el BLAST indica otras especies, o bien que fueran especies cuyo genoma completo no ha sido secuenciado, por lo tanto, no se encuentra en la base de datos y no se encuentra identidad con lo reportado en el GenBank.

8.2.2 Gen *ectD*

La detección del gen *ectD* que codifica para la enzima ectoína hidroxilasa en *Halomonas* spp., confirma invariablemente la presencia del gen *ectC* y el resto del operón *ectABC*, esta afirmación se fundamenta en lo establecido por Bursy et al., (2007), en la que se comprueba basado en la detección del gen *ectD* en *Virgibasillus salexigenes*, que estos microorganismos también poseían un gen *ectC*, un resultado que se espera del hecho de que la hidroxiectoína se sintetiza directamente a partir de la molécula precursora ectoína. La Ectoína hidroxilasa que cataliza la conversión de la ectoína en hidroxiectoína ha sido detectada en varias bacterias halófilas (Bursy et al., 2007; García-Esteba et al., 2006). La amplificación del gen *ectD* mediante PCR punto final que llevada a cabo para aclarar si el gen *ectD* estaba presente en *Halomonas* spp., y asumimos que un gen de ectoína hidroxilasa homóloga a la de *Halomonas* sp. TD01 (Lei Cai et al., 2011) existía en esta cepa para diseñar tres pares de cebadores para las amplificaciones por PCR, de las cuales se obtuvieron fragmentos para cada par de primers (Nov1, Nov2, Nov3) de 629 pb, 763 pb y 812 pb respectivamente. La secuencia de DNA obtenida de cada fragmento en el que dividimos el gen *ectD* de *Halomonas* spp., mostró un porcentaje de 70% identidad, en promedio, con el gen *ectD* de *Halomonas* sp. KO116, *Halomonas* sp. HL-93 y *Halomonas* spp. R5-57 (Figura 13). La alineación comparativa de nuestras secuencias de *ectD* de *Halomonas* spp., contra la secuencia

de este mismo gen pero de *Halomonas* sp. TD01 mostró un 60% de identidad con 643 bases idénticas de 996 pb que conforman a *ectD* en *Halomonas* sp. TD01. Estos datos confirmaron la presencia del gen *ectD* en *Halomonas* spp., por lo que la conversión de ectoína debería ser la vía más importante para la síntesis de hidroxiectoína confirmando que el operón completo *ectABCD* está presente en *Halomonas* spp.

Estudios previos han indicado que la capacidad de producir ectoína e hidroxiectoína está ampliamente distribuida en el mundo microbiano, pero está ausente en los eucariotas. (Reshetnikov et al., 2011).

Las ectoínas hidroxilasas están estrechamente relacionadas en su secuencia de aminoácidos y pueden distinguirse de otros miembros de las enzimas dependientes de hierro (II) y 2-oxoglutarato que no contienen hemo a través de la presencia de una secuencia distintiva altamente conservada (Widderich, et al., 2014). La distribución taxonómica de las proteínas EctC y EctD revela putativos productores de ectoína en bacterias y arquea en 17 grupos diferentes. Quince de estos *phyla* están taxonómicamente asociados con el dominio de las Bacterias y dos con el dominio de las Archaea. La distribución taxonómica de los supuestos productores de hidroxiectoína fue más restringida ya que los genes de la ectoína hidroxilasa *ectD* se encuentran solo en nueve *phyla* (Widderich, et al., 2014).

Típicamente para este tipo de enzimas, hay dos láminas que forman la porción principal de una cavidad profunda que contiene el Fe^{2+} catalítico, el sitio de unión para el 2-oxoglutarato del cosustrato y al menos parte del sitio de unión al sustrato. En la mayoría de las enzimas de este grupo, el ion Fe^{2+} está coordinado por dos histidinas imidazoles y el carboxilato de un aspartato (Clifton et al., 2006). La secuencia consenso de EctD no solo contiene residuos implicados en la unión de hierro, 2-oxoglutarato y ectoína/hidroxiectoína, sino que también cumple una importante función arquitectónica para la estructuración del cilindro de cupina (Höppner et al., 2014). La estructura cristalina de alta resolución de la enzima EctD de *V. salexigens* revela un pliegue de proteína que se observa comúnmente en miembros de la superfamilia de dioxigenasa dependiente de hierro (II) y no-hemo 2-oxoglutarato, la llamada rollo o doblez de cupina. El hierro catalíticamente crítico está coordinado por las cadenas laterales de un motivo HXaaD100XaaH conservado (Hangasky et al., 2013).

Realizando la traducción nucleótido-aminoácido de la secuencia consenso del gen *ectD* de *Halomonas* spp., se obtuvo una secuencia de aproximadamente 332 aminoácidos en un marco de lectura abierto, en el cual se encontró el dominio conservado previamente reportado por Hangasky et al., (2013). El dominio conservado para *ectD* fue detectado en la primera región (Nov1) del gen en *Halomonas* spp., en la posición: H Histidina 49, Xaa, D Aspartato 51, 100Xaa y H Histidina 149 que conforman las especificaciones exactas de la configuración y posición de los aminoácidos que forman el sitio activo de unión a hierro de la ectoína hidroxilasa de *Halomonas* spp. En estudios previos agregando sal de hierro al tampón utilizado para la cristalización de la proteína EctD, se ha podido confirmar que la densidad electrónica experimental indica claramente un ion metálico unido en el centro activo de la enzima que posteriormente se refinó como un ion de hierro (Reuter et al., 2010). Se ha informado previamente que la enzima EctD de *V. salexigens* cuando se produce heterológicamente en *E. coli* contiene un ion férrico y esta molécula de hierro aparentemente se mantuvo en el proceso de evolución de la proteína EctD. El ion metálico está coordinado por los grupos funcionales de His-146, Asp-148 y His-248 de la proteína EctD y tres moléculas de agua en una geometría octaédrica casi perfecta. Los tres residuos (His-146, Asp-148, His-248) que forman este sitio de unión al hierro sobresalen en una cavidad profunda en la estructura EctD que alberga el sitio activo de la enzima (Reuter et al., 2010).

Se ha utilizado la secuencia de aminoácidos de la ectoína sintasa (*ectC*) como una herramienta de diagnóstico para identificar potenciales productores de ectoína a través de búsquedas en bases de datos, identificamos 197 especies microbianas como putativos productores de ectoína. De éstos, también se encontraron 67 especies que contenían ectoína hidroxilasas de tipo *ectD*. Cuatro genomas microbianos llevaban dos copias de genes *ectD*: *Rhodococcus* sp. RHA1, *Rhodococcus opacus* B4, *Marinobacter aquaeolei* VT8 y *C. salexigens* cada uno codifica dos proteínas de tipo *ectD* (Reuter et al., 2010).

Los microorganismos que poseen el gen *ectD* son bastante diversos con respecto a su afiliación taxonómica, fisiología, estilos de vida y hábitat. Existen patógenos bien conocidos entre este grupo de bacterias como: *Norcadia farcina*, *Mycobacterium abscessus* y varias especies de *Bordetella*. Pero también hay representantes de microorganismos biotecnológicamente importantes como *S. coelicolor* y *Streptomyces griseus*, que se emplean para la producción de antibióticos. Se representan también microorganismos que viven en hábitats extremos con respecto a la temperatura de crecimiento (por ejemplo, el *Geobacillus* sp. Y412MC10 termófilo y el

Sphingopyxis alaskensis psicrófilo RB2256) y la tolerancia al pH (por ejemplo, *Acidiphilum cryptum* JF5 y *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1) (Reuter et al., 2010). Un número considerable de microorganismos que poseen *ectD* habitan en ambientes de alta salinidad o hábitats marinos. Un representante de este grupo es la cosmopolita bacteria marina hidrocarbonoclástica *Alcanivorax borkumensis* SK2, cuya capacidad de sintetizar ectoína y 5-hidroxiectoína es clave para su capacidad de colonizar hábitats de alta salinidad (Reuter et al., 2010). Al igual los microorganismos antes mencionados el género *Halomonas* dependen de la capacidad protectora que confieren la ectoína y la hidroxiectoína para poder sobrevivir en este tipo de ambientes extremos de alta salinidad y temperatura.

Comparando la posición del dominio conservado de *ectD* en *Halomonas* sp. TD01 cuya posición es H Histidina 175, Xaa, D Aspartato 177 y H Histidina 275, (Figura 20) el dominio de *Halomonas* spp., cumple con el orden exacto de la distribución y posición de los aminoácidos que conforman el sitio activo de enlace a hierro que caracteriza al gen *ectD* (Cuadro 6).

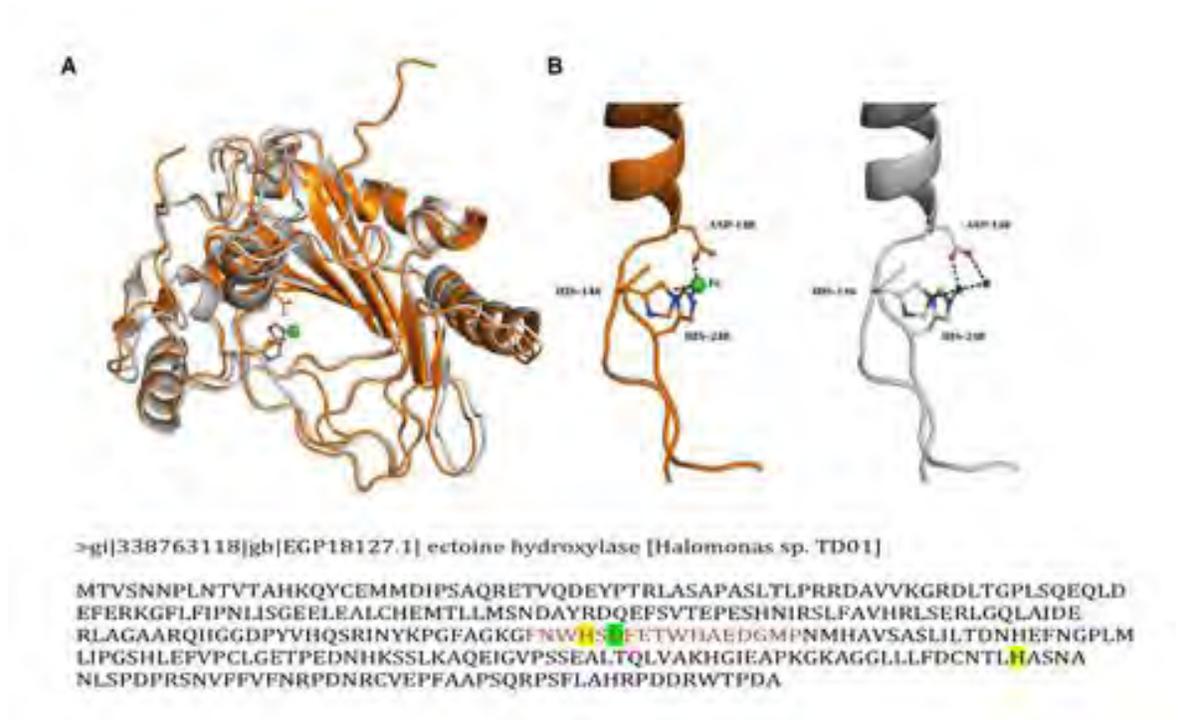


Figura 20. Localización del dominio conservado de *Halomonas* sp. TD01 dentro de una molécula de ectoína hidroxilasa reportado en la base de datos de la NCBI (Lei Cai et al., 2011).

Cuadro 6. Comparación de los sitios de localización del dominio (HXaaDX₁₀₀aaH) dentro del gen *ectD* de ectoína hidroxilasa entre organismos previamente reportados (*V. salexigenes* y *Halomonas* sp. TD01) con *Halomonas* spp., de este estudio.

Posición	<i>Virgibacillus salexigenes</i>	<i>Halomonas</i> sp. TD01	<i>Halomonas</i> spp.
Dominio HXaaDX ₁₀₀ aaH			
HIS (H)	146	175	49
ASP (D)	148	177	51
HIS (H)	246	275	149

8.2.3 Gen *eutD*

El gen *eutD* que codifica para la enzima ectoína hidrolasa fue detectado en *Halomonas* spp., aisladas del Valle de Zapotitlan Salinas, Puebla mediante ensayos de PCR utilizando los primers diseñados con base en el genoma de *Halomonas* sp. TD01.

Además, de la protección contra el estrés, una función secundaria importante de los solutos compatibles es servir como fuentes de carbono, energía o nitrógeno, ya sea como reservas intracélulares o, una vez que se libera al ambiente tras la muerte celular o shock hipoosmótico a otros microorganismos. Además, algunas (pero no todas) las bacterias capaces de producir un soluto compatible también pueden metabolizarlo. En cualquier caso, la presencia de vías catabólicas puede considerarse una ventaja evolutiva, además de su utilidad para utilizar solutos compatibles como nutrientes, pueden contribuir a ajustar con precisión el conjunto de solutos intracélulares en respuesta a la osmolaridad fluctuante. La bacteria halófila *Halomonas* spp., puede usar ectoínas como fuentes tanto osmóticas como de carbono y energía. Esta situación es similar a la encontrada en el simbiote alfalfa *S. meliloti* (Jebbar et. al., 2005) y *C. salexigenes* (Vargas et. al., 2006) donde el catabolismo de betaína y ectoína se ha estudiado con más detalle. Estos estudios realizados para elucidar las rutas catabólicas de la ectoína y su identificación por parte de Jebbar et al., (2005) quien descubrió un operón inducido por ectoína implicado en la captación y el catabolismo de ectoína en *S. meliloti* (*ehuABDC-eutABCD*). El gen *doeA* de *Halomonas elongata* es un homólogo de *eutD* de *S. meliloti* y codifica una proteína 399 aa (44.9 kDa, pl 5.0) que pertenece a la familia X-pro dipeptidasa-M24 (Schwibbert et al., 2011).

Sobre la base de las homologías de secuencia, entre nuestras *Halomonas* spp., *Halomonas* sp. TD01, *Halomonas* sp., R57-5 y *Halomonas campanensis*, se deduce que el gen *eutD* codifica enzimas con funciones putativas en el metabolismo catabólico de la ectoína de *Halomonas* spp., Los resultados del análisis de las secuencias tuvieron una cobertura que variaba de 95-99% y una identidad de 83-99% en los alineamientos con las especies mencionadas y previamente reportadas del género *Halomonas*, porcentaje que sería suficiente para ser incluidas como miembros del mismo. El análisis de estos resultados confirman que nuestras secuencias obtenidas de los amplificadas del gen *eutD* de tres de las ocho muestras de *Halomonas* spp., que fueron analizadas, tienen una indudable similitud con secuencias de *eutD* de otras especies del género, además de demostrar, que nuestras cepas de *Halomonas* spp., poseen este importante gen que codifica la proteína ectoína hidrolasa, la cual tiene un papel fundamental en el metabolismo catabólico de la ectoína, pudiendo esta ser utilizada como fuente de carbono para mediar procesos metabólicos en *Halomonas* spp. El gen *eutABCD* fue reportado previamente en los estudios de Lei Cai et al., (2011) en *Halomonas* sp. TD01, en los cuales se reporta un sistema metabólico para la degradación de la ectoína mediado por este gen. Los primers utilizados para la amplificación del gen *eutD* de *Halomonas* spp., que fueron diseñados en base al genoma de *Halomonas* sp. TD01 amplificaron regiones homologas a las reportadas por Lei Cai et al., (2011) los cuales detectan el gen *eutD* de 1200pb (400aa) que codifican para ectoína hidrolasa perteneciente a la familia X-pro dipeptidasas donde los autores lo clasifican con el número de acceso [EGP21610](#) del Genebank.

La traducción de la secuencia nucleotídica realizada para la búsqueda del dominio conservado característico para *eutD* (His-Glu-Xaa-Xaa-His) que ha sido reportado anteriormente para diferentes grupos de bacterias incluido el género *Halomonas* se realizó con el objetivo de detectar el dominio conservado para *eutD* el cual fue localizado en la primera región del gen (*eutD*-Int1) en *Halomonas* spp., en la posición: H Histidina 279, E ácido glutámico 280, Xaa, Xaa y H Histidina 283. La comparación para el análisis de nuestra secuencia consenso de aminoácidos, traducidos de la secuencia nucleotídica del gen *eutD* de *Halomonas* spp., realizada en la base de datos para proteínas de la NCBI, clasifica a la proteína dentro de la familia M24 dependiente de magnesio de las X-pro dipeptidasas concordando con los estudios previos realizados en *H. elongata* (Schwibbert et al., 2011) y en *Halomonas* sp. TD01 (Lei Cai et al., 2011) donde los autores reportan la misma funcionalidad y sitio activo enzimático metalodependiente.

9. CONCLUSIÓN

Se lograron identificar ocho aislados bacterianos presuntamente del género *Halomonas* spp., mediante análisis morfológicos, fisiológicos y bioquímicos para cada una de las cepas colectadas y aisladas del Valle de Zapotitlán Salinas en el Estado de Puebla. Estas ocho cepas fueron confirmadas como especies que pertenecen al género *Halomonas*, lo anterior basado en las pruebas moleculares (PCR) y el análisis de las secuencias parciales de los genes rRNA 16S y *cnp* 60. Aunque se logró la amplificación de los genes *ectD* y *eutD* en cuatro de los ocho aislados, solo la cepa con número de identificación 1, fue seleccionada para continuar con el estudio de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *ectD* y *eutD*, mismas que al ser traducidas *in silico*, en la secuencia de aminoácidos, se evidenció la presencia de los dominios conservados de *ectD* y *eutD*, ambos dominios muestran una arquitectura y homología similar a los dominios estudiados y reportados en otras especies bacterianas. La presencia de estos genes determina que *Halomonas* spp., tiene la capacidad, no solo de sintetizar ectoína e hidroxiectoína, utilizables como solutos compatibles para evitar desecación manteniendo la hidratación y la presión osmótica estable dentro de la bacteria, si no también, es capaz de poder degradar estos solutos del medio para convertirla en una fuente inmediata de carbono. Muy pocas bacterias han sido reportadas como poseedoras de ambos sistemas metabólicos (catabólico y anabólico) para ectoínas. La presencia de ambos genes dan a *Halomonas* spp., una capacidad adaptativa muy útil para el tipo de ambiente en el que habitan estas bacterias, además, el conocimiento de la presencia de organismos que posean este tipo de sistema metabólico en el país, adquiere gran relevancia como un punto de partida para futuros estudios enfocados al desarrollo biotecnológico, en especial para la transfección de estos genes a plantas de importancia comercial para el mejoramiento de la resistencia a factores adversos como lo son los suelos salinos y las altas temperaturas que pueden afectar a los cultivos.

10. LITERATURA CITADA

Amann R. I., Binder B., Chisholm S. W., R. Olsen, Devereux R., Stahl D. A., (1990). Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.

Andersson M. M., Breccia J.D., Hatti-Kaul R., (2000). Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 32: 145–53.

Arahal D. R., Lundwig W., Schleifer K. H., & Ventosa A., (2002). Phylogeny of the family *Halmomonadacea* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 52: 241-249.

Baumann L., Bowditch R. D. & Baumann P., (1983). Description of *Deleya* gen. nov. created to accommodate the marine species *Alcaligenes aestus*, *A. pacificus*, *A. cupidus*, *A. venustus*, and *Pseudomonas marina*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 793–802.

Bolen D. W. and Baskakov I. V., (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.*, 310: 955–963.

Borges N., Ramos A., Raven N. D., Sharp R. J. and Santos H., (2002). Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles*, 6:209–216.

Brandon R., Litzner T., Caton M., Schneegurt A., (2006). Carbon substrate utilization, antibiotic sensitivity and numerical taxonomy of bacterial isolates from the Great salt plains of Oklahoma. *Arch. Microbiol.*, 185: 286-296.

Brown A.D., (1976). Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40:803–846.

Buenger J., Driller H., (2004). Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 17:232–7.

Cai L., Tan D., Aibaidula G., Dong X. R., Chen J. C., Tian W. D., & Chen G. Q., (2011). Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microbial cell factories*, 10(1): 88.

Canales M. M., Hernández D. T., Caballero J. N., Romo A., Durán D. A., Lira R. S., (2006). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Act. Bot. Mex.* No.75.

Casas A., Valiente-Banuet A., (1995). Etnias, recursos genéticos y desarrollo sustentable en zonas áridas de México. *En: Anaya M., Díaz-Calero F. (Eds.) IV curso sobre desertificación y desarrollo sustentable en América Latina y el Caribe. PNUMA / FAO / Colegio de postgraduados. México. pp. 37-56.*

Cheng M.Y., Hartl F.-U., Martin J., Pollock R.A., Kalousek F., Neupert W., Hallberg E.M., Hallberg R.L., Horwich A.L.,(1989). Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 337: 620-625

Clegg J.S., Seitz P., Seitz W., Hazlewood C.F., (1982). Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology* 19: 306–16.

Clifton I. J., McDonough M. A., Ehrismann D., Kershaw N. J., Granatino N., (2006). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related doublestranded beta-helix fold proteins. *J. Inorganic. Biochem.* 100: 644–669.

Coll M., Knof S. H., Ohga Y., Messerschmidt A., Huber R., Moellering H., (1990). Enzymatic mechanism of creatine amidinohydrolase as deduced from crystal structures. *J. Mol. Biol.* 214: 597–610.

Comisión nacional de áreas naturales protegidas. Reserva de la biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Ubicación. <http://tehuacan-cuicatlan.conanp.gob.mx/ubicacion.php> SEMARNAT. Consultado el 26 de agosto de 2015.

Crowe J. H., Carpenter J. F., Crowe L. M., Anchoroguy T. J., (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors?. A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 43: 219–31.

da Costa M. S., Santos H., Galinski E. A., (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea, *In: Advances in biochemical engineering/biotechnology*, T. Scheper (ed.), vol. 61. Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 117-153.

Dobson S. J., Franzmann P. D., (1996). Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al., 1983), *Halomonas* (Vreeland et al., 1980), and *Halovibrio* (Fendrich, 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons, 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriology* 46: 550–558.

Ellis R. J., van der Vies S. M., (1991). Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.

Franzmann P. D., Tindall B. J., (1990). A chemotaxonomic study of members of the family *Halomonadaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 142–147.

Franzmann P. D., Wehmeyer U., Stackebrandt E., (1988). *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class Proteobacteria to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Appl. Microbiol.* 11: 16–19.

Fendrich C., (1988). *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA. *Syst. Appl. Microbiol.* 11: 36–43.

Fourtanier A., Bernerd F., Bouillon C., Marrot L., Moyal D., Seite S., (2006). Protection of skinbiological targets by different types of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 22: 22-2.

Galinski E. A., Pfeiffer H. P., Trüper H. G., (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur. J. Biochem.* 149: 135-139.

Galinski E.A., Trüper H.G., (1994) *Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems*. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 95–108.

Galinski E. A., Stein M., Amendt B., Kinder M., (1997). The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. *Comp. Biochem. Physiol.*; 117A: 357–65.

García-Esteva R., Argandoña M., Reina-Bueno M., Capote N., Iglesias-Guerra F., Nieto J. J., Vargas C., (2006). The *ectD* Gene, Which Is Involved in the Synthesis of the Compatible Solute Hydroxyectoine, Is Essential for Thermoprotection of the Halophilic Bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* ; 188(11): 3774–3784.

Göller K., (1999). Identifizierung und charaterisierung des ectoin-genclusters in *Halomonas elongata*. In *Institut Für Mikrobiolgie Und Biotechnologie*. PhD Thesis. Bonn, Germany: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.

Gould-Phillip S., Burgar H. R., Lund P. A., (2007). Homologous *cpn60* genes in *Rhizobium leguminosarum* are not functionally equivalent. *Cell Stress & Chaperones* 12 (2): 123–131

Graf R., Anzali S, Buenger J., Pfluecker F., Driller H., (2008). The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin. Dermatol.*; 26:326–33.

Grammann K., Volke A., Kunte H.J., (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongate* DSM 2581. *J. Bacteriol.* 184: 3078–3085.

Grammel N., (2000). Molekulargenetische und biochemische analyse der biosynthese von 2-methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-hydroxyderivat, zwei salzstressinduzierbaren osmolyten in *Streptomyces chrysomallus*. Ph. D. thesis. *Technische Universität Berlin*, Berlin, Germany.

Grether-Beck S., Timmer A., Felsner I., Brenden H., Brammertz D., Krutmann J., (2005). Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide de novo synthesis; *J. Invest .Dermatol.* 125:545–53.

Hangasky J. A., Taabazuing C. Y., Valliere M. A., Knapp M. J., (2013). Imposing function down a (cupin)-barrel: secondary structure and metal stereochemistry in the alphaKG-dependent oxygenases. *Metallomics* 5: 287–301.

Harvey S. H., Krien M.J., O'Connell M.J. (2002). Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases. *Genome Biol.* 3: REVIEWS 3003.

Hemmingsen S. M., Woolford C., van der Vies S. M., Tilly K., Dennis D.T., Georgopoulos C. P., Hendrix R. W., Ellis R. J., (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333:330–334.

Hill J. E., Penny S. L., Crowell K. G., Goh S. H., Hemmingsen S. M. (2004). cpnDB: a chaperonin sequence database. *Genome Res.* 14: 1669–1675.

Höppner A., Widderich N., Lenders M., Bremer E., Smits S. H. J., (2014). Crystal structure of the ectoine hydroxylase, a snapshot of the active site. *J. Biol. Chem.*; 289:29570–83.

Romano I., Giordano A., Lama L., Nicolaus B., Gambacorta A., (2005). *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy. *System. and Appl. Microbiology* 28 (7): 24, 610-618.

Romano I., Lama L., Nicolaus B., Poli A., Gambacorta A., Giordano A., (2006). *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). *J. Gen. and Appl. Microbiology* 52 (6): 339-348.

Imágenes Digital Globe, Google Earth, (2018). <https://www.google.com.mx/maps/@18.3469,-97.4503547,300m/data=!3m1!1e3>. Consultada el 14 de Febrero de 2018.

Inbar L., Lapidot A., (1988). The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. *J. Biol. Chem.* 263:16014-16022.

INEGI (2005): *Puebla. Anuario estadístico 2005*.

Jebbar M., Talibart R., Gloux K., Bernard T., Blanco C., (1992). Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J. Bacteriol.* 174: 5027–5035.

Jebbar M., Sohn-Bösser L., Bremer E., Bernard T., Blanco C., (2005). Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J. Bacteriol.* 187: 1293–1304.

Jebbar M., Sohn-Bosser L., Bremer E., Bernard T., Blanco C., (2005). Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an Ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J. Bacteriol.* 187: 1293–1304.

Kärenlampi R. I., Tolvanen T. P., M.L. Hanninen. (2004). Phylogenetic analysis and pcr-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial *groEL* gene sequences. *Journal Of Clinical Microbiology* 42, (12): 5731–5738.

Kanias T., Acker J. P., (2006). Mammalian cell desiccation: facing the challenges. *Cell Preserv. Technol.*; 4: 253–77.

Knapp S., Ladenstein R., Galinski E. A., (1999). Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 3: 191–198.

Kolp S., Pietsch M., Galinski E. A., Gutschow M., (2006). Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1764: 1234–1242.

Kuhlmann A. U., and Bremer E., (2002). Osmotically Regulated Synthesis of the Compatible Solute Ectoine in *Bacillus pasteurii* and Related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 772–783

Kunte, H. J., (2004). Transport and accumulation of osmoregulatory solutes in bacteria: characterization of transport-systems and their regulatory mechanisms in *Halomonas elongata*, *Marinococcus halophilus*, and *Escherichia coli*. Bonn, Germany: *Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität*.

Kurz M., (2008). Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline Sys.*; 4:6.

Kushner D., Kamekura M., (1988). Physiology of halophilic eubacteria. En: *Halophilic Bacteria* (Rodríguez-Valera F. Ed.), CRC Press, Boca Raton, Fl., pp. 109–138.

Laminet A. A., Ziegelhoffer T., Georgopoulos C., Pluckthun A., (1990). The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the O-lactamase precursor. *EMBO J.* 9, 2315-2319.

Lentzen G., Schwarz T., (2006). Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 623–634.

Lippert K., Galinski E. A., (1992). Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:61–65.

Liu Y., Bolen D. W., (1995). The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally. *Biochemistry* 3(4): 12884–91.

Louis P., Galinski E. A., (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli* *Microbiology* 143: 1141–1149.

MacNeish R. S., (1967). A summary of the subsistence. En Byers DS (Ed.) The prehistory of the Tehuacan Valley. *University of Texas Press. Austin, TX, EEUU.* pp. 290-331.

Manzanera M., Garcia de Castro A., Tondervik A., Rayner-Brandes M., Strom A. R., Tunnacliffe A. , (2002). Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4328–4333

Margesin R., Schinner F., (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5: 73-83.

Marin-Sanguino A., Torres N. V., Mendoza E. R., Oesterhelt D., (2009). Metabolic engineering with power-law and linear-logarithmic systems. *Math Biosci.* 218: 50–58.

Márquez M. C., Ventosa A., (2005). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Gauthier et al., 1992) and *Marinobacter aquaeolei* (Nguyen et al., 1999) are heterotypic synonyms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1349–1351.

Mata J. A., Martínez-Cánovas M. J., Quesada E., Béjar V., (2002). A detailed phenotypic characterization of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 360-375.

Mcmullin W. T., Hallberg R. L., (1988). A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* *groEL*. *Gene Molecular and Cellular Biology* 8 (1): 371-380.

Mellado E., Moore E. R. B., Nieto J. J., Ventosa A., (1995). Phylogenetic inferences and taxonomic consequences of 16S ribosomal DNA sequence comparison of *Chromohalobacter marismortui*, *Volcaniella eurihalina*, and *Deleya salina* and reclassification of *V. eurihalina* as *Halomonas eurihalina* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 712–716.

Nyyssölä A., Keruvuo J., Kaukinen P., von Weymarn N., Reinikainen T., (2000) Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J. Biol. Chem.* 275: 22196–22201.

Ono H., Sawada K., Khunajakr N., Tao T., Yamamoto M., Hiramoto M., (1999). Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* 181: 91–99.

Oren A., (2002). *Halophilic Microorganisms and Their Environments*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Oren A., (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. PubMed, *Saline Systems*, 4: 2.

Owen R. J., Pitcher D., (1985). Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Edited by M. Goodfellow & E. Minnikin. London: Academic Press. 67–93 pp

Pastor J. M., Salvador M., Argandoña M., Bernal V., Reina-Bueno M., Csonka L. N., Iborra J. L., Vargas C., Nieto J. J., Cánovas M., (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotech. Adv.* 28: 782-801.

Peters P., Galinski E. A., Truper H. G., (1990). *FEMS Microbiol. Lett.* 71: 157–162.

Prabhu J., Schauwecker F., Grammel N., Keller U., Bernhard M., (2004). functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongate*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3130–3132.

Quesada E., Valderrama M. J., Bejar V., Ventosa A., Gutierrez M. C., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A., (1990). *Volcaniella eurihalina* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic nonmotile gram-negative rod. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 261–267.

Rabe J. H., Mamelak A. J., McElgunn P. J. S., Morison W. L., Sauder D. N., (2006). Photoaging: mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55: 1-19.

Racher K. I., Voegelé R. T., Marshall E. V., Culham D. E., Wood J. M., Jung H., (1999). Purification and reconstitution of an osmosensor: transporter ProP of *Escherichia coli* senses and responds to osmotic shifts. *Biochemistry* 38: 1676–1684.

Reshetnikov A. S., Khmelenina V. N., Mustakhimov I. I., Kalyuzhnaya M., Lidstrom M., (2011). Diversity and phylogeny of the ectoine biosynthesis genes in aerobic, moderately halophilic methylotrophic bacteria. *Extremophiles* 15: 653– 663.

Reuter K., Pittelkow M., Bursy J., Heine A., Craan T., (2010). Synthesis of 5-Hydroxyectoine from Ectoine: Crystal structure of the non-heme Iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase *ectD*. *PLoS ONE* 5(5): e10647. doi:10.1371/journal.pone.0010647.

Roberts M.F., (2006). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 1: 1–30.

Rzedowski J., (1978). Vegetación de México. *Limusa. México*. 432 pp.

Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Oesterhelt D., (2011). A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environm. microbiology* 13(8): 1973-1994.

Segal G., Ron E. Z., (1996). Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 1–10.

Vargas C., Jebbar M., Carrasco R., Blanco C., Calderón M. I., Iglesias-Guerra F., Nieto J. J., (2006). Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Appl. Microbiol.* 100: 98–107.

Vargas C., Argandoña M., Reina-Bueno M., Rodríguez-Moya J., Fernández-Aunión C., Nieto J. J., (2008). Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* 4: 14.

Ventosa A., Gutierrez M. C., Garcia M. T., Ruiz-Berraquero F., (1989). Classification of “*Chromobacterium marismortui*” in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 382–386.

Ventosa A., Nieto J. J., Oren A., (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 504-544.

Vreeland R. H., Martin E. L., (1980). Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Can. J. Microbiol.* 26: 746–752.

- Wang A., Bolen D. W., (1997). A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte. *Biochemistry* 36: 9101–8.
- Wang S. Q., Setlow R., Berwick M., Polsky D., Marghoob A. A., Kopf A. W., (2001). Ultraviolet A and melanoma: a review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44: 837–46.
- Ward D. M., Weller R., Bateson M. M., (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)* 344: 63-65.
- Widderich N., Pittelkow M., Höppner A., Mulnaes D., Buckel W., (2013). Molecular dynamics simulations and structure-guided mutagenesis provide insight into the architecture of the catalytic core of the ectoine hydroxylase. *J. Mol. Biol.*, 426: 586–600.
- Widderich N., Höppner A., Pittelkow M., Heider J., Smits S. H., Bremer E., (2014). Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One.* 9:e93809.
- Wohlfarth A., Severin J., Galinski E. A., (1990). The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family Halomonadaceae. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 705–712.
- Woese C. R., Fox G. E., (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5088–5090.
- Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L., (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4576–9.
- Yi H., Lim Y. W., Chun J., (2007). Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silicibacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* (Petursdottir, Kristjansson 1999) to the genus *Ruegeria* (Uchino *et al.*, 1999). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 815–819.
- Zanjirband M., Golbang N., Kermanshahi R. K., (2008). Detection of the *ectC* gene in *Halomonas* strains by polymerase chain reaction. *Iranian J. Biotech.*, 6(3): 181-185.