

T
497

90853

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOMICETOS A PARTIR DE
AMBIENTES HIPERSALINOS DE MÉXICO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTA:

M. en C. Ninfa Ramírez Durán

DIRECTOR DE TESIS

Dr. A. Horacio Sandoval Trujillo

ASESORES

Dr. Antonio Ventosa Uceró

Dr. Hugo C. Ramírez Saad



EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA METROPOLITANA SE ENCUENTRA EN EL PADRÓN DE
POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y CUENTA CON APOYO BAJO
EL CONVENIO PEP-20-93

MI TOTAL AGRADECIMIENTO AL CONACYT POR LA BECA ECONÓMICA
CON REGISTRO 141507, OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DEL
PRESENTE TRABAJO DOCTORAL.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en c. Ninfa Ramírez Durán

El día 17 de junio de 2005

Sinodales:

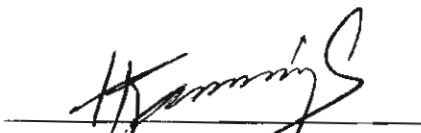
Dr. Horacio Sandoval Trujillo: Director

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is highly cursive and difficult to decipher, but appears to contain the name 'Horacio Sandoval Trujillo'.

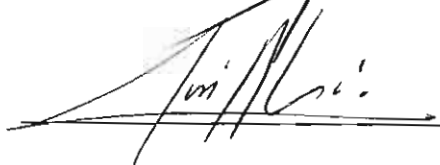
Dr. Antonio Ventosa Uceró: Asesor

A solid horizontal line intended for a signature.

Dr. Hugo C. Ramírez Saad: Asesor

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Hugo C. Ramírez Saad'.

Dr. José Antonio Serrano Romero: Sinodal

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'José Antonio Serrano Romero'.

Dra. Ma. del Carmen Márquez Marcos: Sinodal

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Ma. del Carmen Márquez Marcos'.

Dra. Marisol López López: Sinodal

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Marisol López López'.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Horacio Sandoval Trujillo

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

ASESORES

Dr. Antonio Ventosa Uceró

Catedrático. Universidad de Sevilla.

Dr. Hugo C. Ramírez Saad

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel I.

SINODALES

Dr. José Antonio Serrano Romero

Profesor Emérito. Universidad de los Andes, Mérida Venezuela.

Dra. Ma. del Carmen Márquez Marcos

Profesora Titular. Universidad de Sevilla.

Dra. Marisol López López

Profesora Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

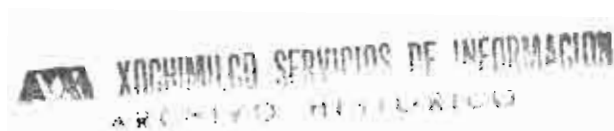
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel I.

El trabajo de Tesis fue desarrollado en los laboratorios:

Producción de Biológicos. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

Ecología Molecular. Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Sevilla.



AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi comité Tutorial: Dr. Horacio Sandoval, Dr. Antonio Ventosa y Dr. Hugo C. Ramírez, por la dirección y aportaciones a esta tesis. De manera especial al Dr. Sandoval, por su confianza, por su tiempo y su valiosa amistad.

Al Dr. José Antonio Serrano y a la Dra. Ma. del Carmen Márquez, por su asesoría en este trabajo y por su amistad.

Al grupo de trabajo del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla (especialmente a todos mis amigos del laboratorio de Estudio de Microorganismos Halófilos) y del Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana; espacios donde realicé parte del trabajo de esta tesis.

A mis amigos del laboratorio de Farmacia Galénica, (Isidoro, Anailien, Toñi y Fátima), por todos los agradables momentos que compartimos, y a todos mis amigos del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno de la Universidad de Sevilla (especialmente Djamila, Mohamed y Hamid).

A todas las personas que han estado cerca demostrándome su amistad, interés y apoyo en la realización de esta tesis, especialmente: Andrés, Ana, Lisse B., Lux, Vero, Luís M. Saúl, Félix M., Germán, Aida M., Aida H., Oli, Nora y Karina.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN
ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	5
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
ANTECEDENTES	8
LA HISTORIA DE LA SAL EN MÉXICO	
LA SAL EN LAS CULTURAS MESOAMERICANAS	8
EL MÉXICO COLONIAL	9
DE LA INDEPENDENCIA AL MÉXICO ACTUAL	10
IMPORTANCIA DE LA SAL	11
MITOLOGÍA Y SIMBOLISMO	13
ACTINOMICETOS	16
CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LOS ACTINOMICETOS	16
MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS	17
TERMÓFILOS	19
Ambientes	20
Adaptaciones	21
Ejemplos	21
Aplicaciones	22
PSICRÓFILOS	23
Ambientes	24
Adaptaciones	25
Ejemplos	25
Aplicaciones	26
ALCALÓFILOS	27
Ambientes	28
Adaptaciones	28
Ejemplos	29
Aplicaciones	29
ACIDÓFILOS	30
Ambientes	30
Adaptaciones	30
Ejemplos	31
Aplicaciones	32

XERÓFILOS	33
Ambientes	33
Adaptaciones	33
Ejemplos	34
Aplicaciones	34
METALÓFILOS	35
Ambientes	35
Adaptaciones	35
Ejemplos	35
Aplicaciones	35
PIEZÓFILOS (Barófilos)	36
Ambientes	36
Adaptaciones	37
Ejemplos	37
Aplicaciones	37
MICROORGANISMOS HALÓFILOS	38
Ambientes	39
Adaptaciones	40
<u>Osmoadaptación bacteriana</u>	40
Respuesta específica al estrés osmótico	41
<u>Adaptación de la composición lipídica de las membranas</u>	41
<u>Compuestos osmoprotectores</u>	42
Ejemplos	50
Aplicaciones	51
<u>Solutos compatibles</u>	51
<u>Biodegradación de residuos</u>	52
<u>Enzimas</u>	52
<u>Alimentos fermentados</u>	53
<u>Polímeros</u>	53
ACTINOMICETOS HALÓFILOS	54
<i>Actinopolyspora halophila</i>	55
<i>Actinopolyspora iraquiensis</i>	56
<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	57
<i>Friedmanniella lacustris</i>	58
<i>Nocardioides aquaticus</i>	58
<i>Nocardiopsis halophila</i>	59
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	59
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	59
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	60
<i>Prauserella halophila</i> y <i>Prauserella alba</i>	60
<i>Saccharomonospora halophila</i>	61
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	61
<i>Streptomonospora alba</i>	62
<i>Streptomonospora salina</i>	62
AMBIENTES SALINOS EN MÉXICO	63

METODOLOGIA	64
ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS HALOFILOS	64
AISLAMIENTO	64
Primera etapa de muestro	64
Segunda etapa de muestreo	65
MEDIO DE CULTIVO	65
Modificaciones	66
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	66
Muestras de agua	67
Muestras de suelo y sedimento	67
SELECCIÓN DE CEPAS	67
Cepas de actinomicetos	67
Cepas de actinomicetos halófilos	69
COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS HALÓFILOS	69
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	70
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	70
PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS A PARTIR DE CARBOHIDRATOS	82
PRUEBAS NUTRICIONALES	82
Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía	82
Utilización de aminoácidos y derivados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía	84
PRUEBAS ENZIMÁTICAS	85
ANÁLISIS NUMÉRICO	87
QUIMIOTAXONOMÍA	88
DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO DIAMINOPIMÉLICO	88
DETERMINACIÓN DEL ISÓMERO DEL ÁCIDO DIAMINOPIMÉLICO	88
ELECCIÓN DE CEPAS REPRESENTATIVAS	89
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	90
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GUANINA + CITOSINA	90
DETERMINACIÓN DE LA INSERCIÓN ESPECÍFICA EN EL GEN 23S DEL rRNA DE BACTERIAS CON ALTO CONTENIDO DE G+C	90
AMPLIFICACIÓN DEL GEN rRNA 16S	92
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	93
CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS	93

RESULTADOS	94
ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS HALOFILOS	94
MEDIO DE CULTIVO	94
SELECCIÓN DE CEPAS	96
Morfología colonial, microscópica y microscopia electrónica de barrido	96
Cepas de actinomicetos halófilos	97
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	99
QUIMIOTAXONOMÍA	104
ELECCIÓN DE CEPAS REPRESENTATIVAS	105
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	105
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GUANINA + CITO SINA	105
DETERMINACIÓN DE LA INSERCIÓN ESPECÍFICA EN EL GEN 23S DEL rRNA DE BACTERIAS CON ALTO CONTENIDO DE G+C	107
AMPLIFICACIÓN DEL GEN rRNA 16S	108
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	110
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFIA	125
ANEXO	

RESUMEN

El presente trabajo es el primer reporte de la existencia de actinomicetos halófilos en México. Se estableció una colección de actinomicetos halófilos aislados de ambientes hipersalinos en las zonas norte y sur de México. Un estudio de microscopía electrónica permitió identificar a las cepas aisladas como actinomicetos analizando sus características morfológicas y estructurales. Se determinó la presencia de una inserción específica característica de bacterias Gram positivas con elevado G+C, considerado como un marcador filogenético, localizado en el gen rRNA 23S; dicho fragmento fue localizado en todas las cepas aisladas, con lo que se confirmó a nivel molecular que los aislamientos corresponden a actinomicetos. La determinación del requerimiento de salinidad para el crecimiento de los actinomicetos aislados permitió caracterizarlos como actinomicetos halófilos, siendo requerido el 10% de sal para su desarrollo óptimo. Se determinó el contenido de G+C, obteniéndose valores promedio entre 64.14 y 68.92 mol%. Para el estudio fenotípico, se realizaron 120 pruebas, incluyendo, pruebas bioquímicas, nutricionales y enzimáticas, este estudio permitió construir una base de datos que contiene la información de las capacidades bioquímicas y metabólicas de las cepas aisladas. Finalmente Se realizó un estudio de secuenciación del gen 16S rRNA, identificando dos géneros; *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*, géneros que incluyen especies halófilas. Los géneros encontrados por secuenciación muestran una distribución geográfica diferente, siendo el género *Actinopolyspora* presente en el norte del país, mientras que el género *Saccharomonospora* predomina en el sur del país.

ABSTRACT

The present work is the first report of the existence of halophilic actinomycetes in Mexico. A collection of halophilic actinomycetes isolated from hypersaline ambients in Mexico, was characterized using traditional and molecular taxonomic techniques. The presence of a specific insert, characteristic of Gram positive bacteria with high G+C and considered as a phylogenetic marker, located in the RNAr 23S gene was determined. The phenotypic study, they was based in 120 tests, including, biochemical, nutritional and enzymatic tests. The content of G+C was determined, obtaining average values between 64.14 and 68.92 mol%. Finally it was carried out the sequencing of 16S rRNA gene, identifying two genus of actinomycetes, *Saccharomonospora* and *Actinopolyspora*, both genus include halophilic species. The found genus showed a different geographical distribution, being *Actinopolyspora* present in the north of the country, while *Saccharomonospora* prevails in the south of the country.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en la tierra, actualmente se sabe que se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde ambientes considerados ideales para la mayoría de las formas de vida hasta ambientes extremos. Su presencia y actividad es esencial para el funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas, por lo tanto, es de gran importancia la realización de estudios de distribución y diversidad de microorganismos sobre todo en ambientes extremos como es el caso de los ambientes hipersalinos, ya que los microorganismos que los habitan, llevando a cabo sus funciones metabólicas en dichas condiciones, son relevantes en una amplia gama de actividades biológicas.

Los extremófilos son aquellos organismos que viven de manera natural en condiciones ambientales que consideramos como extremas desde el punto de vista humano. Los ambientes extremos son aquellos cuyas características son entre otras; temperaturas muy altas o muy bajas, alta alcalinidad o alta acidez y alta salinidad.

Los organismos adaptados a vivir en condiciones de extrema salinidad y que además requieren de ella para desarrollarse son conocidos como halófilos. Las bacterias halófilas al ser microorganismos extremófilos tienen la capacidad de vivir en ambientes extremos.

Los actinomicetos, juegan un papel importante en microbiología ambiental, participando en la recuperación de suelos y en el tratamiento biológico de residuos sólidos; ya que son

microorganismos con una alta capacidad para degradar sustancias estructuralmente complejas.

Además de ser excelentes productores de antibióticos, los actinomicetos poseen una importante capacidad de producción de metabolitos de interés industrial, al igual que los microorganismos halófilos quienes además tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas del medio ambiente. Sin embargo el número de actinomicetos halófilos que se conocen actualmente es muy reducido.

El potencial de los actinomicetos halófilos puede ser aprovechado desde diferentes puntos de vista; ecológico, biotecnológico, medico, etc., de modo que el aislamiento y estudio de la biología de actinomicetos halófilos, nos permitirá obtener nuevas fuentes que pueden contribuir en la industria farmacéutica con importantes aplicaciones biotecnológicas e industriales.

Los actinomicetos halófilos reportados en el mundo actualmente forman un grupo reducido. En los últimos años se han reportado pocos géneros de actinomicetos halófilos; de tal forma que el estudio de la biología de actinomicetos halófilos incluyendo su aislamiento identificación y caracterización empieza a mostrar la diversidad de estos microorganismos en varias partes del mundo.

En 1975 se reportó el primer aislamiento de un actinomiceto capaz de crecer en altas concentraciones de salinidad; *Actinopolyspora halophila*. Dieciséis años mas tarde, en 1991, se reporta el segundo actinomiceto halófilo; *A.mortivallis*. En los años siguientes y

2003 se reportaron 13 especies mas, existiendo hasta la actualidad 15 miembros conformando este grupo.

México es un país que debido a su situación geográfica y climatológica presenta una importante variedad de condiciones ambientales, siendo la región norte caracterizada por un clima desértico con suelo seco y lluvias poco abundantes en todas las estaciones; la vegetación es de tipo matorral desértico espinoso con predominancia de cactáceas y pastos pobres. La región sur se caracteriza por un clima cálido húmedo con lluvias en verano y su vegetación corresponde a la de los bosques templados, el tipo de suelo es antiguo con fuerte grado de meteorización.

Estas diferencias han dado como resultado una gran diversidad microbiológica en los ambientes de extrema salinidad presentes en las diferentes regiones geográficas del país. Tal es el caso de las lagunas costeras y salinas ubicadas en la costa mexicana del océano pacífico. El papel ecológico de las lagunas costeras y salinas como sitio de refugio, alimentación, reproducción, crianza de multitud de aves migratorias es innegable. La pérdida de las mismas pone en peligro la viabilidad de ciertas especies de aves. Es interesante conocer el gran número de estudios que se pueden realizar en este tipo de habitats desde el punto de vista ecológico, fisiológico y evolutivo.

La importancia de la creación de una colección de cepas de actinomicetos aislados de ambientes salinos del territorio mexicano radica en conocer la diversidad de estos microorganismos, los cuales hasta la fecha conforman un grupo reducido y poco estudiado,

además de contar con cepas bien caracterizadas para emprender estudios que redunden en la obtención de nuevos productos de aplicación industrial.

HIPÓTESIS

La creación y caracterización de una colección de cepas de actinomicetos halófilos permitirá conocer la diversidad de este grupo de microorganismos en el territorio mexicano.

OBJETIVO GENERAL

Crear una colección de cepas de actinomicetos aislados de ambientes hipersalinos representativos de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar medios selectivos para el aislamiento de actinomicetos halófilos.
2. Caracterizar las cepas de actinomicetos halófilos mediante un estudio fenotípico que incluya pruebas fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y enzimáticas.
3. Estudiar mediante técnicas moleculares algunas cepas representativas de la colección de actinomicetos halófilos.
4. Realizar un estudio filogenético de las cepas representativas de la colección de actinomicetos halófilos.

ANTECEDENTES

LA HISTORIA DE LA SAL EN MÉXICO

En cualquier región del mundo, la sal siempre ha sido necesaria para la supervivencia humana. En la historia antigua, los señores de la tierra y los gobiernos dependían de la sal para aplicar sus intenciones políticas, ya fuera como poderosa arma de guerra, o ya fuera como objeto de obtener ingresos. En cuanto a México, durante más de 300 años, desde la segunda mitad del siglo XVI hasta principios del XX, la sal cobró una importancia adicional. México fue el primer país del mundo que usó la sal en gran escala con propósitos industriales. De tal suerte, durante un largo periodo, la sal fue fundamental para la economía del país. Debido a la distribución y la calidad desiguales de los recursos salineros, así como a la diversidad geográfica y geológica del país, lo más probable es que a lo largo de los milenios, México también haya desarrollado la más amplia variedad de métodos para la recuperación del cloruro de sodio. Hoy en día, aún es posible captar los últimos destellos de las prácticas precolombinas para la obtención de sal, pero también puede verse la planta solar más grande del mundo, al frente de la tecnología internacional.

LA SAL EN LAS CULTURAS MESOAMERICANAS

Las culturas mesoamericanas dependían del cloruro de sodio para satisfacer sus necesidades fisiológicas. A diferencia de Europa, en Mesoamérica casi no se usó la sal como conservador. Los indígenas mesoamericanos a veces salaban el pescado y lo secaban al sol, pero no por necesidad, sino sólo por el sabor.

Los aristócratas y los señores hicieron del uso y consumo de sal un instrumento de guerra y de política. El comercio de la sal podía cortarse, como hicieron los Aztecas en el caso de los Tlaxcaltecas, mientras a los asentamientos del interior se les podía cerrar a las salinas costeras, estrategia que los Mayas parecen haber manejado de la manera más hábil, o bien, unos y otros, tanto mayas como aztecas, cobraban sal como tributo.

EL MÉXICO COLONIAL

La conquista despojó a la sal de toda su importancia política previa, en la cultura indígena y a veces también en la mestiza, la sal ha conservado parcialmente su uso ritual y medicinal.

La mitología y la religión prehispánica, el contexto ritual de la sal y los tabúes de la privación subrayan el valor atribuido a este producto. Con su compleja y pluralista variedad de deidades, la religión azteca conocía, por ejemplo, a Huiztociuatl, la diosa de los salineros y de las aguas saladas. Después de la conquista, la conversión de los indígenas a las doctrinas católicas perpetuó algunas creencias o las transformó. Un ejemplo es la veneración de Nuestra Señora de la Sal de Ixtapa.

A diferencia de Europa, la Mesoamérica precolombina apenas dio algún uso distinto a la sal en las artesanías e industrias. Esta situación cambió después de la conquista, donde fueron cada vez más numerosos los artesanos que adoptaron las técnicas europeas para la cura de pieles, la fabricación de nuevos tipos de cerámica y vidriado, así como la manufactura de vidrio.

En México, desde el siglo XVI hasta principios del XX, el uso de cloruro de sodio o de las eflorescencias sumamente salinas (sal tierra) en el procesamiento de minerales de plata se

mantuvo como factor decisivo en la industria salinera del país. Con el objeto de garantizar una continua producción del metal, la producción y la comercialización de la sal fueron prioritarias en toda la planificación virreinal. La necesidad de cloruro de sodio para la alimentación y las industrias domésticas, era relativamente predecible.

DE LA INDEPENDENCIA AL MÉXICO ACTUAL.

Después de la independencia y a mediados del siglo XIX, cuando sucedieron las grandes pérdidas territoriales del México independiente, la sal se convirtió en artículo de exportación, en este contexto histórico, la exportación de sal de Baja California a California tiene una historia muy interesante. Antes de las construcciones de las plantas solares de sal en aquel estado, Isla del Carmen abastecía de sal a California.

Durante la última década del siglo XIX, la industria de la plata adoptó nuevas tecnologías más eficientes y la industria salinera mexicana experimentó grandes cambios, compensando estos, en forma gradual por el consumo de la población creciente, los acontecimientos de la revolución opacaron en cierto punto esta drástica disminución de la demanda y el gobierno tuvo que intervenir para regular y disminuir la producción de sal.

Después de las turbulencias políticas y económicas generadas por la Revolución Mexicana, se comenzó a construir una multitud de plantas químicas desde fines de la década de los cuarenta, esta industria se sitúa actualmente como uno de los principales consumidores de sal y recientemente, la industria química también ha venido adquiriendo plantas salineras.

A partir de la Segunda Guerra Mundial, cuando la industria química empezó a surgir, las exportaciones tuvieron perspectivas más brillantes, y desde los años cincuenta, se

explotaron las posibilidades de exportar sal a Japón, país que tiene escasez de este producto. Estos planes no se realizaron de inmediato por falta de transporte y producción. Casi al mismo tiempo, se empezó a construir con inversión estadounidense, una de las plantas solar de sal más grandes del mundo en Guerrero Negro, Baja California Sur; la que posteriormente fue nacionalizada y en la actualidad, México se ubica como uno de los principales exportadores de sal, compitiendo con Australia por el mercado japonés.

Por milenios, la industria salinera mexicana ha suministrado sal a sus habitantes. La historia y las tradiciones de esta industria constituyen un destacado capítulo del pasado económico, social y político de México. Esta industria tiene no sólo un mercado interno prometedor, también puede seguir compitiendo en la exportación de sal. Tal vez se podrían conservar algunas de las salinas antiguas de México en forma de museos al aire libre porque son únicas en el mundo y, además, son parte de la herencia cultural del país (Ewald, 1997).

IMPORTANCIA DE LA SAL

La sal es un elemento indispensable para la sobrevivencia de los seres humanos y desde tiempo inmemoriales el hombre ha buscado diversas formas de abastecerse de este producto, no solo para cubrir sus necesidades alimentarias, sino, para otros muchos fines.

Solamente para la alimentación se ha calculado que en el medio urbano, los requerimientos mínimos varían entre 0.5 y 2.0 gramos al día, pero cuando la dieta se basa mayoritariamente en vegetales, puede aumentar el consumo hasta 5.0 gramos; sin embargo, entre poblaciones rurales que viven en climas cálidos o tropicales se ha calculado que el

consumo aumenta a 15 gramos. Más aún cuando se realizan trabajos que exigen un esfuerzo adicional como el que se efectúa en las labores agrícolas, la ingestión de sal puede llegar a los 30 gramos diarios, si a esto le agregamos los diversos usos en los que se utilizaba en la antigüedad, las necesidades se elevan considerablemente. No es gratuito que a los soldados romanos se les remunerara con sal, vocablo que derivó en salario.

En contraposición, la ausencia de sal en el organismo trae aparejado trastornos que van desde la pérdida de peso y de firmeza en los músculos faciales y corporales, laxitud, fatiga, falta de apetito y en casos extremos puede provocar la muerte.

Debido a su importancia durante la época prehispánica, la sal ha sido de los minerales que más ha llamado la atención de los investigadores, ya que su estudio permite acercarse a diversos aspectos que van desde los sistemas productivos, tecnológicos, económicos, políticos de la vida cotidiana, etc.

En Mesoamérica, la sal fue objeto de comercio, intercambio y tributo; se realizaron guerras de conquista para obtenerla; se le empleó para combatir enfermedades; como conservador de alimentos; para curtir pieles; en diferentes rituales que involucran desde el nacimiento hasta la muerte; para reforzar vestimentas guerreras, además de servir como nutriente alimenticio. Incluso se ha llegado a afirmar que se le empleó como equivalente monetario entre los antiguos mayas.

Cuando se carecía de yacimientos salinos como sucedió en algunos grupos de recolectores cazadores, estos satisfacían sus necesidades empleando las cenizas de ciertos vegetales; aun

así, existen reportes que indican que intercambiaban pieles, puntas de proyectil y otras mercancías por sal cuando tenían oportunidad.

La explotación de yacimientos salinos en Mesoamérica ha documentado una gran cantidad de sitios en los cuales la producción de este recurso ha sido prácticamente constante desde esa lejana época hasta nuestros días. Mientras que en algunos casos la explotación de los yacimientos ha sufrido cambios en el aspecto tecnológico, en otros, estos cambios han sido mínimos. La introducción de tecnología avanzada, el mejoramiento de las vías de comunicación, la movilidad de productos propiciada por el sistema mercantil vigente entre otros factores, ha provocado que muchos lugares en los que se explotaban yacimientos salinos de manera tradicional hayan sido abandonados. (Viramontes, 1998).

MITOLOGÍA Y SIMBOLISMO

La sal de mesa que a diario utilizamos para condimentar los alimentos tiene una antigua correlación mítico-histórica. Ante la escasez de información en torno a la cosmovisión indígena mesoamericana sobre la sal, se presenta a continuación una de las tantas historias que tuvieron origen en los pueblos contemporáneos e históricos en el México del siglo XVI.

Malintzi o Huiztocíuatl, como es llamada en otras regiones del país y cuyo nombre verdadero es la sal; junto con sus dos hermanos crecieron muy pobres trabajando en los maizales. Ella les alentaba llevándoles a la labor, tortillas y pescado, en algunas ocasiones, y en otras, camarones. Los hermanos se admiraban de la comida que recibían y trabajaban con mayor entusiasmo. Camarones y pescados asados fueron platillos tan

cotidianos, que intrigó a los hermanos la procedencia, ya que carecían de recursos suficientes. Primero conjeturaron que ella los compraba, pero no era posible debido a su pobreza. Trabajaban muy contentos por la calidad de la comida, hasta que el hermano mayor le encomendó al menor, que fuera a espiarla.

El hermano menor se escondió en el monte para verla pasar cuando se dirigía al pozo en busca de agua, momento que aprovechó para entrar a la casa y esconderse para observar el regreso de la hermana, quien vació el cántaro en una canoa donde se introdujo para bañarse, y al hacerlo, de su cuerpo caían pescados grandes. Luego se entregó a la tarea de asar los pescados y de preparar la masa para las tortillas sin advertir al espía. Cuando ella volvió a salir en busca de agua, también lo hizo el hermano para ir a delatarla. Los hermanos decidieron no comer lo que les llevó Malintzi, por ser comida salida de su cuerpo, y le preguntaron por la procedencia de los pescados, respondiendo que los había comprado a un vendedor ocasional.

Los hermanos solamente comían tortillas y decidieron aguardar mientras se enteraban de la procedencia de los camarones. Se repitió el acto de espionaje y el hecho maravilloso de que los camarones brotaran de la cabeza. Ellos no comieron, y tampoco le reclamaron porque esperaban aun saber como obtenía la sal, de donde la sacaba. Ya sabían que los pescados brotaban de las axilas y los camarones de la cabeza, faltaba la sal. Se dieron cuenta de que la sacaba de la nariz. Al sonarse caían muchos terrones de sal. Los hermanos no se enojaron de momento y tampoco comían.

La gente nada sabía, únicamente llegaba a la casa de Malintzi en busca del obsequio de la sal. La gente admirada se preguntaba de donde sacaba la sal, ya que aquí en este lugar no había. A Malintzi en agradecimiento le llevaban regalos y ella los pasaba a sus hermanos. Estos de momento no le reprochaban nada, ya que esperaban hacerlo hasta que estuviesen ricos. Entonces le pedirían que se fuera o pudiera que hasta le pegasen.

Llegó el momento en que empezaron a enojarse con ella, reclamándole que ya sabían que de la nariz salía la sal, de las axilas el pescado y de la cabeza los camarones. Y la amenazaron con pegarle si no dejaba de hacerlo. No conformes con que ella continuaba dándoles de comer. Una vez le pegaron tanto y, no obstante, ella aun tuvo paciencia para reclamarles el maltrato, ya que todo les proporcionaba. Esta observación encendió al hermano, que sintió que indirectamente lo calificaba de mantenido y reaccionó pegándole. Entonces ella si se entristeció y decidió irse sin enterarles del rumbo.

Malintzi se puso a llorar sobre el techo de su casa. La gente acudía y tristemente rogaba que no se fuera. Malintzi respondió que sentía cuanto la amaban y les prometió que seguirían teniendo sal, aunque fuese poca, pero tendrían que ir a buscarla. Lamentaba mucho que tuviesen que ir hasta allá donde ella iba a llegar. Dejó una canoa y una paila como recuerdo y se llevó los pescados. De repente, sobre el techo de la casa, apareció una nube, que bajó un momento y se la llevó. También dicen que se formó un río, quizá de sus lágrimas. Este río conforme avanzaba se iba haciendo más grande hasta que se volvió mar. En este río se fue. (Williams, 1998).

ACTINOMICETOS

Los Actinomicetos son un grupo de bacterias filamentosas, Gram positivas, que forman filamentos ramificados. Como resultado de un adecuado crecimiento y ramificación, se forma una estructura ramificada de filamentos, denominada micelio, mismo que aún siendo de dimensiones bacterianas es análogo al micelio que forman los hongos filamentosos. Muchos actinomicetos forman esporas. Responden al oxígeno en diferentes formas, pues los hay aerobios y anaerobios, dependiendo de la especie. Los actinomicetos son microorganismos quimiorganotróficos.

CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE LOS ACTINOMICETOS

1. Predominan en forma libre en suelos secos y cálidos en cantidades de millones por cada gramo de suelo.
2. Algunos de los géneros predominantes de este grupo son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora*.
3. Estos organismos son los causantes del olor característico a moho o a tierra húmeda de los campos recién arados. Este olor característico se origina de la producción de una serie de metabolitos denominados geosminos. Estas sustancias son compuestos sesquiterpenoides, anillos de carbono insaturados, oxígeno e hidrógeno. La primera geosmina descubierta tiene el nombre químico de trans-1,10-dimetil-trans-9-decanol.

4. Son capaces de degradar muchas sustancias complejas y consecuentemente juegan un papel muy importante en la química del suelo.
5. La propiedad más notable de los actinomicetos es su capacidad para producir antibióticos. Está comprobado que más de 500 sustancias antibióticas distintas son producidas por ellos y tienen múltiples aplicaciones en la medicina, veterinaria y agricultura. Muchos antibióticos son eficaces en el control de bacterias patógenas o infecciosas.
6. Las composiciones de base de DNA de todos los miembros de los Actinomicetos caen dentro de un límite relativamente estrecho de 63 a 78% G + C, los organismos en el extremo superior de este límite tienen el porcentaje de G + C más alto de cualquier bacteria (Madigan y col., 2003).

MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS

La vida prospera en los extremos físicos y químicos que, hasta hace poco tiempo, se creían imposibilitados para albergar vida, el término "extremo" se utiliza a menudo para caracterizar estos lugares.

El término extremófilo fue usado por vez primera por Macelroy en 1974 hace tres décadas (MacElroy, 1974). "Ambiente extremo", es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la sobre vivencia de

de otro organismo. Los extremófilos se desarrollan bajo condiciones que podrían matar a la mayoría de otras criaturas y muchos no pueden sobrevivir en los ambientes considerados globalmente normales. Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperaturas muy altas (55 a 121 °C) o bajas (-2 a 20 °C), alta salinidad (NaCl 2 a 5M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 4) (Madigan y Mairs, 1997; Rothschild y Manicinelli, 2001).

Los extremófilos presentan un interés científico diversificado. En principio, son frecuentemente taxones nuevos que en el momento de su descubrimiento vienen a completar el conocimiento filogenético de los seres vivos y también a enriquecer los debates relativos al origen y a los límites de la vida. El descubrimiento de microorganismos que habitan en ambientes con temperaturas extremas, pH extremos, altas presiones y alta salinidad, ha despertado el interés de su estudio desde el punto de vista biotecnológico por las características de estos microorganismos; ya que sus biomoléculas son necesariamente resistentes a las condiciones agresivas de su entorno, lo que desemboca en intensos trabajos para intentar comprender los mecanismos íntimos de resistencia, pero también para estudiarlos en la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales entre las que la PCR (Polymerase Chain Reaction) constituye el más destacado ejemplo de la situación actual. Además, los ambientes extremos demuestran que la vida podría existir en algunos de los ambientes extremos encontrados en el espacio y más allá (Rossi y col, 2003).

La mayoría de las enzimas usadas hasta la fecha se originan de organismos mesófilos y, a pesar de sus muchas ventajas, el uso de estas enzimas es restringido debido a su estabilidad limitada en los extremos de temperatura, pH y fuerza iónica. Por otra parte, los

extremófilos son una fuente potencial de enzimas, que demuestran alta estabilidad bajo condiciones extremas (Adams y col, 1995; Haki y Rakshit, 2003; Yano y Poulos; 2003).

Los extremófilos han despertado el interés de varias industrias, debido a sus enzimas, catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas de la célula, y que en el caso de las arqueobacterias extremófilas les permiten colonizar los ambientes más inhóspitos. Las enzimas habituales tienen ciertas limitaciones, sin embargo las extremoenzimas, empiezan a operar justo en el punto donde las habituales dejan de funcionar. Existen numerosos procesos industriales que requieren el uso de estos aceleradores químicos, tal es el caso de las enzimas que participan por ejemplo en la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos como pan y vino, tratamiento de residuos, extracción de petróleo, obtención de “biochips” para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades (Van Den Burg, 2003).

A continuación se presenta un panorama de los microorganismos extremófilos, incluyendo sus características ambientales y de crecimiento, mecanismos de adaptación, aplicaciones y los principales ejemplos de microorganismos extremófilos

TERMÓFILOS

Se consideran como termófilos aquellos microorganismos que crecen en temperaturas por arriba de 65 °C, los termófilos presentan óptimos de temperatura de 70 - 80 °C y máximos entre 80 – 113 °C. La mayoría de las bacterias crecen más rápidamente entre 25 y 40 °C, sin embargo no se han encontrado animales o plantas multicelulares que vivan por encima de los 50 °C (Madigan y col., 2003; Niehaus y col., 1999).

El límite de temperatura a la que se pueden encontrar organismos no es conocido todavía aunque se cree que por encima de 150 °C ninguna forma de vida podría evitar la ruptura de los enlaces químicos que forman el DNA y otras moléculas esenciales. En función de la temperatura de crecimiento, los organismos se clasifican de la manera siguiente. (Tabla 1).

TEMPERATURA	DESCRIPCIÓN
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110 y 113°C.
Termófilos	Crece por encima de los 45 ó 50°C
Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de los 10°C.
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5°C y con temperaturas máximas de 20 ó 25°C
Psicrófilos facultativos	Temperatura óptima de 15°C llegando a alcanzar los 20°C y también capaces de bajar hasta menos de 0°C.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento.

Ambientes

Los hábitats naturales con temperaturas permanentemente altas (por encima de 45 – 50 °C) están restringidos a unas pocas zonas de la biosfera, normalmente relacionadas con fenómenos volcánicos: fuentes termales volcánicas terrestres, fuentes termales submarinas (fumarolas hidrotermales) asociadas a las grandes dorsales oceánicas y materiales en fermentación como acúmulos de abono (compostas), los que pueden alcanzar temperaturas de 65 °C.

Adaptaciones

Tienen alta estabilidad térmica de sus enzimas (redes de interacciones iónicas), modificaciones de la membrana plasmática, que en bacterias, presentan alargamiento de las cadenas de ácidos grasos (C₁₈-C₂₄), incremento de ácidos grasos saturados, presencia de ramificaciones, ciclos, hopanoides. En arqueas, los lípidos son muy especiales, se trata de éster de hidrocarburos unidos al glicol (el enlace éster es mas resistente). Algunas exhiben una monocapa bioquímica de C₄₀ – bifitanil – tetraéteres, (resultado de unirse “cola con cola” 2 C₂₀ – fitanil - diéteres) que proporcionan una extrema resistencia a agentes ambientales (Madigan y col., 2003; Gomes y Steiner 2004).

Ejemplos

Bacterias

Thermus aquaticus, crece a temperaturas mayores de 70 °C y es ampliamente utilizada en la industria para la tecnología de PCR.

Arqueas

Hay tres grupos principales de hipertermófilos en los arquea; los sulfuro dependientes (metabolizan azufre para obtener energía), los sulfuro reductores y los metanogénicos. La mayor parte de los termófilos de esta división son sulfuro dependientes y se presentan como sulfuro reductores anaerobios (crecen a temperaturas mayores de 90 °C y la mayoría son de origen marino) y sulfuro oxidantes aerobios (estos últimos menos termófilos). *Sulfolobus acidocaldarius*, crece prolíficamente a partir de 85 °C en fuentes termales ácidas o suelos superficiales (pH de 1 a 5). *Pyrolobus fumarii*, su temperatura óptima de crecimiento son

105 °C pero puede crecer hasta a 113 °C, sin embargo detiene su crecimiento cuando se baja de 90 °C, crece en las paredes de las fumarolas.

Eucariotas

Cyanidium caldarium, su afiliación taxonómica no es todavía muy clara pero generalmente se agrupa dentro de las algas rojas. Su crecimiento óptimo se produce a 45 °C y la máxima posible es de 57 °C, siempre en ambientes ácidos. (Seckbach, 1994/5). *Alvinella pompojana*, viven en madrigueras de chimeneas hidrotermales con fuertes gradientes de temperatura, a unos 68°C, aunque pueden exceder los 81 °C (Cary y col., 1998).

Aplicaciones

El caso espectacular lo ofrece el *Thermus aquaticus*, este microorganismo descubierto en 1968 fue localizado en las aguas de los géiseres del parque Yellowstone, en Wyoming. Una de sus enzimas, la *polimerasa Taq*, hizo posible que dos décadas después en el año 1985, un investigador norteamericano, Kary Mullis desarrollara un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de DNA, obtener *in vitro*, millones de copias de DNA en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas.

Varios tipos de enzimas termoestables son requeridas por las industrias, tales como la industria de detergentes, alimentos, almidón, textiles, piel, papel y farmacéutica. En la industria de los detergentes y jabones para la ropa se utilizan biocatalizadores que quiten las manchas a baja temperatura, mientras que en tratamientos de esterilización de ropa de quirófano se prefiere un jabón que tenga biocatalizadores que funcionen a altas temperaturas. La industria del cuero y las pieles requiere enzimas que degraden proteínas

de la piel de los animales en condiciones de alta salinidad o minerales. En cada caso se emplearán enzimas provenientes de diferentes extremófilos.

Las enzimas resistentes al calor se han usado para acalorar reacciones, usando temperaturas más altas, en procesos industriales tales como la obtención de ciclodextrinas a partir del maíz. Las ciclodextrinas son compuestos muy útiles para dispensar ciertos fármacos o estabilizar algunos componentes aromáticos alimentarios. En la Tabla 2 se muestran las principales enzimas de los microorganismos termófilos y sus aplicaciones industriales (Van Den Burg, 2003; Irwin y Baird, 2004).

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMOS TERMÓFILOS	Proteasas	Detergentes, alimentos, elaboración de cerveza y panadería
	Glicosil hidrolasas (amilasas, pululanasa, glucoamilasas, glucoasidasa, celulasas, xilanasas)	Almidón, celulosa, quitina, pectina y procesamiento de textiles.
	Quitinasas	Modificación de alimentos y productos para la salud
	Lipasas, esterasas	Detergentes, reacciones estereo-específicas (<i>trans</i> -esterificación, biosíntesis orgánica)
	DNA - polimerasas	Biología molecular (PCR)
	Deshidrogenasas	Reacciones de oxidación

Tabla 2. Enzimas de termófilos y sus aplicaciones.

PSICRÓFILOS

El agua es el disolvente primordial para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta ocurra. Esto pone un límite para el crecimiento de organismos por debajo de los 0 °C. Típicamente los organismos psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de

los 5 °C, aunque su rango de temperaturas no letales puede ir desde los 20 °C hasta menos de 0 °C (Madigan y col., 2003).

Ambientes

Los ambientes fríos son actualmente mucho más comunes y extensos que los calientes en la tierra y en el universo. En la tierra la temperatura media de los océanos es de tan sólo de 2 a 3 °C aunque puede ser mayor en la superficie, pero a 200 metros de profundidad esta se iguala casi totalmente, por otro lado hay extensas áreas en el ártico y antártico que permanecen heladas la mayor parte del año.

Las variaciones de temperaturas, pH y salinidad del medio ambiente en el que se encuentren estos organismos son de decisiva importancia para su crecimiento. El régimen de salinidad del hielo marino varía durante su proceso de formación, así como el pH debido a la actividad biológica o la precipitación de carbonatos (Bowman y col., 1997; Grossmann y Gleitz, 1993).

Los principales ambientes habitados por los extremófilos incluyen: regiones polares, montañas altas, glaciares, el fondo de los océanos, sistemas subterráneos bajos (cuevas), la atmósfera superior y las superficies de las plantas y de los animales que viven en los ambientes fríos, donde las temperaturas nunca exceden los 5 °C.

Muchos psicrófilos viven en biotopos que tienen más de un factor de tensión, tales como baja temperatura y alta presión en los mares profundos, o la alta concentración de sal y la

baja temperatura en el hielo del mar (Cavicchioli y col., 2002; Deming, 2002; Margesin y col., 2002; Feller y Gerdau, 2003; Georlette y col., 2004).

Adaptaciones

Los psicrófilos han desarrollado mecanismos de adaptación para realizar sus funciones metabólicas a bajas temperaturas incorporando características únicas en sus proteínas y membranas. Comparado con las proteínas de mesófilos, las proteínas de psicrófilos muestran disminución en interacciones iónicas y enlaces del hidrógeno, poseen menos grupos hidrofóbicos y más grupos cargados en su superficie. Debido a estas modificaciones a bajas temperaturas, las proteínas de los psicrófilos pierden su rigidez y ganan flexibilidad estructural para la realización de sus funciones catalíticas. Las membranas de los psicrófilos contienen una mayor proporción de ácidos grasos no saturados, por lo que su fluidez y capacidad de transportar los alimentos se mantienen bajo condiciones muy frías (Cavicchioli y col., 2002; Deming, 2002; Margesin y col., 2002; Feller y Gerdau, 2003; Georlette y col., 2004).

Ejemplos

Bacterias

Gram-negativas: *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Polaromonas*, *Psychroflexus*, *Polaribacter*, *Moritella*, *Vibrio* y *Pseudomonas*

Gram-positivas: *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus*.

Arqueas

Methanogenium, Methanococcoides y Halorubrum

Levaduras

Candida y Cryptococcus

Hongos

Penicillium y Cladosporium

Eucariotas

Polaromonas vacuolata, su temperatura óptima de crecimiento es de 4 °C, sin que pueda multiplicarse arriba de los 12 °C. *Reomita globosa*, flagelado heterotrófico del antártico que puede soportar cambios de temperatura muy drásticos con ciclos de congelación-descongelación y temperaturas diurnas en ocasiones de más de 20 °C. En la antártida hay al menos otras 24 especies de protistas, líquenes y mohos que viven en estas condiciones. La temperatura óptima para el crecimiento de *Heteromita* es de 23 °C, pero bajo condiciones extremas muestra adaptaciones como el enquistamiento y utilización apropiada de recursos durante cortos periodos de tiempo, que le permiten crecer activamente a temperaturas cercanas a 0 °C (Cavicchioli y col., 2002; Deming, 2002; Margesin y col., 2002; Feller y Gerdau, 2003; Georlette y col., 2004; Prescott, 1978).

Aplicaciones

Los psicrófilos son capaces de degradar sustancias poliméricas tales como: almidón, celulosa, xilano, pectina, quitina, proteínas y lípidos; mediante la producción de enzimas

como: amilasa, celulasa, xilanas, pectinasa, quitinasa, proteasa y lipasa respectivamente (Van Den Burg, 2003; Demirjian y col., 2001; Eichler, 2001). *Polaromonas vacuolata*, hallado en el océano antártico, tiene una temperatura óptima de crecimiento es de 4 °C y es capaz de multiplicarse si la temperatura aumenta más allá de los 8 °C. (Irgens, 1996). La industria alimentaria esta poniendo los ojos en este extremófilo debido a que el procesamiento de ciertos alimentos precisa a menudo de enzimas que trabajen en frío para evitar su deterioro, igualmente se han fijado también los fabricantes de perfumes ya que sus enzimas podrían utilizarse para retrasar la evaporación del excipiente y en los detergentes de lavado frío. Las enzimas de los psicrófilos podrían utilizarse para producir grasas y aceites insaturados de forma natural, esto nos permitiría la elaboración de productos alimenticios más sanos. En la Tabla 3 se muestran las principales enzimas de los psicrófilos y sus aplicaciones industriales.

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMOS PSICROFILOS	Proteasas	Detergentes, alimentos (productos lácteos)
	Amilasas	Detergentes y panadería
	Celulasas	Detergentes, alimentos y textiles
	Deshidrogenasas	Biosensores
	Lipasas	Detergentes, alimentos y cosméticos

Tabla 3. Enzimas de psicrófilos y sus aplicaciones.

ALCALÓFILOS

Se llaman alcalófilos aquellos organismos que viven en ambientes con pH por encima de 9 - 11 (Madigan y col., 2003).

Ambientes

Los microorganismos alcalófilos se encuentran por lo general en hábitats muy básicos como lagos sódicos y suelos muy carbonatados, como los que se encuentran en Egipto, el Rift Valley de África y oeste de los Estados Unidos, pertenecen al género *Bacillus* y son también halófilos.

Adaptaciones

Los alcalófilos necesitan aislar el interior de la célula del medio alcalino exterior ya que algunas moléculas, especialmente las hechas a partir de RNA, se rompen con pH superior a 8. Como en el caso de otros extremófilos las células de los alcalófilos se protegen con extremoenzimas que se localizan cerca de la pared celular o por medio de secreciones externas.

A partir de los estudios realizados con especies alcalófilas de *Bacillus* se ha puesto de manifiesto que en vez de la habitual fuerza automotriz de protones, es un gradiente de Na^+ el que suministra la energía para el transporte y la movilidad, pero también se genera una fuerza motriz de protones responsable de la síntesis respiratoria de ATP (Madigan y col., 2003).

Los alcalófilos además de la peptidoglicana tienen en su pared celular polímeros cargados negativamente, los cuales pueden reducir la densidad de la carga en la superficie de la célula y ayudar a estabilizar la membrana de la célula (Wiegel y Keubrin, 2004; Horikoshi, 1999; Ma y col., 2004.)

Ejemplos

Bacterias

Los procariotas mejor estudiados han sido bacterias aerobias no marinas, muchas de las cuales son especies de *Bacillus* (Madigan y col., 2003).

Spirulina (cianobacterias), principal habitante de muchos lagos salados del Rift Valley, donde sirven de alimento a colonias inmensas de flamencos. Los excrementos de esos mismos flamencos al caer al agua de los lagos proporcionan un campo de cultivo fenomenal para, distintas especies de protistas (no cianobacterias) y especies de rotíferos.

Arqueas

Algunos microorganismos alcalófilos extremos son también halófilos y la mayor parte de estos pertenecen al dominio Archaea (Madigan y col., 2003).

Aplicaciones

En la industria de detergentes se han utilizado enzimas alcalófilas, estos detergentes contienen aproximadamente 25% w/w de estas enzimas. Recientemente las proteasas alcalinas son producidas por cepas de *Bacillus* alcalófilos y estas son comercialmente utilizadas en procesos industriales. En la Tabla 4 se muestran las principales enzimas de los alcalófilos y sus aplicaciones industriales (Horikoshi, 1999).

MICROORGANISMOS ALCALÓFILOS	ENZIMA	APLICACIÓN
	Amilasas y lipasas	Detergentes
	Proteasas, celulasas	Detergentes, alimentos
	Ciclodextrinas	Estabilización de sustancias volátiles
	Antibióticos	Industria farmacéutica

Tabla 4. Enzimas y otros metabolitos de alcalófilos y sus aplicaciones.

ACIDÓFILOS

Hasta ahora se conocen muy pocos organismos capaces de vivir en medios con pH cercano a cero, sin embargo cuando los valores son más moderados hay un gran profusión. Se consideran acidófilos aquellos organismos que viven en medios con pH menor a 5 (Madigan y col., 2003).

Ambientes

Los ambientes ácidos surgen naturalmente de actividades geoquímicas, como pueden ser la producción de gases sulfurosos de emanaciones volcánicas. También es posible crear ambientes ácidos debido a la propia actividad o metabolismo de los organismos (Río Tinto España). Otro lugar donde es posible encontrar acidófilos es en las escorias de las minas, como por ejemplo en “The Iron Mountain Mine” en California, Estados Unidos donde vive un archaea *Ferroplasma acidarmanus* en disoluciones de pH 0.5 a 1.

Adaptaciones

Para soportar el pH bajo, los acidófilos emplean una gama de mecanismos, por ejemplo: una superficie de membrana cargada positivamente, una alta capacidad tampón interna, sobre-expresión de H^+ que exporta las enzimas y sistemas únicos del transporte (Wiegel y Keubrin, 2004; Horikoshi, 1999;. Kar y Dasgupta, 1996).

Ejemplos

Bacterias

En la Tabla 5 se muestra algunas bacterias acidófilas y su asociación a ambientes con alta temperatura.

RELACIÓN CON LA TEMPERATURA	ESPECIES
Mesófilos	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>T. thiooxidans</i> , <i>T. prosperus</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> .
	<i>Acidiphilum cryptum</i>
	<i>T. acidophilus</i> , <i>T. organovorans</i> , <i>T. cuprinus</i> .
Termófilos moderados	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> , <i>Metrallosphaera sedula</i> .

Tabla 5. Bacterias acidófilas y su relación con la temperatura.

Arqueas

Ferroplasma acidarmanus, un acidófilo extremo que vive en ambientes de pH cercano a cero. Este archaea ha sido aislado y se estudia su mapa genético. Recientemente se añadieron dos nuevos procariotas a la escasa lista de organismos acidófilos; *Picrophilus óciame* y *Picrophilus torridus*, (Edwards y col., 2000).

Eucariotas

Cyanidium caldarium, es capaz de vivir en pH cercano a cero, manteniendo el interior de la célula en un nivel casi neutro. *Acontium cylatium*, *Cephalosporium sp.*, y *Trichosporon cerebriae*, son tres eucariotas del reino fungi. Los últimos en añadirse a la lista son *Picrophilus oshimae* y *P. torridus* (Schleper y col., 1995).

Aplicaciones

La acidez que producen las bacterias acidófilas desempeña una función beneficiosa en minería y la solubilidad del metal. El sulfuro al combinarse con muchos metales, forma minerales muy insolubles, y muchas de las minas de donde se extraen dichos metales son sulfuros. Si la concentración del metal en la mina es baja, es posible que no sea económicamente rentable concentrar el mineral por medios químicos convencionales. En estas condiciones se suele aprovechar la lixiviación microbiana. Resulta especialmente útil en el caso del cobre, ya que el sulfato de cobre que se forma durante la oxidación de las minas de sulfuro HS^- , se oxida espontáneamente en contacto con el aire. La mayoría de los sulfuros metálicos también se oxidan espontáneamente, pero a mucha menor velocidad que el sulfuro libre. Bacterias como *Thiobacillus sulfolobus* pueden actuar de catalizadores y acelerar la tasa de oxidación de los minerales que contienen sulfuro, ayudando a la solubilización del metal (Madigan y col., 2003).

Además de llevar a cabo procesos de desulfuración los acidófilos cuentan con enzimas de interés industrial, como se muestra en la Tabla 6.

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMOS ACIDÓFILOS	Amilasas, glucoamilasas	Procesamiento de almidón
	Proteasas, celulasas	Componentes alimenticios
	Oxidasas	Desulfuración de carbón

Tabla 6. Enzimas de acidófilos y sus aplicaciones

XERÓFILOS

La pérdida de pequeñas fracciones de agua intracelular puede ser letal para muchas células, sin embargo existen ciertos organismos que pueden sobrevivir a una extrema desecación incluso durante largos periodos de tiempo. Los microbios especializados que pertenecen a los hongos, líquenes y algas tienen la capacidad de crecer en tales condiciones extremadamente secas. Estos organismos especializados se llaman los xerófilos (Madigan y Mairs, 1997; Rothschild y Manicinelli, 2001).

Ambientes

Los organismos capaces de sobrevivir en condiciones de extrema sequedad van desde colonias de bacterias hasta colonias simbióticas de algas como hongos (líquenes). Generalmente las colonias de bacterias sobreviven mejor en las rocas expuestas al sol, pero en el caso de que las rocas hayan sido colonizadas previamente por líquenes las bacterias no pueden desarrollarse plenamente. Esto puede deberse a diferencias en la humedad o por ácidos orgánicos producidos por los líquenes.

Adaptaciones

Disacáridos como la sacarosa, protegen a las membranas y proteínas de la desecación estando relacionada la acumulación de estos disacáridos con la longevidad de ciertos organismos. Cuando se retira el agua de la capa de fosfolípidos de la membrana el disacárido actúa de forma que mantiene las membranas desecadas en un estado físico similar al de las membranas hidratadas.

Las bacterias absorben manganeso y hierro de la atmósfera y lo precipitan sobre la superficie de las rocas como una capa negra de óxido de manganeso o como una rojiza de óxido de hierro. Esta pequeña capa de precipitado también incluye partículas de arcilla cementadas que ayudan a las bacterias a combatir la desecación (Madigan y col., 2003).

Ejemplos

Bacterias

Se conocen varios tipos de bacterias xerófilas como *Metallogenium* y *Pedomicrobium*. Su tamaño varía desde 0.4 a 2 micrómetros de largo por lo que son realmente muy pequeñas para producir ATP, ya que no cuentan con mitocondrias, utilizan la oxidación del manganeso y el hierro.

Eucariotas

Aunque los líquenes pueden soportar condiciones ambientales de extrema sequedad, generalmente no son tan resistentes como los microbios. El liquen se deseca muy rápidamente y puede perder hasta el 98% de su contenido en agua. Puesto que son los primeros en colonizar las rocas tienen un papel muy importante en la formación de suelos atacando la superficie de la roca y arrancando fragmentos microscópicos de ésta (Madigan y Marrs, 1997; Rothschild y Manicinielli, 2001; Cavicchioli y Thomas; 2000).

Aplicaciones

Debido a que los estudios actualmente son muy limitados, el potencial biocatalítico de los microorganismos xerófilos y de sus enzimas todavía no se conoce.

METALÓFILOS

Los microorganismos que pueden crecer en la presencia de altas concentraciones de metales se llaman metalófilos.

Ambientes

Estos organismos, incluyendo varios miembros del género *Ralstonia*, colonizan los sedimentos, los suelos o las basuras industriales con alto contenido de metales pesados.

Adaptaciones

Una característica típica de *Ralstonia* (metal-resistente) es la presencia de grandes plásmidos que contienen genes para la múltiple resistencia a los metales pesados. Estos plásmidos confieren resistencia al Zn, Cd, Co, Pb, Cu, Ni y Cr.

Ejemplos

Ralstonia metallidurans, bacteria Gram-negativa no esporulada, se desarrolla en concentraciones milimolares de metales pesados tóxicos. Fue el primer aislado en 1976 del lodo de un tanque de decantación del cinc en Bélgica el cual había sido contaminado con metales pesados en elevadas concentraciones.

Aplicaciones

Puesto que la contaminación por metales pesados plantea una amenaza a la salud pública, a la industria pesquera y a la fauna, existe un interés creciente en desarrollar sistemas que puedan remover o neutralizan los efectos tóxicos de metales pesados en suelos, sedimentos y aguas residuales (MacElroy, 1974; Madigan y Marrs, 1997; Rothschild y Manicinelli,

2001). Muchos microorganismos, incluyendo *Ralstonia*, se podrían utilizar en la bioremediación de metales pesados. Estas bacterias también pueden ser utilizadas para inmovilizar ciertos metales pesados eficientemente. Esto sería posible debido a su capacidad para reducir dichos elementos a un estado redox mas bajo, produciendo metales con baja bioactividad. Las bacterias metalófilas exhiben un gran número de actividades enzimáticas que transforman ciertos metales por medio de reacciones como oxidación, reducción, mutilación y alquilación. Las transformaciones enzimáticas que conducen a la precipitación y a la inmovilización del metal estan siendo aplicadas a la biorremediación (Mergeay y col., 2003; Valls y de Lorenzo, 2002).

PIEZÓFILOS (Barófilos)

Los microorganismos que gustan para su desarrollo y crecimiento de las condiciones de alta presión (superior a 1 atm) se llaman piezófilos (conocidos antes como barófilos). Los organismos aislados a profundidades marinas de alrededor de 400 m y utilizados en estudios que relacionan el crecimiento o la actividad metabólica con la presión, demuestran que son barotolerantes, se han obtenido barófilos en profundidades mayores, entre 5.000 y 6.000 m; mientras que a profundidades mayores de 10.000 m se han obtenido barófilos extremos (estrictos) (MacElroy, 1974; Madigan y Marrs, 1997; Rothschild y Manicinelli, 2001; Gomes y Steiner, 2004).

Ambientes

Se encuentran en las profundidades marinas. Los océanos son el principal hábitat para los piezófilos, incluyendo varios termófilos e hipertermófilos (Abe y Horikoshi, 2001).

Adaptaciones

Un organismo que crece a presión elevada experimenta un aumento en la concentración de ácidos grasos no saturados presentes en la membrana plasmática. La velocidad de crecimiento relativamente lenta de los barófilos se debe, por una parte, a una combinación de efectos de la presión sobre los procesos bioquímicos de la célula y, por otra, a que estos organismos sólo crecen a bajas temperaturas, que causan una considerable disminución de la velocidad de las reacciones químicas.

Los factores de importancia global para el incremento de la estabilidad térmica son la superficie electrostática, la composición de aminoácidos (tales como una disminución de residuos termolábiles), interacciones entre cationes y anillos aromáticos entre otros (Yano y Poulos, 2003; Pledger y col., 1994; Hei y Clark, 1994).

Ejemplos

Los piezófilos se distribuyen entre los géneros *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Methanococcus*, *Pyrococcus* y *Thermus* (Yano y Poulos, 2003; Abe y Horikoshi, 2001).

Aplicaciones

Las enzimas de los piezófilos que son estables a presiones elevadas han sido aisladas de una amplia variedad de microorganismos, la mayoría de los cuales también son termófilos o psicrófilos con crecimiento óptimo arriba de una atmósfera (Yano y Poulos, 2003; Abe y Horikoshi, 2001).

Durante el proceso y la esterilización de los materiales para alimentos, las altas presiones que superan los 100 MPa se pueden utilizar para inducir la formación de geles, gránulos de almidón, desnaturalización y coagulación de proteínas; así como la transición de las fases de lípidos. El uso de la alta presión es utilizada para mejorar la conservación del sabor y del color de ciertos productos. Por lo tanto, las enzimas que pueden funcionar a presión y temperatura elevadas tienen grandes ventajas en procesos biotecnológicos (Yano y Poulos, 2003; Abe y Horikoshi, 2001; Hayashi, 1996; Ludwig y col., 1996; Mozhaev y col., 1994).

Aunque existen muchos posibles usos biotecnológicos de los piezófilos y sus enzimas, hay pocos usos prácticos conocidos. Esto es debido al hecho de que no es fácil cultivar este tipo de microorganismos bajo condiciones seguras de presión elevada. Por lo tanto, las características de estas enzimas y de otros componentes celulares aún son objeto de estudio (Yano y Poulos, 2003; Abe y Horikoshi, 2001).

MICROORGANISMOS HALÓFILOS

Las bacterias halófilas al pertenecer al grupo de microorganismos extremófilos capaces de vivir en ambientes salinos ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la biotecnología.

Los microorganismos no halófilos capaces de crecer tanto en ausencia como en presencia de sal, son llamados halotolerantes; aquellos halotolerantes que son capaces de crecer aproximadamente al 15% (w/v) de NaCl (2.5 M) son considerados halotolerantes extremos.

Los microorganismos que requieren sal para su crecimiento son llamados halófilos. De acuerdo a la definición de Kushner (1978), es posible distinguir entre halófilos débiles, como lo son la mayoría de los organismos marinos, considerando que el agua de mar contiene cerca de 3% (w/v) de NaCl; halófilos moderados cuyo crecimiento óptimo se encuentra en un rango de 3% y 15% (w/v) de sal; así como halófilos extremos, que presentan un crecimiento óptimo al 25% (w/v) de NaCl. (Margesin y Schinner, 2001).

Ambientes

La ecología y diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada. Muchos de estos microorganismos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta (Ventosa y col. 1998).

En la Tabla 7 se mencionan algunos de los puntos geográficos característicos de los diferentes ambientes salinos, el rango de salinidad que presentan así como el pH característico en su caso.

Lagos salinos	Suelos salados	Hábitats salinos y fríos	Hábitats salinos y alcalinos	Alimentos salados	Hábitats poco comunes
Salinas de España y Salar de Atacama, Chile (15 a 30%)	Mar Rojo (25 a 30%)	Antártida, 300 lagos hipersalinos (28%)	Lago Magadi, Kenia y Lago Wadi Natrun, Egipto (pH = 9) (10%)	Pescado seco y salsa de soya (6.5 a 10%)	Plantas del desierto: <i>Atriplex halinus</i> , Desierto Neguev, Israel (0.5 a 20%)
Lago Assal, en Djibouti, Somalia Africa (27.7%)					
Lago salado de UTAH E.E. U.U. (22%)	Alicante España (2.4 a 12.7%)	Vestfold Hills, lago salino frío Antártica (0 a 5 °C) (0.5 a 20%)	Lago Venere, Isla Pantelleria, Italia (pH = 9.7) (9 a 17%)	Bacalao (19%)	Animales del desierto: Fosas nasales de iguanas (12%, 45°C)
Mar muerto (28%)		Valles Dry, suelo salino (12%, -40°C)			

Tabla 7. Ecología de los microorganismos halófilos, diferentes habitats salinos

Adaptaciones

Osmoadaptación bacteriana

Los seres vivos están permanentemente expuestos a determinados factores biológicos, físicos o químicos existentes en el medio ambiente. Dichos factores se encuentran sujetos a variaciones que pueden amenazar la supervivencia de los organismos, lo que hace necesario desarrollar estrategias de adaptación a estas variables. Uno de estos parámetros es la concentración de solutos, no solo importante en ambientes hipersalinos, sino en cualquier ambiente natural en los que la desecación o la lluvia pueden provocar importantes variaciones en la osmolaridad. La osmolaridad es la presión osmótica de una solución,

expresada en moles de soluto por litros de solución (Wood, 1999). Un aumento en la presión osmótica del medio conlleva a una baja actividad de agua lo que provoca una deshidratación por parte de la célula, lo que puede suponer su muerte (Bremen y Krämer, 2000). En procariotas la osmoadaptación comprende un complejo sistema de mecanismos fisiológicos y genéticos de adaptación al estrés osmótico. Así los microorganismos halotolerantes y halófilos han desarrollado una serie de mecanismos específicos de adaptación a elevadas concentraciones salinas, que posiblemente se encuentren conectados entre si formando un complejo circuito que se encuentra osmorregulado. Las dos primeras respuestas específicas de la célula frente a un aumento de la presión osmótica externa son la adaptación de la composición lipídica de las membranas y la acumulación citoplasmática de compuestos osmoprotectores para compensar el estrés osmótico (Oren, 1999).

Respuesta específica al estrés osmótico

Adaptación de la composición lipídica de las membranas

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos. Con respecto a los fosfolípidos, a medida que aumenta la salinidad, la membrana se enriquece en fosfatidilglicerol y/o en di-fosfatidilglicerol (cardiolipina), fosfolípidos cargados negativamente, a costa de una disminución en la fosfatidiletanolamina (PE), un fosfolípido neutro (Russell, 1993). Estas modificaciones en la composición de lípidos

polares aportan consistencia a la membrana, a la vez que son necesarios para mantener la estructura en doble capa lipídica (Russell, 1993), ya que PE, en respuesta a la salinidad, tiende a formar fases en una única capa.

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana también experimenta modificaciones con respecto a la temperatura y la salinidad, siendo estos diferentes en bacterias Gram negativas y Gram positivas. Así en bacterias halófilas moderadas Gram negativas, el cambio más destacable es un aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos a costa de los insaturados, de los cuales derivan. Este efecto se ha descrito en *Pseudomonas halosaccarolytica* (Monteoliva-Sánchez y col., 1993), *H.halmophila* (Monteoliva-Sánchez y col., 1988), *H.canadiensis* (Adams y col., 1987), *H.salina* (Valderrama y col., 1998) y *Chromohalobacter salexigens*. La transformación de ácidos grasos insaturados en ciclopropánicos proporcionaría a la célula una disminución en la fluidez de la membrana y contribuyendo así a mantener la integridad de la misma (Russell, 1993).

Compuestos osmoprotectores

Sin duda, la principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos y halotolerantes para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación. El primero de ellos, denominado mecanismo “*salt-in*” es típico de Arqueas y *Haloanaerobiales* (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K⁺ y Cl⁻. El aumento en la concentración de

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

El segundo mecanismo conocido como “*salt out*”, es el que utilizan las bacterias tanto halófilas como no halófilas, además de las arqueas metanógenas halófilas moderadas. Así, éstos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan **solutos compatibles** (Brown, 1976). Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede, por ejemplo cuando las bacterias se cultivan en un medio mínimo (Galinski, 1995). Dado el ahorro de energía que supone para la célula, el transporte es preferido a la síntesis “*de novo*” (Oren, 1999). Los osmoprotectores incorporados desde el medio externo son acumulados junto con los producidos por la célula, o bien pueden reemplazarlos totalmente. A su vez, existen canales proteicos que responden frente a un choque hipo osmótico, diferentes a los sistemas de transporte, que funcionan como válvulas de seguridad, permitiendo la expulsión de los solutos compatibles acumulados (Wood y col., 2001). La mayor flexibilidad y versatilidad de este mecanismo explica el hecho de que

se encuentre mucho más extendido en la naturaleza, habiéndose observado también en hongos, plantas y animales, incluso en células humanas (Ventosa y col, 1998).

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

Los solutos compatibles que acumulan las bacterias halófilas moderadas se han identificado recientemente mediante técnicas de RMN y HPLC. Dichas técnicas han permitido, entre otros avances, identificar a las tetrahidropirimidinas (ectoína e hidroxiectoína), y elucidar las rutas biosintéticas de varios solutos compatibles. A continuación se describen los principales solutos compatibles.

Aminoácidos

Aunque este tipo de compuestos fueron los primeros solutos compatibles que se identificaron, no parecen tener una gran importancia en bacterias halófilas moderadas. La excepción la constituye la prolina, que es acumulada por algunas especies Gram positivas como *Salinococcus roseus* y *S.hispanicus* (Galinski y Trüper, 1994).

Sin embargo en bacterias no halófilas, los aminoácidos parecen poseer una mayor importancia. Así, la prolina es un importante osmoprotector en *Bacillus subtilis*, donde recientemente se ha elucidado su ruta biosintética en *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. El glutamato es el anión regulado osmóticamente más abundante en enterobacterias. Asimismo éstas también acumulan alanina y glutamina aunque a niveles muy inferiores (Belitsky y col., 2001).

Azúcares

En muchos microorganismos incluyendo algunas bacterias halófilas moderadas, es frecuente la acumulación de sacarosa y trealosa como respuesta a un choque hiperosmótico, aunque estos compuestos alcanzan concentraciones intracelulares poco elevadas, inferiores a 500 mM (Galinski y Trüper, 1994), y sólo pueden reemplazar parcialmente a los solutos compatibles nitrogenados. En *E.coli*, sin embargo, la trealosa es el principal osmoprotector que se acumula cuando se cultiva en medio mínimo, teniendo lugar su síntesis a partir de la glucosa-6-fosfato en respuesta a un choque hiperosmótico. Los genes responsables de la síntesis (*otsAB*) están regulados por la osmolaridad del medio y la fase estacionaria de crecimiento del cultivo (Lucht y Bremer, 1994). La trealosa también interviene en la protección de la célula frente a otros tipos de estrés, como el calor, la desecación, o la congelación (Strom y Kaasen, 1993). Sin embargo, la trealosa no funciona como agente osmoprotector si se suministra externamente (Larsen y col., 1987).

Glicina betaina (Betaina)

La mayoría de las bacterias, incluyendo las bacterias halófilas moderadas, acumulan betaina como principal soluto compatible cuando se cultivan en medio complejo con elevadas

concentraciones salinas. La betaína se acumula tras su transporte desde el medio externo, o bien por oxidación de su precursor, la colina. También existen bacterias capaces de sintetizar betaína “de novo”. Esta síntesis muy común en bacterias fotótrofas, no se observa en quimioheterótrofas, a excepción de las halófilas extremas *Actinopolyspora halophila* y *Halothiorhodospira halochloris* (Severin y col., 1992). Esta ruta de síntesis que se inicia a partir del aminoácido glicina, comprende tres reacciones de metilación, con sarcosina y la dimetilglicina como intermediarios, y la S-adenosil metionina como donador de grupos metilos (Nyysola y col., 2000).

Los mecanismos de transporte y de síntesis de betaína por oxidación de colina han sido estudiados en profundidad en bacterias no halófilas como *B.subtilis* (Kappes y col., 1996), *E.coli* (Lamark y col 1991), *S.typhimurium* (Overdier y col., 1989) y *Sinorhizobium meliloti* (Pocard y col., 1997). En bacterias halófilas moderadas, estos estudios son más recientes, destacando la caracterización bioquímica del sistema de transporte de alta afinidad por betaína, y la clonación de los genes de síntesis de betaína a partir de colina en *C.salexigens* (Cánovas y col., 1998).

Ectoína e hidroxiectoína

La ectoína (2-metil-4-carboxi-3, 4, 5, 6-tetrahidropirimidina) se describió por primera vez en la bacteria purpúrea fotosintética *Halorhodospira halochloris* (anteriormente *Ectothiorhodospira halochloris*, de donde proviene el nombre de ectoína) (Galinski y col., 1985), aunque se encuentra ampliamente distribuída en bacterias, así como su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína (2-metil-4-carboxi, 5-hidroxi-3, 4, 5, 5-tetrahidropirimidina). La ectoína se forma por deshidratación intramolecular del ácido N- γ -acetildiaminobutírico

(NADA), que da lugar a la formación del derivado pirimidínico. La ruta biosintética de la ectoína fue elucidada en *H.halochloris* y *H.elongata* por Peters y col. (1990). Esta ruta comienza con la transformación del aspartato semialdehído en ácido diaminobutírico (DA) que a su vez, es transformado en ácido N-acetildiaminobutírico (NADA) que es convertido finalmente en ectoína. Se han aislado y caracterizado parcialmente las enzimas implicadas en dicha ruta en *H.elongata* (Ono y col., 1999); la DA transaminasa, la DA acetil transferasa y la NADA deshidratasa, más conocida como ectoína sintasa. En *Brevibacterium linens* (Bernad y col., 1993) y *Streptomyces parvulus* (Inbar y Lapidot, 1988) se ha propuesto la existencia de una ruta biosintética alternativa a partir del glutamato.

El primer implicado en la síntesis de ectoína que se ha secuenciado es el gen *ectC* de *Halomonas sp.* KS-3, clonado por PCR mediante oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de la secuencia de la enzima ectoína sintasa (Min-Yu y col., 1993). Hasta el momento se han caracterizado los genes de síntesis de ectoína de *Marinococcus halophilus* (Louis y Galinski, 1997), *H.elongata* (Göller y col., 1998), y *Sporosarcina pasteurii* (Kuhlmann y Bremer, 2002).

Por el momento no se ha podido aún determinar completamente la ruta de síntesis de hidroxiectoína, desconociéndose los intermediarios y las enzimas implicadas. En *H.elongata* (Göller y col., 1998) y *C.salexigens* existen evidencias de que la hidroxiectoína se forma a partir de la ectoína por hidroxilación directa, y recientemente se ha postulado la existencia en *C.salexigens* de una ruta alternativa de síntesis a partir de NADA, precursor inmediato de la ectoína (Cánovas y col, 1999).

En las especies del género *Halomonas* y en *C.salexigens*, la ectoína y la hidroxiectoína son los solutos predominantes cuando las células se cultivan en un medio sin betaína o colina (Wohlfarth y col., 1990), alcanzando concentraciones considerablemente elevadas, que son suficientes para conseguir, junto con los iones intracelulares, un equilibrio osmótico con el medio. Por otro lado, en la cepa tipo de *H.elongata* se ha observado que el transporte de betaína no es suficiente para suprimir la síntesis de ectoína, aunque parece ser que la desplaza a concentraciones salinas más elevadas (Wohlfarth y col., 1990). Así en cultivos de *H.elongata* en medio complejo con 0.85 M; de NaCl a 40°C, solo se detectó acumulación de betaína, mientras que a 1.7 M de NaCl se observó la acumulación de ambos solutos compatibles.

Otros solutos compatibles de origen bacteriano

Existe una amplia gama de compuestos solutos compatibles cuya composición química varía dependiendo de la especie bacteriana que los sintetiza. Además de los descritos anteriormente, destaca especialmente el glucosilglicerol, que es acumulado por un gran número de cianobacterias halófilas moderadas. También se ha destacado en *Rhodobacter sulfidophilus*, *Pseudomonas mendocina* y *P.alkaligenes* y *C.salexigens*.

Por otro lado, en algunas bacterias Gram positivas, como *Halobacillus halophilus*, *Planococcus sp.* y *Sporosarcina halophila*, mediante ¹³C-RMN se han podido detectar diaminoácidos N-acetilados, como la Nε-acetilisina y la Nδ-acetilomitina (Wohlfarth y col., 1990; Severin y col., 1992).

En la arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus* (Martins y Santos, 1995) se ha detectado la acumulación de manosilglicerato y di-mio-inositolfosfato en respuesta a aumentos de temperatura o salinidad. El manosilglicerato se acumula preferentemente al aumentar la salinidad, mientras que el di-mio-inositolfosfato se acumula a temperaturas superiores a la temperatura óptima de crecimiento (Da Costa y col., 1998) Por otro lado, en varias especies del género *Thermococcus* se ha identificado un nuevo soluto compatible, la β -galactopiranosil-5-hidroxilisina, que probablemente se sintetiza a partir de la peptona presente en el medio de cultivo (Lamosa y col., 1998).

Por último, cabe destacar que además de los solutos compatibles obtenidos por síntesis, muchas bacterias son capaces de transportar desde el medio extracelular una gran variedad de compuestos que pueden actuar como osmoprotectores. Dichos compuestos, liberados al medio por otros microorganismos tras un choque hipoosmótico, o provenientes de la muerte celular de animales o plantas, son captados por transportadores de baja especificidad por sustrato. Los solutos compatibles disponibles tras su transporte son innumerables. Un ejemplo en la incorporación desde el medio externo de poliamidas (putrescina, cadaverina, espermidina y espermita) por *Salinivibrio costicola* (Kamekura y col., 1986), aun que no parece que aumenten su estabilidad osmótica tras un choque hipoosmótico. En *Halomonas* y *Chromohalobacter* también se ha detectado espermidina, aunque en concentraciones similares a las encontradas en bacterias no halófilas.

Ejemplos

Bacterias

La mayoría de las bacterias halófilas, Gram positivas y Gram negativas; aerobias o anaerobias facultativas son consideradas como miembros de los géneros: *Halomonas*, *Delega*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* y *Chromobacterium* (Ventosa y col., 1998).

Arqueas

Las arqueas halófilas se distribuyen en seis géneros principales, de los cuales cuatro incluyen miembros que crecen a pH neutro: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* y *Halococcus*. Los miembros pertenecientes a los géneros *Natronobacterium* y *Natronococcus* requieren condiciones alcalinas para su crecimiento (DasSarma, 1995).

Dentro de las especies más estudiadas, se puede mencionar, *Halobacterium halobium*, principal habitante del Gran Lago Salado de Utah en Estados Unidos, se adapta a la alta concentración de sal y escasez de oxígeno (es aerobia), desarrollando una proteína en la membrana llamada bacteriorodopsina; esta proteína contiene pigmentos que dan un color púrpura a la membrana y su capacidad de reaccionar ante la luz crea un gradiente protónico en la membrana, permite la síntesis del ATP, importar iones de potasio o exportar los del sodio; *Halobacterium salinarum*, concentra cloruro de potasio en su interior para evitar la deshidratación. Su crecimiento óptimo se da a 50°C, un pH 7.2 y concentraciones de NaCl de 3.5 a 4.3 M. también utiliza la bacteriorodopsina (Javor, 1989).

Eucariotas

Hay un amplio rango de grupos taxonómicos eucariotas, aunque muy pocos han sido estudiados en cultivos. *Dunaliella salina*, vive en lagos salados en los que muchas veces es la única alga presente. Sintetiza altas concentraciones del glicerol intracelular 7 M (56%) como soluto compatible para mantener el balance osmótico.

Aplicaciones

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, debido a que no solo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. A continuación se describen algunas de las más interesantes aplicaciones de estos microorganismos.

Solutos compatibles

Las bacterias halófilas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles, y que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad. También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática (biosensores, PCR, etc.) y en la industria farmacéutica y cosmética. Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como la

lactato deshidrogenasa y la fructoquinasa. Así, en diversos estudios en los que se comparó el efecto protector sobre estas enzimas de distintos solutos compatibles (glicina betaina, trealosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares), se puso de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores al calor y los procesos de congelación y descongelación (Brown, 1976; Louis y col., 1994; Margesin y Schinner, 2001).

Biodegradación de residuos

Las bacterias halófilas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos. Constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas. Esto sucede por ejemplo en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas (Oren y col., 1993).

Enzimas.

Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad. La mayoría de las enzimas halófilas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado a la fecha provienen de bacterias halófilas moderadas. Así se han descrito varias hidrolasas de interés industrial de tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y 5'-nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas. En la Tabla 8 se ejemplifican las enzimas más importantes producidas por halófilos (Kamekura y col., 1992).

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMOS HALÓFILOS	Proteasas	Síntesis peptídica
	Deshidrogenasas	Biocatálisis en medio orgánico

Tabla 8. Enzimas de microorganismos halófilos y sus aplicaciones

Alimentos fermentados

Las bacterias halófilas también tienen diversas aplicaciones en el campo de la alimentación. Así en la elaboración de la salsa de soya intervienen determinadas especies del género *Tetragenococcus*. Los granos de trigo y soya se resuspenden en agua con NaCl al 19% y se deja durante 9 meses en oscuridad. *T. halopila* se emplea como indicador de la fermentación pudiendo alcanzar una densidad de 10^8 UFC/ml en la salsa de soya, que contiene una concentración aproximadamente 3M de NaCl (Röling y Van Verseveld, 1996).

Polímeros

Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolera. Gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así su tensión superficial. Las bolsas de petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros (Ventosa, 1988).

ACTINOMICETOS HALÓFILOS

El número de actinomicetos halófilos que se conocen actualmente es muy reducido, en los últimos años se han reportado muy pocos géneros de actinomicetos halófilos; de modo que el estudio de la biología de actinomicetos halófilos incluyendo su aislamiento identificación y caracterización empieza a mostrar la diversidad de estos microorganismos en varias partes del mundo.

En 1975 se dio a conocer por vez primera el reporte de un actinomiceto capaz de crecer en altas concentraciones de salinidad, *Actinopolyspora halophila*, (Gochnauer, 1975). Dieciséis años mas tarde, en 1991, se reporta el segundo actinomiceto halófilo, *A.mortivallis* (Yosida, 1991). En los años siguientes y hasta 2003 se reportaron 13 especies mas, existiendo hasta la actualidad 15 miembros conformando este grupo. A continuación se presenta de manera breve las principales características de los actinomicetos halófilos reconocidos a la fecha. Tabla 9.

MICROORGANISMO	PROCEDENCIA	CRECIMIENTO ÓPTIMO % NaCl
<i>Actinopolyspora. halophila</i>	Contaminante en medio con 25% de NaCl. Canadá	10
<i>A. mortivallis</i>	Suelo salado. Valle de la muerte, California, E.E. U.U.	5 - 25
<i>A. iraqiensis</i>	Suelo salino. Iraq	10 - 15
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Suelo salado. Alicante, España.	10
<i>Nocardiopsis halophila</i>	Suelo salino. Iraq	20
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	Salinas de Kunsan. Korea	10
<i>Nocardioides aquaticus</i>	Lago salado Ekho. Antártida	1-6
<i>Friedmanniella lacustris</i>	Lago salado Ekho. Antártida	4
<i>Streptimonospora salina</i>	Lago salado Oeste de China	15
<i>Saccharomonospora halophila</i>	Suelo pantanoso Kuwait	10
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10
<i>Streptomonospora alba</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10 - 15
<i>Prauserella halóphila</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10
<i>Prauserella alba</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10

Tabla 9. Actinomicetos halófilos aislados en diferentes partes del mundo

Actinopolyspora halophila.

Fue aislada como un contaminante de un medio de cultivo que contenía 25% de NaCl, ha sido clasificada como *A.halophila* en la familia *Nocardiaceae*. La morfología y características bioquímicas de este microorganismo lo distinguen de otros miembros de la

familia *Nocardiaceae* y otros géneros poseedores de pared celular tipo IV. Requiere altas concentraciones de NaCl para crecer y puede crecer hasta en NaCl a saturación. La concentración mas baja que le permite crecer en medio líquido es 12%, mientras que en medio sólido es 10%. Las colonias desarrolladas a bajas concentraciones de sal, presentan cavidades semejantes a placas virales. No presenta crecimiento en medios que contienen 30% de KCl en lugar de NaCl. Este organismo puede crecer en medio simple con sales de NH_4^+ como fuente de nitrógeno y diferentes azúcares, así como otros componentes como fuentes de carbono. No obstante, tiene un requerimiento casi tan grande como los cocos y bacilos; contiene ácido m-diaminopimélico y es sensible a la lisozima, ambas propiedades sugieren la presencia de una pared celular mucopeptídica. También contiene algunos fosfolípidos comunes de otros actinomicetos sin embargo no contiene lípidos característicos de otras bacterias halófilas extremas. Produce ácido a partir de ramnosa y fructosa. Utiliza los siguientes sustratos como fuente de carbono y energía: fructosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, manitol e inositol. Hidroliza Tweens 20, 40, 60 y 80. Hidroliza la caseína. No hidroliza urea, xantina y almidón. No reduce nitratos. Licua la gelatina. Su rango de temperatura es 10 – 43°C, con un óptimo de 37°C. Es sensible a la lisozima y resistente a la penicilina. Su contenido de G + C es 64.2 mol% (Gochnauer y col. 1975).

Actinopolyspora iraqiensis.

Aislada de una muestra de suelo de Iraq. Presenta crecimiento óptimo en un rango de 10 a 15% de NaCl en medio líquido. El rango de temperatura óptima es entre 30 y 35°C. Las colonias son pequeñas (2 - 4 mm de diámetro) elevadas y convexas La masa de esporas blanca y abundante en medio sólido al 10 -15% de NaCl. El micelio aéreo forma cadenas cortas de esporas, las esporas son esferoidales y de superficie lisa con diámetro de 1 μm . La

pared celular contiene principalmente *meso*-DAP y cantidades traza de L-DAP. La hidrólisis de la pared celular contiene arabinosa, galactosa y ribosa. Las menaquinonas predominantes son MK-9 (H₄). Los fosfolípidos incluyen fosfatidil colina, lisofosfatidil glicerol, fosfatidil glicerol, y difosfatidil glicerol. Los ácidos micólicos están ausentes. Utiliza glucosa, maltosa, manitol, sacarosa, fructosa, L-arabinosa, inositol rafinosa y galactosa como fuente de carbono. No presenta crecimiento en L-ramnosa, D-xilosa o manosa. Produce ácido a partir de manitol y rafinosa. Hidroliza el almidón, xantina y tween 80. No hidroliza urea, esculina y celulosa. Sensible a lisozima. Es sensible a los siguientes antibióticos: amoxicilina, carbencilina, cefalexina, cloranfenicol, eritromicina y novobiocina. Resistente a: clindamicina, oxacilina y vancomicina (Ruan y col. 1994).

Actinopolyspora mortivallis.

Aislado de suelo salado del Valle de la Muerte, California E.E U.U. Crece en medio con un rango de 5 – 25% de NaCl. Presenta micelio aéreo ramificado y cadenas de esporas. Las esporas son ovas o cilíndricas. Descompone la caseína y la xantina. Hidroliza Tweens 20, 40, 60 y 80. Utiliza las siguientes fuentes de carbono: xilosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y glucosa, pero no utiliza, ramnosa, manitol, inositol y arabinosa. Produce ácido a partir de: xilosa, sacarosa y glucosa. No reduce nitratos. Licua la gelatina. Peptoniza leche. Es sensible a penicilina a concentraciones de 10 µg/ml. El rango de temperatura de crecimiento es de 10 – 50 °C con un óptimo de 45°C. El rango de tolerancia a NaCl es 5 a 30%, con un crecimiento óptimo en concentraciones de NaCl entre 10 y 15% a 45°C. El contenido de G+C es 68 mol%. Se distingue de *A.halophila* por las siguientes características: descomposición de xantina, perfil de utilización de fuentes de carbón, reducción de nitratos, peptonización de leche (Yoshida y col. 1991).

Friedmanniella lacustris

Aislado de agua del Lago salado Ekho, Antártica. Cocos y bacilos pequeños con algún polímero extracelular en cultivos viejos, el tamaño de las células es de 0.9 – 1.3 μm con formación de esporas en el exterior formando agregados. Crece bien en medio PYGV + ASW con vitaminas. La temperatura óptima de crecimiento es de 26 °C. El pH óptimo es 7.5. tolera arriba de 6% (w/v) de NaCl con un óptimo de 4%. Azúcares de pared celular: glucosa, manosa, ribosa, ramnosa y galactosa. La principal menaquinona respiratoria es MK-9 (H₄) y MK-8 (H₄) como componente menor. Acidos grasos: ai-C_{15:0}. Los lípidos polares contienen fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y un fosfolípido no identificado. Los ácidos micólicos están ausentes. La composición de bases de DNA es de 73 mol% de G+C (Lawson y col. 2000).

Nocardioides aquaticus

Aislado de agua del Lago salado Ekho, Antártica. Cocos y bacilos pequeños en cultivos viejos, no móviles, con formación de esporas en el exterior, el tamaño de las células es de 0.9 – 1.0 μm . Crecen bien en medio oligotrófico PYGV y ASW, con bajas concentraciones de peptona, extracto de levadura y glucosa, así como sales minerales, vitaminas y ASW. Su temperatura óptima de crecimiento es de 16 – 26 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 7 - 8. El tipo de peptidoglicana es A 3 γ basado en la presencia del ácido meso-diaminopimélico, presenta glucosa y galactosa como azúcares de pared celular. La principal menaquinona es MK-8 (H₄) y como componentes menores MK-6 (H₄) y MK-7 (H₄). Presenta los ácidos grasos C_{18:1}, C_{16:0} y C_{17:0}. Los fosfolípidos presentes son fosfatidil inositol, fosfatidilglicerol. Ausencia de ácidos micólicos. La composición de bases de DNA es 69 mol% G + C (Lawson y col. 2000).

Nocardiopsis halophila

Aislado de una muestra de suelo salino en Iraq. Crece en medio sintético y orgánico a una concentración por arriba del 20% de NaCl (w/v) y es resistente a la lisozima. El hidrolizado de la célula completa contiene ácido meso diaminopimélico (pared celular tipo III). El fosfolípido predominante es de tipo PIII, predomina la menaquinona MK-10 (H₆, H₈), los ácidos micólicos están ausentes. Forma abundante micelio aéreo blanco y largas cadenas de esporas ramificadas que tienen apariencia de zig-zag, el micelio vegetativo es extensamente ramificado y poco fragmentado (Al-Tai y Ruan 1994).

Nocardiopsis kunsanensis

Es un actinomiceto halófilo moderado, aislado de una salina de Kunsan, República de Korea. El análisis del rDNA 16S indica que el aislado corresponde al género *Nocardiopsis*, pero es genéticamente diferente de otras especies de *Nocardiopsis*. Contiene ácido meso diaminopimélico, menaquinonas MK-10 (H₆, H₈), fosfolípidos tipo PIII. Es diferenciado de las especies de *Nocardiopsis* descritas debido a sus características morfológicas y fisiológicas (Chun y col. 2000).

Nocardiopsis lucentensis

Aislada de una muestra de suelo salado cerca de Alicante, España, el hidrolizado de la célula completa presenta el isómero meso del ácido diaminopimélico y azúcares no característicos. La composición de la pared celular es de tipo III. La principal menaquinona es MK-10 (H₈) y el tipo de fosfolípido es PIII (presenta fosfatidilcolina). Las cadenas de esporas son flexibles y en estadio temprano de esporulación se observa hifas aéreas en forma de zig-zag. Este microorganismo produce solutos compatibles del tipo ectoína; se

caracteriza por la presencia de micelio aéreo color blanco y micelio vegetativo color amarillo y café. El contenido de G + C es de 71.0 mol% (Yassin y col. 1993).

Nocardiopsis xinjiangensis

Aislada de una muestra de suelo salino de la provincia de Xinjiang, República Popular de China. Esta cepa muestra abundante micelio aéreo y vegetativo y cadenas cortas de esporas que nacen del micelio aéreo. Las esporas son bacilares con superficie rugosa no móviles. Contiene en su pared celular ácido *meso*-diaminopimélico, alanina y ácido glutámico (pared celular tipo III). Contiene glucosa, ribosa, galactosa, xilosa y arabinosa como azúcares de la pared celular. Los fosfolípidos predominantes son fosfatidil inositol y fosfatidil glicerol. Como menaquinonas predominantes contiene MK-10 (H₂) y MK-10 (H₄). Su contenido de G + C es de 74.3 mol% (Li y col. 2003a).

Prauserella halophila* y *Prauserella alba

Ambas cepas fueron aisladas a partir de una muestra de suelo colectada en la provincia de Xinjiang, China. Fueron aisladas usando agar almidón caseína complementado con 20% de NaCl. Aeróbicos Gram positivos. En medio Czapek el micelio aéreo es bien desarrollado y el micelio vegetativo es fragmentado. El micelio aéreo forma cadenas largas de esporas con ramificaciones cortas. De acuerdo al análisis filogenético y propiedades quimiotaxonómicas las dos cepas son consideradas miembros del género *Prauserella*. Ambas cepas difieren morfológicamente de *P.rugosa*. La cantidad de hibridación DNA-DNA revela valores de similaridad por debajo de 70% con *P.rugosa*. El contenido de G+C es de 65.8 y 66.7 mol% respectivamente (Li col. 2003b).

Saccharomonospora halophila

Aislada de suelo pantanoso en Kuwait, bacteria Gram positiva halofila, produce micelio aéreo azul a grisáceo con esporas solas o en pares. Los marcadores quimiotaxonómicos coinciden con *Saccharomonospora*. Contiene ácido *meso*-diaminopimérico, como aminoácido diagnóstico en la peptidoglicana. Los azúcares diagnósticos contenidos son arabinosa y galactosa. Presenta fosfatidil inositol, fosfatidiletanolamina, hidroxifosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina y difosfatidilglicerol. MK-9 (H₄), como menaquinona principal. La secuencia del 16S rDNA muestra un 96.8% de similitud con *S.cyanea* (Al-Zarban y col. 2002).

Saccharomonospora paurometabolica

Aislada de una muestra de suelo colectada en la provincia de Xinjiang, China. La morfología muestra las características típicas del género *Saccharomonospora*, micelio aéreo y vegetativo bien desarrollado, esporas solas que nacen del micelio aéreo, mientras que algunas esporas se encuentran esporádicamente solas naciendo del micelio vegetativo. La pared celular contiene ácido *meso*-diaminopimérico, presenta galactosa, arabinosa y ribosa como azúcares de la pared celular. La menaquinona principal es MK-9 (H₄), mientras que MK-9 (H₂) se encuentra en cantidades más pequeñas. Contiene los siguientes fosfolípidos, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e hidroxifosfatidiletanolamina. Su contenido de G+C es de 71 mol%. El análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA muestra una relación con *S.halophila* con un 98.7% de similitud. La hibridación DNA-DNA muestra una relación del 53.8% con *S.halophila* (Li y col. 2003c).

Streptomonospora alba

Aislada de una muestra de suelo colectada en la provincia de Xinjiang, China. Presenta micelio aereo y vegetativo. La pared celular contiene ácido meso diaminopimérico. El hidrolizado de la pared celular contiene galactosa y arabinosa. La composición de menaquinonas varía con el medio usado para cultivo celular; en medio extracto de levadura-glucosa complementado con 10% de NaCl, la menaquinona principal es MK-9 (H₄), mientras que en medio ISP 2 enriquecido con vitaminas, las menaquinonas principales son MK-10 (H₂), MK-9 (H₈) y MK-10 (H₄). Contiene fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, metilfosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y un fosfolípido no identificado (Li y col. 2003d).

Streptomonospora salina

Aislada de una muestra de suelo recolectada en un lago salado en el oeste de China, presenta micelio aereo bien desarrollado pero sin fragmentar, forma cadenas cortas de esporas de forma oval a bacilar con superficie rugosa. El micelio vegetativo presenta ramificación con hifas no fragmentadas y esporas redondas a ovales. Contiene ácido meso-diaminopimérico, ácido DD-diaminopimérico, glicina, lisina y ácido aspártico. En su pared celular contiene glucosa, galactosa, ribosa, xilosa, arabinosa y manosa. Contiene fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Las principales menaquinonas son MK-9 (H₆), MK-10 (H₂) y MK-10 (H₄) (Cui y col. 2001).

AMBIENTES SALINOS EN MÉXICO

La República Mexicana dada su situación geográfica y climatológica presenta una gran variedad de condiciones ambientales, que han dado como resultado una riqueza de suelos, flora y fauna, así como una abundante diversidad microbiológica en ambientes de extrema salinidad.

La distribución de ambientes salinos en México es muy amplia. Prácticamente en todos los estados se encuentran lagos, ríos, manantiales o pozos con elevado contenido de sales. Las salinas asociadas a las costas son en su gran mayoría antiguas lagunas costeras cuya comunicación con el mar se ha perdido. Las salinas interiores se localizan principalmente, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, México, Puebla y el Distrito Federal. Las salinas importantes de origen marino se encuentran principalmente en la costa pacífica de México, aunque las hay en el golfo de México y en Yucatán, costa atlántica

Es en estos ambientes salinos (de agua y suelo) donde predominan los microorganismos halófilos y halotolerantes, siendo varios de estos ambientes seleccionados como fuente de obtención de muestras para el aislamiento de actinomicetos halófilos.

La región Sur del país presenta un clima cálido húmedo, suelo húmedo y selva tropical, mientras que la región Norte, presenta clima desértico, suelo árido, lluvias poco abundantes y vegetación pobre con predominancia de cactáceas. (Alcocer, J. y Williams W. D., 1993).

METODOLOGIA

ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS HALOFILOS

Los microorganismos que habitan y llevan a cabo sus funciones metabólicas en los ambientes hipersalinos, desempeñan un papel esencial para el adecuado funcionamiento de este tipo de ecosistemas, la realización de estudios de distribución y diversidad de microorganismos en ambientes hipersalinos no podrían realizarse sin establecer colecciones de microorganismos representantes de dichos habitats. En los siguientes apartados se describen los procedimientos que condujeron a la construcción de la primera colección de actinomicetos halófilos reportada en la República Mexicana.

AISLAMIENTO

Primera etapa de muestro.

Muestreos realizados en México

Se realizaron muestreos en diferentes puntos del territorio mexicano donde existen ambientes hipersalinos, como son las salinas costeras de los estados de Sonora (zona Norte) y Oaxaca (zona Sur), estos puntos geográficos pertenecen a la costa del Océano Pacífico.

Segunda etapa de muestreo.

Muestreos realizados en España.

Se realizaron muestreos en diferentes salinas localizadas en el sur de España como son: Cádiz y Huelva.

Se recolectaron muestras de agua, suelo cercano a la salina y sedimento a una profundidad de 15 centímetros; en los lugares mencionados, registrando las condiciones ambientales, temperatura, pH y porcentaje de salinidad en el lugar de muestreo así como su ubicación geográfica.

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de actinomicetos halófilos se obtuvo a partir de las modificaciones realizadas en el medio MH (medio desarrollado para el aislamiento de bacterias halófilas moderadas) (Ventosa y col., 1982). Éste medio ha sido utilizado en muchos trabajos sobre aislamiento de bacterias halófilas moderadas con excelentes resultados (Márquez y col, 1987). Los componentes del medio MH modificado se muestran en la Tabla 10. Dicho medio fue complementado con una solución de sales llevada a una concentración final del 10%. Tabla 11.

Componentes	g/L
Extracto de levadura	10
Proteosa peptona	5
Glucosa	1
Agar	18
Solución de sales al 10%	csp 1L

Tabla 10. Composición del medio MH para bacterias halófilas

Solución de sales (30%) para MH	g/L
NaCl	78.0
MgCl ₂ 6H ₂ O	13.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	20.3
CaCl ₂	0.3
KCl	2.0
NaHCO ₃	0.06
NaBr	0.23
H ₂ O	csp 1L

Tabla 11. Composición de la solución de sales para el medio MH modificado

Modificaciones

Utilización de cloruro de sodio comercial.

El medio MH fue modificado sustituyendo el cloruro de sodio grado reactivo analítico, (NaCl R. A.), componente principal en la solución de sales, por NaCl comercial, de esta manera se redujo el costo de preparación del medio.

Utilización de sal marina.

El medio MH fue complementado con el uso de sal marina en sustitución de todos los componentes de la solución de sales, con la finalidad de que los microorganismos puedan aprovechar el contenido de micro elementos contenidos en la sal marina.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras recolectadas fueron sembradas por triplicado en agar MH modificado, de acuerdo al proceso que a continuación se describe según el caso:

Muestras de agua.

A las muestras de agua recolectadas se les determinó el valor de pH y porcentaje de salinidad, posteriormente se inoculó 0.1 ml de muestra en cajas Petri con agar MH modificado esparciendo la muestra en el agar hasta sequedad.

Muestras de suelo y sedimento.

Se pesó 1 g de suelo salado o sedimento (según el caso) y se diluyó en 9 ml de solución de sales al 10%, se agitó en vortex durante 3 minutos y se midieron los valores de pH y porcentaje de salinidad, se inoculó 1 ml de esta suspensión en cajas Petri con agar MH modificado esparciendo la muestra en el agar hasta sequedad.

El medio inoculado fue incubado a 37 °C durante 4 semanas, realizando revisiones periódicas al crecimiento cada 3 días.

SELECCIÓN DE CEPAS

Cepas de actinomicetos

La selección de cepas de actinomicetos se realizó en dos etapas, primero se seleccionaron las cepas de actinomicetos considerando las características definidas dentro de los rubros de morfología colonial, morfología microscópica, microscopía electrónica y de barrido. Posteriormente se seleccionaron las cepas de actinomicetos halófilos mediante la determinación del crecimiento óptimo a diferentes concentraciones de NaCl.

Morfología colonial.

La selección de las colonias estuvo basada en la presencia de micelio aéreo, así como colonias no cremosas, algunas con textura dura y en algunos casos fijas en el agar; considerando al mismo tiempo características como, tamaño, color, forma, textura y presencia de pigmento difusible en el agar.

Morfología microscópica.

A las colonias seleccionadas se les realizó la tinción de Gram, y fueron observadas en contraste de fases, se seleccionaron las cepas que presentaron células filamentosas, bacilares y en algunos casos cocoidales con presencia de ramificaciones, así como la presencia de esporas, la forma y tipo de agrupación de las mismas.

Microscopía electrónica y de barrido.

Se realizó un estudio de microscopía electrónica con el objeto de detallar la estructura del micelio aéreo y vegetativo así como las características de las estructuras presentes en la superficie externa de la célula. La observación morfológica se realizó mediante la siguiente técnica: se utilizaron cubreobjetos limpios, los cuales fueron cortados en cuatro secciones, utilizando para esto un lápiz de diamante, posteriormente fueron esterilizados y colocados en ángulo de cuarenta y cinco grados en agar MH modificado, para posterior incubación. Los cubreobjetos con el crecimiento de la muestra fueron retirados del agar, y sometidos a un proceso de tratamiento que consistió en lavado en solución cacodilato 0.2 M, fijación con solución de gluteraldehído al 2% en buffer cacodilato y en solución de tetraóxido de osmio al 1% y deshidratación en series de etanol (55 – 100%). Para la observación al microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron procesadas en un equipo de

desechado (critical point dry) marca SAMDRI 780a de Tousimis Research Corp. Rockville MD; posteriormente fueron sombreadas con oro, en un "sputter" Denton Vacuum DESK II Finalmente, las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM-6300, a una aceleración de voltaje de 10KV, a aumentos de 5,000x a 25,000x del Departamento de Física del CINVESTAV. México, (Serrano y col., 2003).

Cepas de actinomicetos halófilos

La selección de cepas de actinomicetos halófilos se llevó acabo determinando el crecimiento óptimo de los actinomicetos en diferentes concentraciones de sal, con la finalidad de agruparlos como halófilos débiles, moderados o extremos así como separarlos de las cepas de actinomicetos halotolerantes; para esto se efectuó una siembra en estría, utilizando el medio MH modificado con los siguientes porcentajes de salinidad: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%. Las placas se incubaron a 37 °C y se observaron diariamente considerándose positivos aquellos casos en que al cabo de tres semanas el crecimiento fue aparente. Se determinó a que concentración salina se produjo el crecimiento más rápidamente, de manera óptima.

COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS HALÓFILOS

Las cepas de actinomicetos halófilos fueron sembradas en caja y tubo, de donde se procedió a la realización de las pruebas correspondientes para su caracterización. Por otro lado las cepas fueron conservadas en congelación utilizando glicerol al 20%.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Catalasa

A un cultivo de 3 días, se adicionaron unas gotas de peróxido de hidrógeno. La prueba se consideró positiva cuando se observó desprendimiento de pequeñas burbujas de oxígeno, lo cual indica que el peróxido de hidrógeno se ha desdoblado en oxígeno y agua.

Producción de indol

Medio utilizado:

Triptona 10.0 g

Solución de sales al 10% c.s.p. 1.0 L

pH = 7.6

El medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente se incubó a 37 °C durante 5 - 7 días; para la lectura se adicionaron 0.5 ml del reactivo de Kovacs para indol, se agitó y al cabo de un minuto se observó el color, considerando positiva la producción de un anillo rojo en la parte superior del medio.

Reactivo de Kovacs para indol:

p – fenilendiaminobenzaldehido 5.0 g

Alcohol amílico 75 ml

HCl concentrado 25 ml

El aldehído se disolvió en el alcohol por calentamiento suave en baño maría (50 - 55 °C), se dejó enfriar y se adicionó al ácido. Se recomienda proteger de la luz y almacenarlo a 4 °C. El color del reactivo debe ser amarillo o marrón claro.

Prueba de rojo de metilo

Medio utilizado:

NaCl	98.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
KCl	2.0 g
Peptona bacteriológica	7.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	5.0 g
Agua destilada c.s.p.	1.0 L

pH = 7.6

Para su lectura se adicionaron unas gotas de solución de rojo de metilo, se agitó y se observó un posible cambio de color; el color rojo indica que la prueba es positiva, el naranja dudosa y el amarillo negativa.

Solución de rojo de metilo:

Rojo de metilo	0.04 g
Etanol	40.0 ml
Agua destilada c.s.p.	1.0 L

Se disolvió el rojo de metilo en alcohol y se completó hasta el volumen final con agua destilada.

Prueba de Voges - Proskauer

El medio de cultivo y condiciones utilizadas son las mismas que en la prueba de rojo de metilo. Para la lectura se adicionaron 0.6 ml de solución de alfa-naftol al 0.5% en etanol y 0.2 ml de solución acuosa de KOH al 40%. Los tubos se examinaron a los 15 minutos y después de una hora. La reacción positiva estuvo indicada por la presencia de un color rojo intenso.

Reducción de nitratos y nitritos

Medio utilizado:

KNO ₃	2.0 g
Peptona bacteriológica	5.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Solución de sales al 10% c.s.p.	1.0 L

Para detectar la formación de gases se empleó una campana Durham. El medio se inoculó y después de cinco días de incubación a 37 °C se observó la existencia de formación de gases en las campanas Durham, indicativo de que los nitratos se redujeron a nitritos y estos posteriormente hasta gases (nitrógeno gaseoso y/o óxido de nitrógeno). En los tubos donde no se observó la presencia de gases se adicionó 1 ml de reactivo A y 1 ml de reactivo B de nitritos, la aparición de color rojo, indicó la presencia de nitritos, considerándose positiva la prueba de reducción de nitratos.

En los tubos que a los cinco minutos no dieron positiva la prueba, se adicionaron limaduras de zinc (5 mg/ml). La aparición de color rojo transcurridos unos segundos, fue el indicativo de la presencia de nitratos en el medio. Por el contrario, la ausencia de este color indicó la reducción de los nitratos y los nitritos hasta iones de amonio, para diferenciar así del resultado que se obtiene cuando los nitratos son reducidos a nitritos y estos a su vez hasta nitrógeno gaseoso y/o óxido de nitrógeno.

Reactivo A:

Solución al 0.8% de ácido sulfanílico en ácido acético 5N

Reactivo B:

Solución al 0.5% de alfa – naftilamina en ácido acético 5N

Ambas soluciones se disuelven por calentamiento suave.

Utilización de citratos

Se utilizó el medio deshidratado de citrato de Simmons, el cual se preparó en solución de sales al 10%. El pH se ajustó hasta obtener un medio de color verde oscuro.

El medio anterior se inoculó y posteriormente fue incubado a 37 °C durante siete días; la prueba se consideró positiva al observarse un cambio de color (verde a azul).

Producción de ácido sulfhídrico

Medio utilizado:

Peptona bacteriológica	5.0 g
Extracto de levadura	10.0 g

Cisteína	0.1 g
Solución de sales al 10% c.s.p.	1.0 L

Para detectar la presencia de H₂S se cortaron tiras de papel de filtro de 1 por 5 cm, se impregnaron en una solución acuosa saturada de acetato de plomo; se secaron a 50 - 60 °C y se esterilizaron.

Después de inocular el medio líquido, se colocó una de las tiras entre el tapón y el tubo sin llegar a tocar el líquido en condiciones de esterilidad. Se incubaron a 37 °C y se realizaron lecturas periódicas durante 15 días. La prueba se consideró positiva cuando la tira de papel tomó un color negro intenso, debido a la liberación de H₂S y formación de sulfuro de plomo.

Fenilalanina desaminasa

Medio utilizado:

DL - fenilalanina	2.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Agar	20.0 g
Solución de sales al 10% c.s.p.	1.0 L

PH = 7.6

Se realizó una siembra sobre agar en pico de flauta, se inoculó y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Para la lectura se adicionaron 4 o 5 gotas de FeCl₃ en solución acuosa al 10%. La

inmediata aparición de un color verde intenso, fue el indicativo de la presencia de ácido fenilpirúvico y la prueba se consideró positiva

Beta galactosidasa

Esta prueba determina la presencia de la enzima beta galactosidasa en aquellos microorganismos que dan negativa la fermentación de la lactosa.

Se resuspendió una asa cargada de un inóculo a partir de un medio sólido, en 0.5 ml de solución de sales al 10%. A dicha solución se adicionó una gota de tolueno mezclándolo enérgicamente y tras unos segundos se añadió 0.5 ml de reactivo orto nitrofenil beta galactósido (ONPG) 0.75M, la mezcla se colocó en un baño a 37 °C. La lectura se realizó después de 24 horas. Un color amarillo bien definido indica que el organismo ha producido orto nitrofenol a partir del sustrato ONPG por acción de la beta galactosidasa, considerándose por lo tanto la prueba positiva.

Descarboxilasas

Medio utilizado:

NaCl	100.0 g
Peptona bacteriológica	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
R rojo fenol	0.01
Agar	3.0 g
Arginina, lisina u ornitina	10.0 g
Agua destilada c.s.p.	1.0 L

El pH se ajustó hasta conseguir un color amarillo anaranjado en el medio.

Los respectivos aminoácidos se esterilizaron por filtración y se adicionaron en cada caso al medio estéril a 55 - 60 °C. La siembra se realizó por picadura y se cubrieron los tubos con una capa de parafina estéril de un cm de espesor.

La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas y transcurrido este tiempo la presencia de un color rojo de los tubos indicó una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación.

Producción de ureasa

Se utiliza el medio agar urea de Christensen, cuya composición es:

Medio base:

Peptona bacteriológica	1.0 g
Glucosa	1.0 g
Solución de rojo fenol al 2.0%	6.0 ml
Agar	20 g
Solución de sales al 10% c.s.p.	1.0 L

pH = 6.8.

Solución de urea:

Urea	20.0 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

El medio base se esterilizó y se dejó enfriar en baño maría hasta una temperatura de 50 - 55 °C. La solución de urea se esterilizó por filtración y se adicionó al medio base. Se distribuyó en tubos estériles dejando solidificar en pico de flauta. Los tubos se inocularon con un cultivo joven y se incubaron a 37 °C durante 7 días. Se examinaron diariamente considerando positiva la aparición de un color rojo

Se utilizaron tubos como controles con el mismo medio pero sin urea, ya que pueden darse falsos positivos debido a interferencias con la peptona.

Hidrólisis de la gelatina

Método de Frazier modificado en placa:

Se utilizó el medio MH adicionando gelatina al 1%, se sembraron 4 microorganismos por placa y se incubaron a 37 °C durante 7 días. La lectura se realizó adicionando 5 a 10 ml de reactivo de Frazier por placa, la prueba se consideró positiva al aparecer una zona de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano, que indicó la hidrólisis de la gelatina.

Reactivo de Frazier:

HgCl ₂	12.0 g
Agua destilada	80 ml
HCl concentrado	16 ml

Se mezcló el HgCl₂ con el agua y se adicionó el ácido agitando bien hasta su completa disolución.

Hidrólisis de la caseína

Se utilizó el medio de agar caseína modificado, el cual está constituido por partes iguales de leche descremada y medio MH a doble concentración; ambos componentes se esterilizaron por separado y previo enfriamiento a 55 – 60°C se mezclaron distribuyéndose en placas de Petri.

La inoculación se realizó mediante una extensión de 4 microorganismos por placa y después de la incubación a 37 °C durante 7 días se procedió a realizar la lectura añadiendo el reactivo de Frazier, la interpretación fue igual que en el caso de la hidrólisis de la gelatina.

Hidrólisis de la esculina

Se utilizó el medio MH, al cual se le adicionó esculina al 1% y citrato férrico al 0.5%, el pH se ajustó a 7.6 . La inoculación se realizó mediante la extensión de 4 microorganismos por placa con posterior incubación a 37 °C durante 7 días.

La lectura se consideró positiva cuando apareció un color marrón oscuro o negro alrededor de la zona de crecimiento, debido a que en la hidrólisis de la esculina se forma esculetina, que con el Fe^{3+} presente en el medio, da un complejo fenólico de color negro.

Hidrólisis del almidón

Se utilizó el medio MH al cual se adicionó almidón soluble al 1%. El pH se ajustó a 7.6 . La inoculación e incubación se realizaron en las mismas condiciones que en la hidrólisis de la gelatina.

Para su lectura se utilizó una solución de lugol que se añadió sobre las placas; al contacto con el almidón no hidrolizado, el medio tomó un color azul oscuro. La prueba se consideró positiva con la aparición de una región de aclaramiento alrededor de la zona de crecimiento que indica la existencia de hidrólisis.

Solución de lugol:

Yodo	3.0 g
Ioduro de potasio	6.0 g
Agua destilada c.s.p.	1.0 L

Se dejó reposar 24 horas y se filtró.

Hidrólisis de la tirosina

Se utilizó en el medio MH adicionado de L - tirosina al 0.5%, el pH se ajustó a 7.6.

Antes de distribuir en placas, el medio se agitó para homogeneizar la tirosina (insoluble en agua) y esta quedara igualmente repartida en todas las placas, apreciándose en las mismas un precipitado blanco de la tirosina. La inoculación e incubación se realizaron en las mismas condiciones que en la hidrólisis de la gelatina. Si el microorganismo hidroliza la tirosina se manifiesta mediante la aparición del precipitado blanco.

Hidrólisis del tween 80

Se empleó el siguiente medio modificado para bacterias halófilas moderadas

Peptona bacteriológica	10.0g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	96.0 g
KCl	2.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.0 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.2 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	trazas
Agar	20.0 g
Agua destilada csp	1.0 L

pH = 7.6

El tween 80 se esterilizó por separado, después de esterilizar y enfriar hasta 55 - 60 °C, se adicionó a una concentración final de 1%.

La inoculación e incubación se realizaron en las mismas condiciones que en la hidrólisis de la gelatina. La lectura se consideró positiva con la apreciación de un halo de precipitación opaco alrededor de la zona de crecimiento que indicó la formación de la sal cálcica insoluble, del ácido graso liberado en la hidrólisis del tween 80.

Fosfatasa

Se utilizó el medio MH estéril, al cual se añadió difosfato de fenolftaleína sódica esterilizado por filtración hasta una concentración final de 10.01%. La inoculación e incubación se realizaron en las mismas condiciones que en la hidrólisis de la gelatina. Para su lectura se invirtieron las placas y sobre las tapas se añadió un poco de amoníaco; con la aparición de un color rojo brillante sobre la zona de crecimiento la prueba se consideró positiva siendo un indicativo de que el microorganismo posee la enzima fosfatasa, que hidroliza el difosfato de fenolftaleína, liberándose la fenolftaleína, que al reaccionar con los vapores de amoníaco adquiere un color rosa característico.

DNasa

Se empleó el medio “Dnase test agar” preparado en solución de sales al 10%. La inoculación e incubación se realizaron en las mismas condiciones que en la hidrólisis de la gelatina. Para la lectura se colocaron las placas sobre un fondo oscuro y se inundaron de HCl 1N esperando unos segundos; se consideró como resultado positivo la aparición de un halo mas claro alrededor de la zona de crecimiento bacteriano.

Producción de lecitinasa

El medio MH se esterilizó y se colocó en un baño a 55 – 60 °C. Por otra parte se desinfectó un huevo de gallina y en condiciones de esterilidad se separó la clara de la yema, añadiendo esta última al medio anterior; se agitó hasta homogeneizar la mezcla y se repartió en placas Petri. Se inoculó y se incubó en las mismas condiciones que en la hidrólisis de la gelatina. La prueba fue considerada positiva con la existencia de un halo de aclaramiento en la zona de crecimiento

PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS A PARTIR DE CARBOHIDRATOS

Medio utilizado para el inóculo:

Peptona bacteriológica	5.0 g
Solución de sales al 10% c.s.p.	1.0 L

PH = 7.6

Medio base:

Peptona bacteriológica	5.0 g
Rojo fenol	0.01 g
Solución de sales al 10% c.s.p.	1.0 L

Los carbohidratos utilizados fueron: arabinosa, fructosa, galactosa, glicerol, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, sacarosa, trehalosa y xilosa. Los carbohidratos se esterilizaron por filtración y se adicionaron al medio base, estéril, a una concentración final del 1%.

El rojo de fenol se disolvió previamente en 0.5 ml de alcohol para facilitar su homogeneización. El pH se ajustó a 7.6. Se efectuaron lecturas a las 16 horas y diariamente hasta los siete días. La producción de ácidos se manifestó mediante el viraje del indicador a color amarillo.

PRUEBAS NUTRICIONALES

Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía

Medio base:

NaCl	100.0 g
KCl	2.0 g
KNO ₃	1.0 g
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Extracto de levadura	0.01 g
Agar	20.0 g
Agua destilada c. s. p.	1.0 L

Se adicionó el sustrato adecuado, el cual fue esterilizado separadamente por filtración; se repartió en placas de Petri y se inoculó a partir de un cultivo joven.

En el caso de los carbohidratos se empleó una concentración final de 0.2% y en el resto (alcoholes y ácidos orgánicos) 1%. Los compuestos utilizados fueron: almidón, amigdalina, D-arabinosa, D-celobiosa, esculina, D-fructosa, D-fucosa, D-galactosa, D-galactosamina, D-gluconolactona, D-glucosa, D-glucosamina, inulina, lactosa, maltosa, D-manosa, melibiosa, D-rafinosa, L-ramnosa, D-ribosa, salicina, sacarosa, D-trehalosa, D-xilosa, adonitol, dulcitol, eritritol, etanol, glicerol, D-manitol, mesoinositol, propanol, D-sorbitol, acetato, D-N-acetilglucosamina, DL- α -aminobutirato, benzoato, butirato, caprilato, citrato, fumarato, DL-glicerato, gluconato, D-glucuronato, L-glutamato, p-hidroxibenzoato, hipurato, lactato, malato, malonato, oxalato, piruvato, propionato, quinato, D-sacarato, salicilato, succinato y tartrato.

Para la lectura se utilizó un control, con medio base sin sustrato e inoculado. Después de la incubación a 37 °C se realizaron lecturas periódicas hasta los 7 días considerando como resultado positivo o negativo un mayor o menor crecimiento respectivamente con relación al tubo control.

Utilización de aminoácidos y derivados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Se emplea la misma técnica y metodología que en el apartado anterior.

Medio base:

NaCl	100.0 g
KCl	2.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
Extracto de levadura	0.01 g
Agar	20.0 g
Agua destilada c. s. p.	1.0 L

pH = 7.6

El sustrato se esterilizó separadamente por filtración y se adicionó al medio a una concentración final de 0.1%.

Los compuestos empleados como fuente de carbono, de nitrógeno y energía fueron: L-alanina, alantoína, L-arginina, L-asparagina, L-aspartico, betaína, creatina, DL-etioína, L-fenilalanina, glicina, L-glutámico, L-glutamina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-

lisina, L-metioina, L-ornitina, L-prolina, putrescina, sarcosina, L-serina, L-treonina, L-triptofano y L-valina. (Koneman, 1983; Stanier et. al., 1966).

PRUEBAS ENZIMÁTICAS

Las pruebas enzimáticas se realizaron por medio del sistema de investigación de actividades enzimáticas API ZYM, el cual consiste en un micrométodo semicuantitativo aplicable a diferentes tipos de muestras como pueden ser los microorganismos. Este sistema permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra. La galería API ZYM consta de 20 microtubos (cúpulas) cuyo fondo está constituido por un soporte que contiene un sustrato enzimático con su tampón. Este soporte está destinado a favorecer el contacto entre la enzima y el sustrato generalmente insoluble. El sistema API ZYM permite detectar actividades enzimáticas de un extracto complejo no purificado.

Técnica

Preparación de la muestra:

Se preparó una suspensión de microorganismos a una densidad óptica determinada (5 - 6 de McFarland) en agua destilada o medio isotónico, a partir de una muestra en cultivo puro en medio sólido o un sedimento de centrifugación.

Preparación e inoculación de la galería:

Se preparó una cámara de incubación (fondo y tapa) y se repartieron 5 ml aproximadamente de agua destilada en los alveolos para crear una atmósfera húmeda. Las cámaras fueron rotuladas en la lengüeta lateral con la referencia correspondiente a cada muestra. Se extrajo

la galería de su envase individual y se colocó en la cámara de incubación. Se repartieron 65µl de muestra en cada cúpula. Se colocó la tapa en la galería y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Lectura de la galería

Se adicionó una gota de reactivo ZYM A y una gota de reactivo ZYM B en cada cúpula, esperando el desarrollo de color durante los siguientes 5 minutos. La galería fue expuesta durante 10 segundos a la radiación de una lámpara de 1000 watts a una distancia de 10 cm aproximadamente encima de las cúpulas. Finalmente se efectuó la lectura de acuerdo a la Tabla 12.

Reactivo ZYM A:

Tris-hidroximetil-aminometano	8.5 g
Ácido clorhídrico al 37%	11 ml
Lauril sulfato de sodio	10 g
H ₂ O	100 ml

Reactivo ZYM B:

Fast Blue BB	0.35 g
2-metoxi etanol	100 ml

No.	Enzima estudiada	Substrato	Reacción	
			Positiva	Negativa
1	Control		Incoloro o color de la muestra según la importancia de la coloración	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	Violeta	Incoloro o amarillo muy pálido
3	Esterasa (C 4)	2-naftil butirato	Violeta	
4	Esterasa lipasa (C 8)	2-naftil caprilato	Violeta	
5	Lipasa (C 14)	2-naftil miristato	Violeta	
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida	Naranja	
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	Naranja	
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	Naranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	Naranja	
10	α -Quimiotripsina	N-glutaril-fanilalanina-2-naftilamida	Naranja	
11	Fosfatasa ácida	2-Naftil-fosfato	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	Azúl	
13	α -galactosidasa	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosido	Violeta	
14	β -galactosidasa	2-naftil- β D-galactopiranosido	Violeta	
15	β -glucuronidasa	Naftol-AS-BI- β D-glucuronido	Azúl	
16	α -glucosidasa	2-naftil- α D-glucopiranosido	Violeta	
17	β -glucosidasa	6-BR-2-naftil- β D-glucopiranosido	Violeta	
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminido	Marrón	
19	α -manosidasa	6-BR-2-naftil- α D-manopiranosido	Violeta	
20	α -fucosidasa	2-naftil- α L-fucopiranosido	Violeta	

Tabla 12. Tabla de lectura de las galerías API ZYM

ANÁLISIS NUMÉRICO

Se realizaron 120 pruebas, incluyendo, pruebas bioquímicas, nutricionales y enzimáticas, (Koneman, 1983; Stanier et. al., 1966); para la realización de las pruebas se utilizó el medio

MH, complementado con solución de sales al 10% y la incubación fue a 37 °C. Se seleccionaron 69 pruebas que presentaron variación en los resultados del análisis fenotípico. Haciendo uso de los coeficientes de asociación simple (S_{SM}) de Sokal and Michener (1958), así como el coeficiente de Jaccard (S_J) (Jaccard, 1908), se obtuvieron las matrices de semejanza y se construyeron los dendrogramas correspondientes mediante la técnica UPGMA “Unweighted Pair Group Mean Average” de Sneath and Sokal (1973). El análisis numérico se realizó utilizando el programa NTSYS-pc versión 2.06 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) de (Rohlf, 1993).

QUIMIOTAXONOMÍA

DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO DIAMINOPIMÉLICO

Se determinó la presencia del ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP) utilizando un analizador de aminoácidos automatizado que utiliza cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

DETERMINACIÓN DEL ISÓMERO DEL ÁCIDO DIAMINOPIMÉLICO

La presencia del isómero del ácido diaminopimélico L-DAP y *meso*-DAP, se determinó mediante cromatografía en capa fina de acuerdo a la técnica de Staneck and Roberts, 1974.

Técnica

Obtención de biomasa

Se inoculó cada cepa en medio líquido MH modificado, se incubó a 37 °C a 150 rpm durante una semana. Se extrajo la biomasa por centrifugación a 10,000 rpm, y posteriormente se secó a 55 °C durante 24 horas.

Hidrólisis

Se pesaron 10 mg de biomasa y colocaron en un tubo para hidrólisis adicionando 1 ml de ácido clorhídrico 6N, la hidrólisis se llevó a cabo calentando a 100 °C durante 18 a 24 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó el ácido en un desecador. El hidrolizado fue resuspendido con 0.5 ml de agua destilada y centrifugado. El sobrenadante fue separado y conservado para el análisis.

Cromatografía en capa fina

En una placa de celulosa (Merck 1.05565), se colocó 1 µl de hidrolizado, 1 µl de estándar de ácido *meso*-diaminopimélico y se introdujo en una cámara cromatográfica conteniendo la siguiente mezcla de solventes: metanol - piridina - HCl 10N - H₂O en la proporción 80:10:2.5:17.5, o bien, metanol - piridina HCl 6N - H₂O en la proporción 80:10:4:26. Después de que el solvente corrió hasta una distancia dejando 2 cm libres al final de la placa, se extrajo la placa de la cámara y se dejó secar a temperatura ambiente. El revelado se realizó con una solución de ninhidrina al 0.33% en terbutanol. Se determinó la presencia de los isómeros considerando su correspondiente valor de RF 0.29 para L-DAP y 0.24 para *meso*-DAP, (Staneck and Roberts, 1974).

ELECCIÓN DE CEPAS REPRESENTATIVAS

A partir de construcción de dendrogramas basados las características fenotípicas y después de realizar un análisis de las diferencias morfológicas, se realizó una selección de cepas como miembros representantes de los grupos obtenidos con el análisis numérico. Las cepas

elegidas como representativas de los diferentes grupos fueron sometidas a diversos análisis de caracterización genotípica.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GUANINA + CITOSINA (G+C)

6 cepas representantes de los *clusters* formados, fueron sometidas a un análisis de contenido de Guanina+Citosina, (G+C), para el cual se extrajo el DNA mediante la técnica de Marmur, (Marmur, 1961).

Contenido de Guanina + Citosina

El contenido de G + C fue calculado mediante el valor de la temperatura media de desnaturalización (T_m) la cual se determinó utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis modelo 551S, a una longitud de onda de 260 nm y un programador de temperatura Perkin-Elmer modelo PTP-1. La T_m se determinó siguiendo el método gráfico descrito por Ferragut and Lecler (1976). El % de G+C se calculó a partir del valor de T_m mediante la fórmula de Owen and Hill (1979).

DETERMINACIÓN DE LA INSERCIÓN ESPECÍFICA EN EL GEN 23S DEL rRNA DE BACTERIAS CON ALTO CONTENIDO DE G+C

Extracción de DNA.

“Wizard Genomic DNA Purification Kit”. (Promega A1120).

Paquete celular

Lisis celular

Se adicionó 600 µl de solución lisis nucleica y se incubó a 80 °C/5 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 3 µl de solución de RNAasa, se mezcló e incubó a 37 °C/1 hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas

Se adicionaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas, se agitó en vórtex durante 20 seg y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/3 min.

Precipitación de DNA y rehidratación

Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio que contenía 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló y se centrifugó, posteriormente se decantó el sobrenadante y se adicionaron 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se mezcló y se centrifugó a 13000 rpm 2 min. Por ultimo se aspiró el etanol y se secó el pellet durante 15 minutos. El pellet de DNA se rehidrató en 100 µl de solución de rehidratación y se mantuvo a 4 °C.

Amplificación de la inserción específica en el gen 23s

Se realizó la amplificación de una inserción específica de bacterias Gram positivas con elevado G + C, (HGC) considerada como un marcador filogenético de aproximadamente 100 pares de bases, localizado en el rRNA 23S, (Roller, et. al., 1992); mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); las secuencias de oligo nucleótidos utilizados como cebadores fueron, 23 INSf, 5'-(AC) A (AGT) GCG TAG (AGCT) CG A

Se realizó la amplificación de una inserción específica de bacterias Gram positivas con elevado G + C, (HGC) considerada como un marcador filogenético de aproximadamente 100 pares de bases, localizado en el rRNA 23S, (Roller, et. al., 1992); mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); las secuencias de oligo nucleótidos utilizados como cebadores fueron, 23 INSf, 5'-(AC) A (AGT) GCG TAG (AGCT) CG A (AT) G G-3'; 23 insR 5'-GTG (AT) CG GTT T (AGCT) (GCT) GGT A-3'. La reacción se llevó a cabo utilizando Taq DNA Polimerase in Storage Buffer B (Promega M1661). Las condiciones usadas en el ciclo térmico fueron: un ciclo de predesnaturalización, 5 minutos (94 °C); desnaturalización, 45 segundos (94 °C); acoplamiento, 45 segundos (46 °C); elongación 50 segundos (72 °C); repetir 29 ciclos y un ciclo de post-elongación 5 minutos (72 °C). Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio, (Sambrook et al, 1989; Roller, et. al., 1992).

AMPLIFICACIÓN DEL GEN rRNA 16S

Se realizó la amplificación del gen rRNA 16S utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de nucleótidos utilizadas fueron, 8f: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y 1492r: TACGGYTACCTTGTTACGACTT. La reacción se llevó a cabo utilizando Taq DNA Polimerase in Storage Buffer B (Promega M1661). Las condiciones usadas en el ciclo térmico fueron, un ciclo de predesnaturalización, 5 minutos (94 °C); desnaturalización, 30 segundos (94 °C); acoplamiento, 20 segundos (52 °C); elongación 1:30 minutos (72 °C); repetir 34 ciclos y un ciclo de post - elongación 7 minutos (72 °C). Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, (Sambrook et. al., 1989).

Los productos purificados fueron observados mediante la realización de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

ANALISIS FILOGENÉTICO

Para investigar la posición filogenética de las cepas aisladas desconocidas se determinó la secuenciación parcial del gen rRNA 16S, las cepas fueron tratadas en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis comparativo con secuencias obtenidas de la base de datos del Gen Bank utilizando el programa Blast (Altschul et. al., 1997). Se llevo a cabo una alineación de un segmento de 600 bases de las secuencias resultantes de las cepas aisladas con miembros representativos de los géneros de actinomicetos que incluyen especies halófilas.

CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Se construyeron los árboles filogenéticos utilizando una longitud de secuencia de 600 bases. Se utilizó el método Neighbor-Joining y Kimura 2, (Saitou and Imanishi, 1987) con el programa Phylo_win (Galtier et. al., 1996), la estabilidad del agrupamiento fue estimada con un análisis de bootstrap de 1000 réplicas (Efron and Gong, 1983; Felsenstein, 1985).

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS HALOFILOS

Los microorganismos que conforman nuestra colección son el resultado de la creación de un cepario regional de actinomicetos halófilos.

Se aislaron 60 cepas de actinomicetos halófilos, los cuales presentaron un crecimiento óptimo al 10% de salinidad. 52 cepas fueron aisladas de las lagunas costeras de Oaxaca (Zona Sur), 4 cepas fueron aisladas de las salinas de Sonora (Zona Norte). Cabe mencionar que aunque la búsqueda de actinomicetos halófilos se continúa realizando en México, se han incluido 4 cepas de actinomicetos halófilos que fueron aisladas de salinas del Sur de España. Las cepas aisladas que forman esta colección fueron representadas con las siguientes claves: JA6-1, LRS...; cepas aisladas en Oaxaca. Y3A-1, COSE...; cepas aisladas en Sonora. CAD..., HS...; cepas aisladas en España.

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo para el aislamiento de actinomicetos halófilos y halotolerantes se obtuvo a partir de modificaciones realizadas al medio MH para bacterias halófilas moderadas. El medio MH modificado es complementado inicialmente con una solución de sales al 10% compuesta de NaCl, MgCl₂ 6H₂O, MgSO₄ 7H₂O, CaCl₂, KCl, NaHCO₃, NaBr. Otras modificaciones realizadas al medio fueron las siguientes.

- a) Al sustituir el NaCl reactivo analítico (NaCl R. A.) por NaCl comercial en la preparación de solución de sales que lo complementa, su costo resultó considerablemente reducido.
- b) Al complementar medio MH modificado con sal marina en sustitución de todos los componentes de la solución de sales, se buscó que el microorganismo pudiera aprovechar el contenido de micro elementos que contiene la sal extraída del mar; además de que la preparación del medio resultó mas económico y el crecimiento de los microorganismos fue satisfactorio. La Figura 1 muestra el crecimiento de dos cepas de actinomicetos halófilos en el medio modificado complementado con sal marina o NaCl reactivo analítico. De esta manera se implementó un método alternativo y de bajo costo para el crecimiento y conservación de actinomicetos halófilos y es el que se usó en el trabajo.

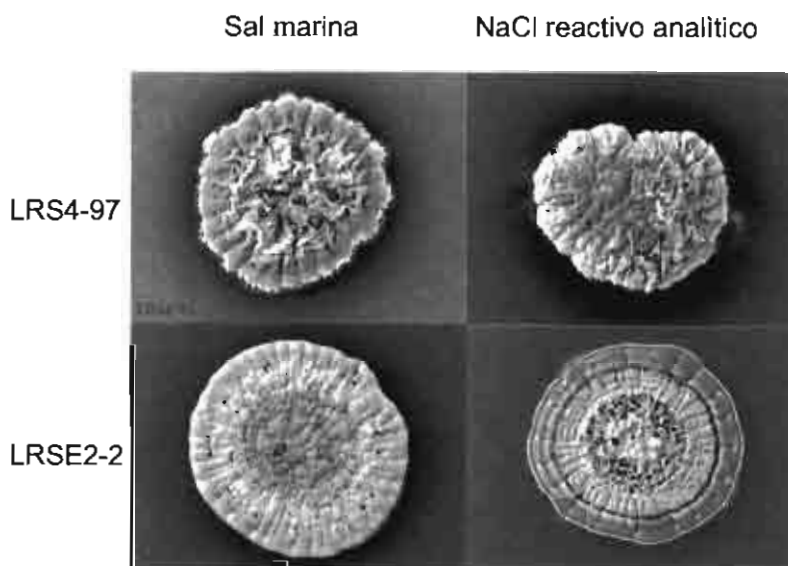


Fig. 1. Crecimiento de 2 cepas de actinomicetos halófilos en medio MH modificado complementado con sal marina o con NaCl reactivo analítico.

SELECCIÓN DE CEPAS

Morfología colonial, microscópica y microscopia electrónica de barrido.

La morfología colonial representa la forma visible de las células que se forman por la división de una o varias células. El tamaño, forma, textura y color de una colonia es propio de cada organismo, (Mádigan y col 2003). De la misma manera existen características particulares de los grupos de organismos, que pueden ser estudiadas y observadas con el uso de técnicas de microscopia. Las características morfológicas de las cepas aisladas las distinguen en dos grupos:

Grupo I: Colonias de color oscuro, azul a grisáceo, verde a negro y en algunos casos blancas; con textura suave y fijas en el agar, presentan micelio aéreo y vegetativo bien desarrollado. La tinción de Gram muestra micelio ramificado con presencia de esporas. Las imágenes de microscopía electrónica, permiten observar la presencia de micelio ramificado con esporas solas que nacen del micelio. Fig. 2 (A, B y C).

Grupo II. Colonias pequeñas blancas, convexas de apariencia rugosa con formación de micelio extenso de color blanco, en el lado reverso del cultivo en agar las colonias son de color amarillo pardusco. La tinción de Gram permite observar micelio ramificado con presencia de esporas en cadena. En microscopía electrónica se observan filamentos ramificados que no fragmentan con formación de cadenas de esporas de forma oval a cilíndrica con superficie lisa. Figura 2 (D, E y F).

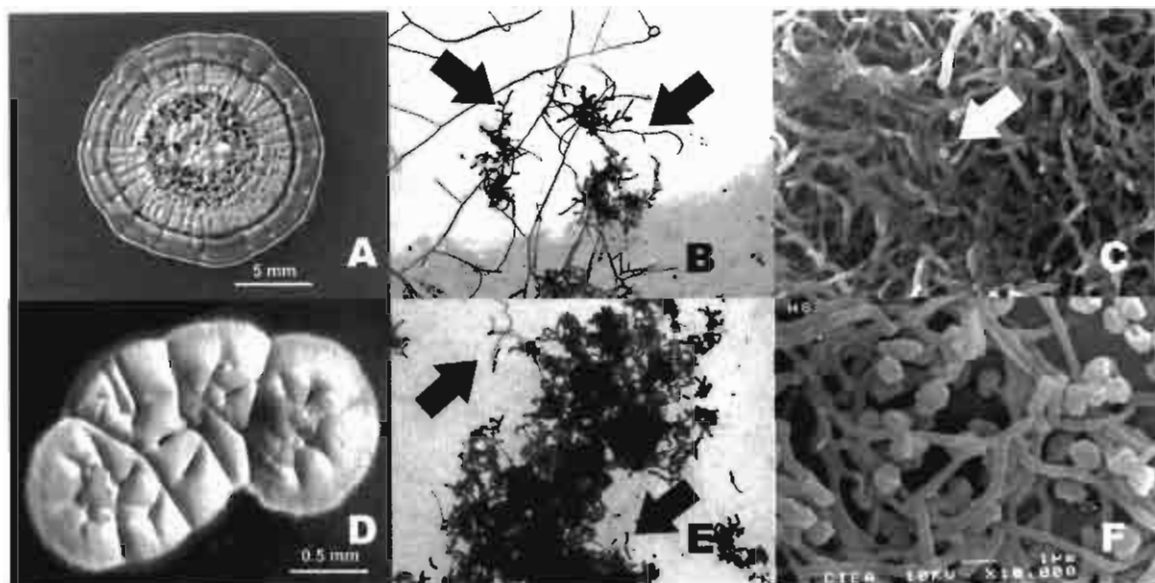


Figura 2. Morfología colonial, microscópica y microscopía electrónica de actinomicetos halófilos. A, B y C; Grupo I. D, E y F; Grupo II

Cepas de actinomicetos halófilos

El número de cepas aisladas presentó una variación considerable en los diferentes lugares de muestreo.

Zona Sur

Las muestras de agua, suelo y sedimento se recolectaron de 3 lagunas saladas: “Laguna Grande”, “Laguna Colorada” y “Laguna el Rosario”; así como dos conjuntos de salinas: “Salinas Juchitán” y “Salinas el Marquez”. El número de cepas obtenidas de estos muestreos fueron 52. De suelo salado recolectado en los alrededores de “Laguna El Rosario”, provienen 50 cepas, estas son representadas con la clave LRS...; una cepa fue obtenida del sedimento recolectado de la misma laguna. La cepa JA6-1, proviene de una muestra de agua salada de “Salinas Juchitán”. Mientras que del resto de los lugares

muestreados no se obtuvieron cepas de actinomicetos. Las cepas aisladas de “Laguna El Rosario”, presentan una morfología colonial y microscópica semejante al grupo I descrito anteriormente.

Zona Norte

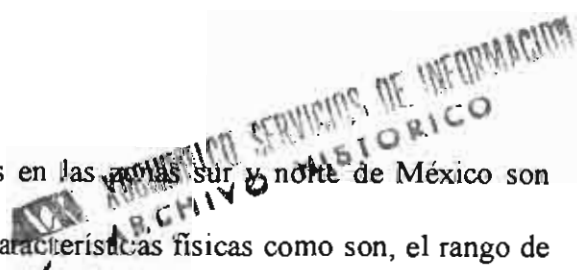
Se recolectaron muestras de agua, suelo y sedimento en tres conjuntos de salinas: “Salinas Yavaros”, “Salinas Ciudad Obregón” y “Salinas Moroncarit”. De los muestreos realizados se obtuvieron 3 cepas provenientes del sedimento recolectado en las “Salinas Ciudad Obregón”, estas cepas son representadas con la clave COSE... La muestra Y3A-1, se obtuvo una muestra de agua de “Salinas Yavaros”. Las cepas aisladas en “Salinas Ciudad Obregón”, presentan una morfología colonial y microscópica muy semejante al grupo II previamente descrito.

Cabe mencionar que aunque las cepas JA6-1 y Y3A-1, presentan características microscópicas correspondientes al grupo I, sus características coloniales son distintas.

Cepas adicionales

En la colección creada se incluyeron 4 cepas provenientes de muestras de suelo salado recopilado en dos muestreos realizados en las salinas de Huelva y Cádiz en el sur de España. Estas cepas presentan una morfología colonial y microscópica correspondiente al grupo I.

A pesar de que las características ambientales en las zonas sur y norte de México son diferentes, los lugares muestreados comparten características físicas como son, el rango de



salinidad que varía entre 18 - 22 %, mientras que el valor del pH se encuentra entre 7.4 y 8.9. Todas las cepas aisladas presentan un crecimiento óptimo en 10% de salinidad en el medio de cultivo. Tabla 13.

Actinomicetos halófilos				
Procedencia	Muestra			
	Región	Agua	Suelo	Sedimento
México	Zona Sur (Oaxaca)	1	50	1
	Zona Norte (Sonora)	1	0	3
España	Cádiz	0	3	0
	Huelva	0	1	0

Tabla 13. Número de cepas aisladas en los diferentes lugares de muestreo y su procedencia.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

La capacidad de los microorganismos para desarrollar una variedad de funciones se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de tipos de reacciones de oxidación, reducción y precipitación sobre determinados compuestos, (Olalde y Aguilera, 1998).

El análisis fenotípico, realizado a las 60 cepas aisladas, consistió en la realización de 23 pruebas bioquímicas, (Tabla A del anexo); las pruebas de producción de ácidos se realizaron con 11 carbohidratos, (Tabla B del anexo). Se probó la utilización de 49 sustratos utilizables como única fuente de carbono y energía, de los cuales fueron, 19 carbohidratos, 7 alcoholes y 23 ácidos orgánicos, (Tablas C, D y E del anexo). Se probó la utilización de 14 aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Tabla F del anexo). Finalmente se realizó un estudio enzimático con 18 enzimas contenidas en las galerías Apizym (Tabla G del anexo).

La taxonomía numérica se basa en el análisis de un gran número de caracteres, a diferencia de la taxonomía tradicional que se basa en la selección de unos cuantos caracteres filogenéticamente importantes. En cualquier estudio de taxonomía numérica la cuestión de cuantos y cuales caracteres se deben tomar en cuenta es de gran importancia. Los estudios de taxonomía numérica no se pueden realizar con un número reducido de caracteres, ya que el número seleccionado de pruebas debe representar una fracción razonable de la información genética del taxón descrito, ya que los taxa son definidos por la coincidencia de muchas características, que por otro lado no necesariamente están presentes en todos los miembros de un taxón. (Sandoval y Serrano, 2005).

Para la realización del análisis fenotípico por taxonomía numérica se seleccionaron 69 pruebas que presentaron variación en los resultados. Tabla 14.

Características	% de cepas positivas
Caseína	86
Almidón	92
Tirosina	30
Fosfatasa	91
Rojo de metilo	94
Voges Proskauer	6
Nitratos (NO ₃)	28
Ácido sulfhídrico	20
Arginina	61
Lisina	61
Ornitina	44
Producción de ácidos a partir de:	
Galactosa	5
Glucosa	16
Lactosa	3
Maltosa	44
Manitol	31
Sacarosa	13
Xilosa	55
Utilización de carbohidratos	
Amigdalina	45
Celobiosa	50
Galactosa	41
Galactosamina	39
Glucosa	52
Glucosamina	2
Inulina	23
Lactosa	31
Maltosa	47
Manosa	39
Melibiosa	23
Rafinosa	22
Ribosa	36
Salicina	19
Trealosa	28
Xilosa	44
Arabinosa	42
Sacarosa	39

Utilización de alcoholes	
Adonitol	63
Dulcitol	91
Eritritol	64
Etanol	83
Manitol	78
Mesoinositol	89
Propanol	83
Sorbitol	89
Glicerol	86
Utilización de ácidos carboxílicos	
Butirato	13
Benzoato	2
Gluconato	56
Glucuronato	9
Glutamato	5
Hipurato	9
Lactato	3
Propionato	39
Quinato	19
Sacarato	41
Malato	41
p-hidroxi-benzoato	11
Fumarato	66
Utilización de aminoácidos	
Arginina	23
Glicina	25
Glutamina	31
Isoleucina	31
Lisina	13
Ornitina	20
Prolina	28
Serina	38
Treonina	58
Valina	61
Putresina	25

Tabla 14. Pruebas utilizadas para la caracterización fenotípica de actinomicetos halófilos y el porcentaje de cepas que dieron positiva la reacción.

En la Figura 3, se muestra el dendrograma obtenido del análisis numérico en el cual se observa la formación de 5 grupos, los miembros que los constituyen están distribuidos de la siguiente forma:

Grupo I. LRS4.013, LRS4.030, LRS4.062, LRS4.102, LRS4.106, LRS4.127, LRS4.132, LRS4.135, LRS4.142, LRS4.145, LRS4.147, LRS4.160, LRS4.171, LRS4.172, LRS4.196, LRS4.199, LRS4.201, LRS4.202, LRS4.211, LRS4.215.

Grupo II. LRS2.002, LRS2.006, LRS4.58, LRS4.085.

Grupo III. LRSE2.002, Y3A1, CAD96S08-1, CAD96S08-2, HS4-1b.

Grupo IV. LRS4.074, LRS4.080, LRS4.091, LRS4.096, LRS4.097, LRS4.099, LRS4.100, LRS4.120, LRS4.123, LRS4.125, LRS4.126, LRS4.130, LRS4.146, LRS4.148, LRS4.152, LRS4.154, LRS4.166, LRS4.167, LRS4.180, LRS4.183, LRS4.195, LRS4.197, LRS4.205, LRS4.210, CAD96S14.02a

Grupo V. COSE.1a, COSE.1b, COSE.1c

Las características que comparten los miembros de cada grupo y que dieron lugar a la formación de los mismos se presentan en la tabla 15.

Grupos de actinomicetos halófilos (análisis fenotípico)							
I		II		III		IV	P
Pruebas positivas	Pruebas negativas	Pruebas positivas	Pruebas negativas	Pruebas positivas	Pruebas negativas	Pruebas negativas	P
Caseína	Benzoato	Almidón	Voges Proskauer	Almidón	Voges Proskauer	Voges Proskauer	M
Almidón	Glutamato	Tirosina	Ácido	Tirosina	Ácido	Celobiosa	A
Fosfatasa	Lactato	Fosfatasa	sulfhídrico	Rojo de metilo	sulfhídrico	Galactosa	D
Rojo de metilo		Rojo de metilo	Galactosa	Maltosa	Ornitina	Galactosamina	E
Celobiosa		Maltosa	Lactosa	Xilosa	Galactosa	Glucosamina	I
Galactosa		Manitol	Galactosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	N
Glucosa		Sacarosa	Glucosamina	Adonitol	Manitol	Manosa	Mes
Maltosa		Xilosa	Inulina	Dulcitol	Glucosamina	Salicina	P
Manosa		Galactosamina	Manosa	Eritritol	Manosa	Trealosa	S
Ribosa		Glucosa, Maltosa	Melibiosa	Etanol	Salicina	Xilosa	C
Xilosa		Trealosa	Rafinosa	Manitol	Xilosa	Butirato	GL
Arabinosa		Xilosa, Sacarosa	Ribosa	Mesoinositol	Arabinosa	Benzoato	A
Dulcitol		Adonitol	Salicina	Propanol	Butirato	Glutamato	C
Eritritol		Dulcitol	Butirato	Sorbitol	Glutamato	Hipurato	E
Etanol		Eritritol	Benzoato	Glicerol	Lactato	Lactato	T
Manitol		Etanol	Propionato	Gluconato	Putresia	Lisina	T
Mesoinositol		Manitol	Malato	Propionato		Serina	
Propanol		Mesoinositol	Arginina	Malato			
Sorbitol		Propanol	Glicina	Arginina			
Glicerol		Sorbitol		Treonina			
Gluconato		Glicerol					
Fumarato		Gluconato					
		Glutamato					
		Hipurato					
		Lactato					
		Fumarato					
		Isoleucina					
		Treonina					
		Valina					

Tabla 15. Características de los grupos formados a partir del análisis fenotípico

A partir de esta distribución se eligieron 14 cepas representantes de los diferentes grupos, las cuales se identificaron, por secuenciación del rRNA 16S, como pertenecientes a los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*, como se muestra en el dendrograma. Los grupos I, II, III, y IV fueron identificados como *Saccharomonospora*; así como la cepa JA6-1, la cual aparece independiente de los grupos formados. El grupo V fue identificado como *Actinopolyspora*.

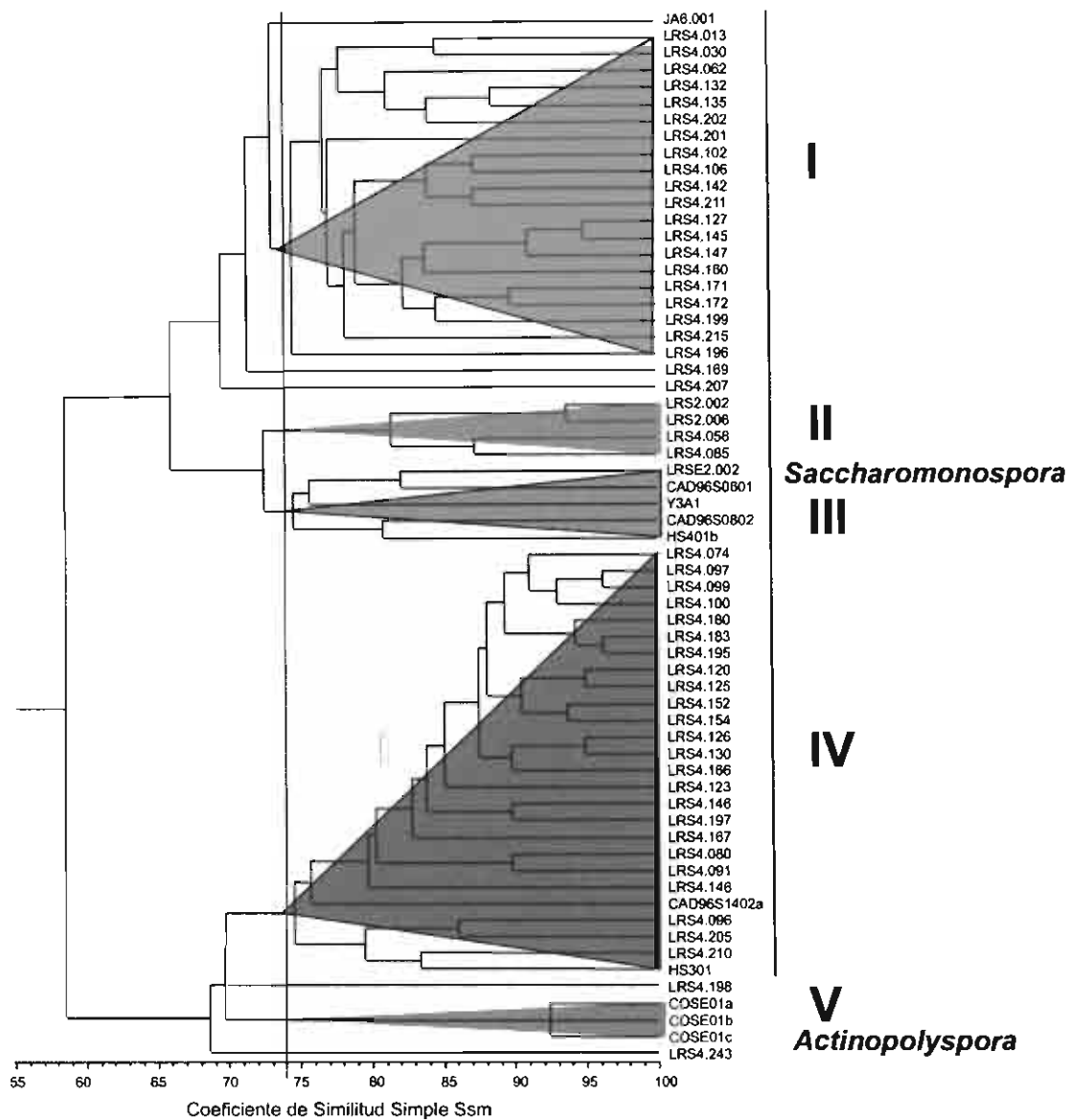


Figura 3. Dendrograma obtenido del análisis fenotípico

QUIMIOTAXONOMÍA

La quimiotaixonomía es el estudio de la variación química de los organismos vivos y usa estas características para la identificación y clasificación de los mismos. (Sandoval y Serrano, 2005). El uso de marcadores químicos con valor taxonómico puede reflejar resultados

trascendentes que permiten distinguir microorganismos a nivel de género con solo una prueba; tal es el caso de la detección de la presencia del ácido diaminopimélico (DAP) y la identificación de su isómero en bacterias Gram positivas, incluidos los actinomicetos, (Lechevalier y Lechevalier, 1970).

Las 60 cepas de actinomicetos halófilos mostraron la presencia del isómero *meso*-diaminopimélico. Los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora* presentan el isómero *meso*-diaminopimélico en su pared celular. (Li, et. al., 2003c; Yoshida et. al., 1991).

ELECCIÓN DE CEPAS REPRESENTATIVAS

Las cepas que por sus características morfológicas y fenotípicas fueron seleccionadas como representativas para llevar a cabo el estudio genotípico fueron:

JA6-1, LRS2-2, LRS2-6, LRS4-58, LRS4-100, LRS4-130, LRS4-145, LRSE2-2, COSE-1a, COSE-1b, Y3A-1, CAD96S8-2, CAD96S14-2a, HS4-1b.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GUANINA + CITOSINA

Los puentes de hidrógeno entre los pares de bases, tienen la función de mantener unidas las cadenas de una molécula típica de DNA bicatenario. Puede haber millones de puentes de hidrógeno, dependiendo del número de pares de bases en la molécula. Cada par adenina-timina tiene dos de estos enlaces, mientras que cada par guanina-citosina tiene tres, esto hace que los pares GC sean más fuertes que los pares AT. Si se eleva la temperatura del DNA, los

puentes de hidrógeno se rompen, pero no los enlaces covalentes intracatenarios y las cadenas de DNA se separan. Este proceso de fusión se puede medir experimentalmente debido a que las cadenas sencillas y las dobles difieren en su capacidad para absorber la luz ultravioleta de cierta longitud de onda, aunque tengan la misma secuencia. El DNA con alto porcentaje de pares GC funde a una temperatura más alta que una molécula de tamaño similar con más pares AT. Esto resulta una herramienta poderosa y útil en el estudio de actinomicetos ya que son los microorganismos con mayor porcentaje de pares GC, (Madigan y col., 2003).

El contenido de G+C se determinó por triplicado para cada una de las siguientes cepas, obteniéndose los siguientes resultados como valor promedio en cada caso. Tabla 16. El contenido de G+C del género *Saccharomonospora* es de 69 -74 mol% (Nonomura and Ohara, 1971); mientras que el de *Actinopolyspora* es de 62.4 mol% (Gochnauer et. al., 1975). En las cepas identificadas como *Saccharomonospora*; es importante notar que no en todos los casos los valores coinciden con el rango que reporta la bibliografía, como es el caso de la cepa LRS2-2 y la cepa JA6-1, la cual en el análisis fenotípico no se agrupa con el resto de la colección. Lo mismo ocurre con la cepa COSE-1b, identificada como *Actinopolyspora*.

Cepas seleccionadas de actinomicetos halófilos					
Contenido de G+C (mol %)					
JA6-1	LRS2-2	LRS4-127	LRS4-130	CAD96S8-2	COSE-1b
64.14	65.11	68.58	68.57	68.92	67.12

Tabla 16. Contenido de G+C de cepas de actinomicetos halófilos.

DETERMINACIÓN DE LA INSERCIÓN ESPECÍFICA EN EL GEN 23S DEL rRNA DE BACTERIAS CON ALTO CONTENIDO DE G+C

Amplificación de la inserción específica del rRNA 23S

La aplicación de técnicas de biología molecular ha abierto grandes posibilidades para la detección de bacterias, que como en el caso de muchos actinomicetos resultan difíciles de aislar, cultivar e identificar; debido a que son microorganismos de crecimiento lento, su aislamiento y correcta identificación requiere de periodos prolongados de tiempo. La aplicación de técnicas de amplificación de fragmentos de ADN tales como la PCR, han producido un significativo avance en las capacidades, tanto de detección como de identificación y tipificación al permitir su realización partiendo de muestras de diferente origen como las muestras de tipo ambiental, (Ramírez, 2005).

La amplificación de un fragmento de +/- 100 pares de bases ubicado en la parte central del gen RNAr 23S, fue utilizado como marcador filogenético característico de bacterias Gram positivas con elevado contenido de G+C, (Roller, 1992). La presencia de esta inserción específica fue detectada en las 60 cepas de actinomicetos halófilos aisladas. El amplicón obtenido de eubacterias tiene un tamaño de +/- 250 pares de bases y el obtenido de actinomicetos es de +/- 350 pares de bases. Con esta técnica se demuestra a nivel molecular que todas las cepas aisladas pertenecen al grupo de los actinomicetos. Fig. 4.

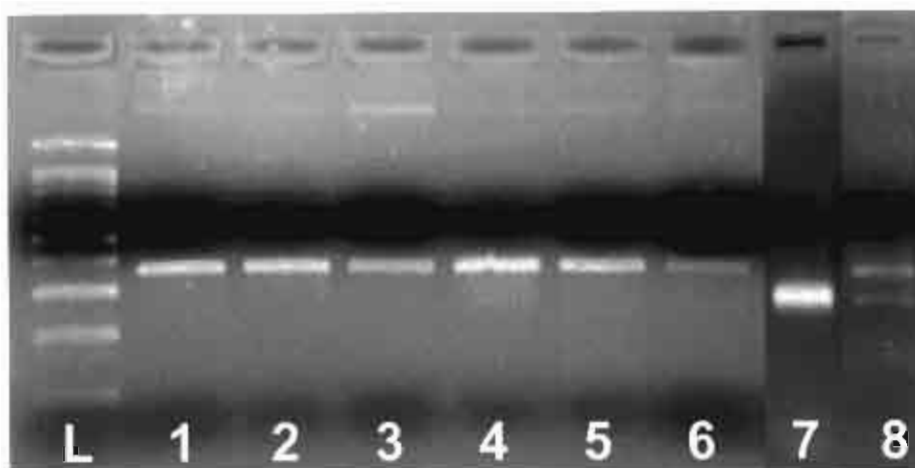


Figura 4. Inserción específica en el 23S de cepas aisladas de actinomicetos halófilos.
 L. Ladder. 1. JA6-1, 2. LRS4-100, 3. LRS2-2, 4. LRSE-2, 5. CAD96S8-2,
 6. COSE-1b, 7. *Escherichia coli*, 8. *E. coli* + actinomiceto

AMPLIFICACIÓN DEL GEN rRNA 16S

Las técnicas moleculares basadas en la detección más o menos específica de secuencias de ácidos nucleicos, han permitido por una parte incrementar notoriamente la capacidad de detección, evitando generalmente los pasos de aislamiento y cultivo. Mientras que por otra, han refinado las posibilidades de identificación y tipificación para bacterias cultivadas. La comparación de secuencias del rRNA 16S, ha facilitado grandemente la identificación de bacterias y la elucidación de sus relaciones naturales. Consecuentemente estas pueden ser utilizadas para determinar relaciones taxonómicas entre especies, (Ramírez, 2005).

La identificación basada en la secuenciación del gen rRNA 16S de 14 cepas de actinomicetos halófilos mostró un porcentaje de similitud en un 97-98% con el género *Saccharomonospora* en el caso de 11 cepas; 2 cepas mostraron semejanza con el género *Actinopolyspora*. Los porcentajes de semejanza con cada género son los siguientes: JA6-1, es semejante a *S. azurea*,

(97%). Las cepas LRS4-145, LRS4-100 y LRS4-130, presentaron semejanza con *S.xianjiangensis* (97%); LRSE2-2, Y3A-1, HS4-1b, LRS2-2, LRS2-6, LRS4-58, CAD96S8-2 y CAD96S14-2a con *S.paurometabolica* (98%). Las cepas COSE-1a y COSE-1b comparten semejanza con *A.mortivallis* (97%). Tabla 17.

Cepa	Microorganismo identificado	% de Similitud	Relación de bases coincidentes
CAD96S8-2	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	97%	833/853
CAD96S14-2*	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	98%	809/824
COSE-1a	<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	95%	696/726
COSE-1b	<i>Actinopolyspora mortivallis</i>	97%	754/773
HS4-1b	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	97%	865/889
JA6-1	<i>Saccharomonospora caesia</i>	97%	873/899
LRS2-2	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	98%	720/731
LRS2-6	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	97%	864/887
LRS4-58	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	98%	846/855
LRS4-100	<i>Saccharomonospora xianjiangensis</i>	97%	836/857
LRS4-130	<i>Saccharomonospora xianjiangensis</i>	96%	798/827
LRS4-145	<i>Saccharomonospora xianjiangensis</i>	98%	787/801
LRSE2-2	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	98%	720/731
Y3A1	<i>Saccharomonospora asparaginophila</i>	98%	752/761

Tabla 17. Identificación de 14 cepas de actinomicetos halófilos con los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*, de acuerdo a la secuenciación del gen rRNA 16S.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Siendo la filogenia el estudio de la evolución y desarrollo de las especies (Murray col, 1995). La comparación de secuencias de algunas macromoléculas, es la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas. Estos datos, son preferibles sobre otros métodos moleculares por poseer cercanías evolutivas, debido a que permiten interpretaciones cuantitativas y directas. (Pace y col., 1986). La representación de las relaciones filogenéticas más común es un gráfico de conexiones en forma de árbol, donde se muestran las relaciones entre las especies estudiadas

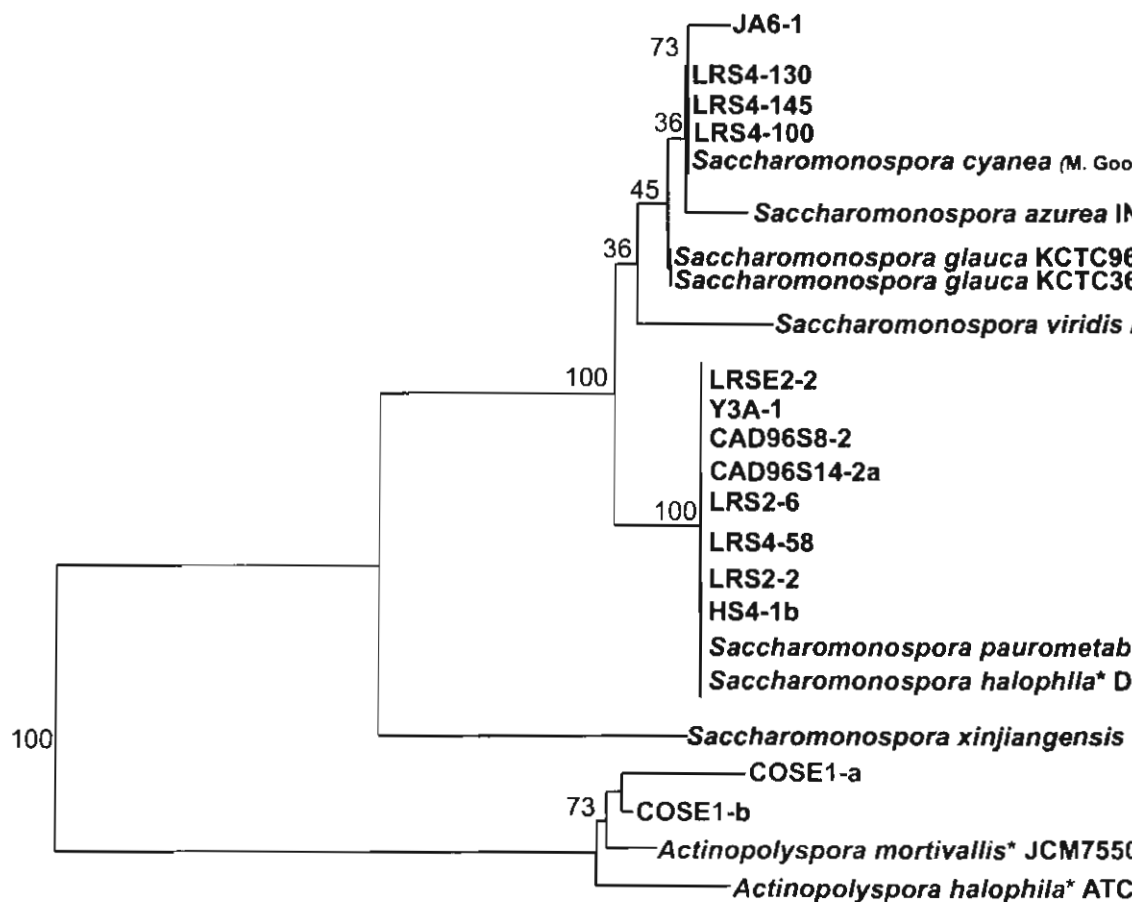
El análisis de la secuenciación parcial del rRNA 16S de las cepas seleccionadas fue realizado comparado con especies de los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*, el árbol filogenético obtenido muestra la formación de 3 grupos principales. El primer grupo contiene las cepas: JA6-1, LRS4-145, LRS4-130 y LRS4-100, aisladas del sur de México, este grupo se encuentra asociado con la especie *S.cyanea*; es un grupo muy disperso, con un valor de “bootstrap” muy bajo (36%), lo cual nos lleva a suponer que las cepas de este grupo son microorganismos diferentes, ya que la probabilidad de agrupamiento es muy baja.

El segundo grupo contiene las cepas: LRSE2-2, Y3A-1, HS4-1b, LRS2-2, LRS2-6, LRS4-58, CAD96S8-2 y CAD96S14-2a las cuales fueron aisladas tanto en México como en España; formando un grupo monofilético con las especies *S.halophila* y *S.paurometabólica*, ambas especies halófilas. El valor de “bootstrap” es de 100%.

El tercer grupo contiene las cepas COSE-1a y COSE-1b, ambas aisladas en el norte de México; en este grupo las cepas se encuentran relacionadas con las especies *A.halophila* y *A.mortivallis*; ambas especies halófilas, este grupo presenta un valor de “bootstrap” de 73%, Fig. 5 y 6. *A.halophila* y *A.mortivallis* fueron los primeros actinomicetos aislados en Canadá y California respectivamente, (Gochnauer, 1975; Yosida, 1991).

Géneros de actinomicetos que contienen especies halófilas

0.01

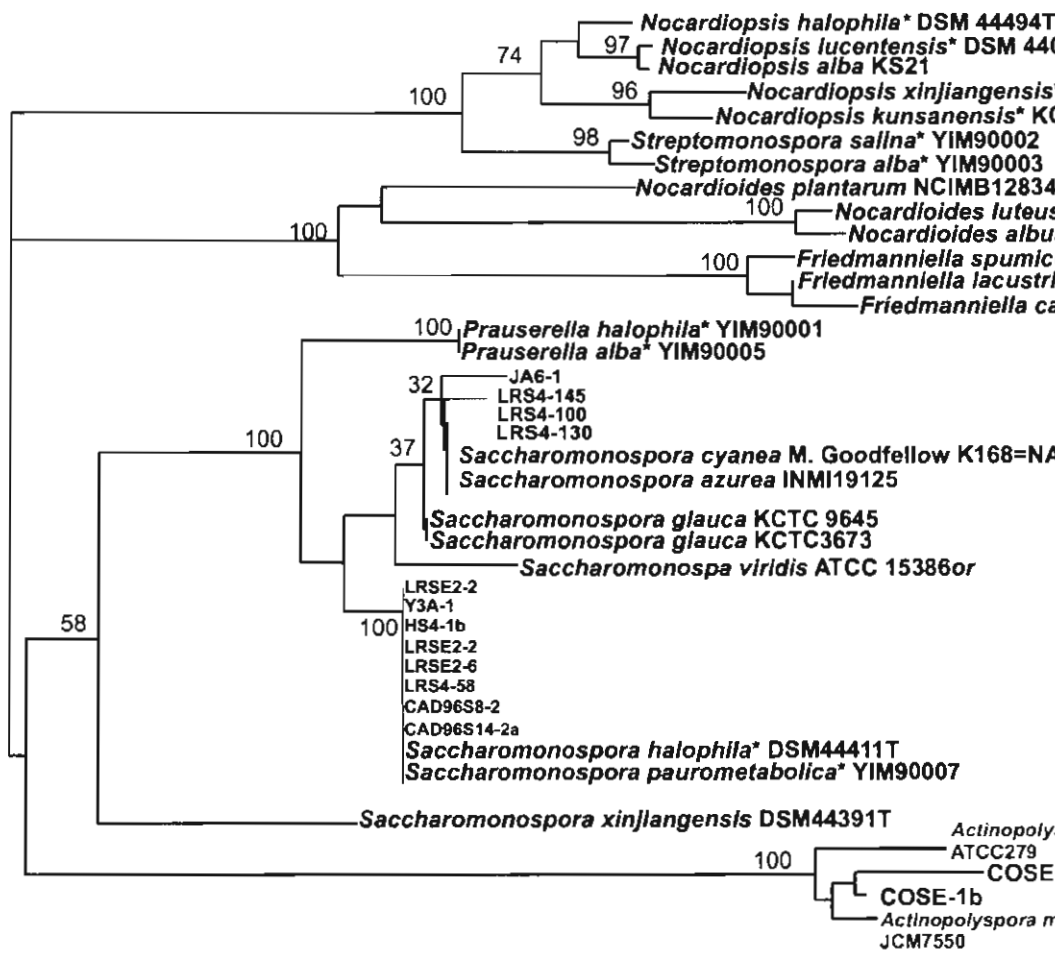


* Especies halófilas

Figura 5. Árbol filogenético determinado en base a la comparación de secuencias del rRNA 16S, en el que se muestra la posición filogenética de las cepas de actinomicetos estudiadas y de otras especies relacionadas de los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*

**Géneros de actinomicetos
que contienen especies
halófilas**

0.01



* Especies halófilas

Figura 6. Árbol filogenético determinado en base a la comparación de secuencias del rRNA 16S, en el que se muestra la posición filogenética de las cepas de actinomicetos estudiadas y de otras especies relacionadas de todos los géneros de actinomicetos que incluyen especies halófilas.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado en esta tesis permitió crear la primera colección de actinomicetos halófilos en México, formada por 60 cepas provenientes de lagunas costeras y salinas de las zonas norte y sur del país.

Las lagunas costeras y las salinas a pesar de estar cerca de la costa generalmente no tienen comunicación directa con el mar, muchas salinas costeras de donde se obtiene sal por evaporación del agua de mar son en realidad lagunas saladas artificiales. Los organismos que habitan en estos ecosistemas generalmente se encuentran en un medio con amplias fluctuaciones en el nivel de las aguas y cambios en su temperatura, composición química y contenido total de sales.

Con el propósito de suministrar a las cepas aisladas un conjunto de nutrientes que les permitieran realizar sus funciones, se utilizó el medio MH modificado, el cual fue complementado con sal marina. Diferentes organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos. Los microorganismos que constituyen nuestra colección, provienen de ambientes hipersalinos lo cual lleva a pensar que los micro nutrientes contenidos en la sal marina son requeridos y asimilados por los microorganismos halófilos. El medio utilizado para el aislamiento y mantenimiento de actinomicetos halófilos produjo un crecimiento favorable de los microorganismos.

Las observaciones morfológicas al microscopio electrónico de barrido permitieron conocer aspectos de la estructura filamentosa de los actinomicetos, asimismo de la conformación y disposición de sus esporas. Estas características, resultado de un estudio preliminar de morfología dieron lugar a la formación de dos grupos de cepas, siendo las características coloniales y la disposición de las esporas las principales diferencias entre ambos grupos.

Las pruebas fisiológicas realizadas para determinar el porcentaje de salinidad al cual se encontró el crecimiento óptimo de los actinomicetos aislados, confirma que al requerir un mínimo de 10% de salinidad para su desarrollo, son considerados actinomicetos halófilos.

La primera caracterización de las cepas se realizó por medio de un estudio fenotípico el cual permitió conocer las características bioquímicas y su capacidad de degradación y asimilación ante una serie de sustratos seleccionados. La caracterización fenotípica permitió construir una base de datos donde se pueden consultar las capacidades bioquímicas y metabólicas de los miembros que conforman la colección.

El análisis taxonómico de las características filogenéticas, distribuye a las cepas en cinco grupos con un porcentaje de similitud de 74%, (Figura 3). Los grupos I, II, III y IV están constituidos por cepas aisladas en el sur de México, el grupo III, agrupa además las cepas aisladas en España; el grupo V, contiene únicamente a las cepas aisladas en la zona norte de México.

El estudio taxonómico basado en características fenotípicas permitió la formación de un grupo de cepas de actinomicetos halófilos caracterizados bioquímica y nutricionalmente; abriendo un amplio campo de aplicaciones futuras como es el caso de diseños de nuevos medios de cultivo para este tipo de microorganismos.

Por otro lado, la necesidad de relacionar las cepas aisladas con géneros conocidos de actinomicetos, condujo el trabajo a la realización de un estudio quimiotaxonómico y molecular para lo cual fue necesario elegir algunos miembros representativos de los grupos previamente formados, la elección de cepas representativas, estuvo basada en las principales diferencias morfológicas y de origen de los microorganismos.

La caracterización quimiotaxonómica basada en la determinación de la presencia del enantiómero *meso* del ácido diaminopimélico en la pared celular, permitió descartar la presencia de géneros de Actinomicetos que contienen el enantiómero L- DAP, (por ejemplo *Streptomyces*), ya que las 60 cepas contienen *meso*-DAP.

El análisis de contenido de GC, realizado a las cepas: JA6-1, LRS2-2, LRS4-127, LRS4-130, CAD96S8-2 y COSE-1b, estuvo dentro de un rango de 64.14 a 68.92 mol%; el contenido de GC para los actinomicetos se encuentra varía de 63 a 78 mol%, una vez mas se confirma que las cepas aisladas corresponden al grupo de actinomicetos.

Por medio de una técnica molecular, en la cual se amplifica una fracción del gen rRNA 23S, propio de los microorganismos Gram positivos de alto contenido de GC, se confirmó a este nivel (molecular) que las 60 cepas aisladas son actinomicetos.

En 1969, Carl Woese y sus colegas decidieron examinar la secuencia del rRNA 16S de muchos organismos, con especial énfasis en bacterias inusuales que previamente eludieron colocación filogenética. Woese escogió el rRNA 16S para la construcción de un árbol filogenético, debido a su universalidad y su alta conservación en estructura y función. Después propuso que los procariotes fueran divididos en 2 grupos, llamados arqueobacterias y eubacterias, los cuales son tan diferentes uno de otro, como cualquiera de ellos lo es de los eucariotes (Pace y col., 1986; Watson y col., 1987).

La comparación de las secuencias de los rRNA 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias (Eisen y col. 1992). No obstante, debemos considerar, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los rDNA 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas.

La secuenciación del rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas altas (arriba del nivel de género). Debido a que la molécula de rRNA 16S contiene regiones

altamente variables, es usualmente posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias (Murray col., 1995).

Un estudio filogenético de la secuencia parcial del rRNA 16S permitió identificar los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*. Los géneros encontrados mostraron una distribución geográfica diferente, siendo el género *Actinopolyspora*, presente en el norte del país; mientras que el género *Saccharomonospora* predomina en el sur del país.

El género *Saccharomonospora* incluye microorganismos que producen predominantemente esporas únicas sobre hifas aéreas. En medio con agar forma micelio vegetativo ramificado, usualmente cubierto con micelio aéreo en el cual las esporas están densamente empaquetadas a lo largo de la hifa. El micelio aéreo inicialmente es de color blanco, transformándose después de gris verdoso a verde oscuro; la pigmentación verde también puede observarse en el micelio vegetativo y difundir dentro del medio. Ocasionalmente se presentan esporas en las hifas aéreas y vegetativas en pares o cadenas cortas. Son microorganismos Gram positivos. La pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico junto con los azúcares arabinosa y galactosa. La membrana celular no contiene ácidos micólicos, pero tiene cantidades mayores de ácidos grasos *iso* y *anteiso*, fosfatidiletanolamina y menaquinonas que son tetrahydrogenadas con 9 unidades isoprenas (MK-9(H₄)). Microorganismos aeróbicos, quimioorganotróficos. Requieren complementos de aminoácidos y vitaminas para un buen crecimiento. Crecen en rangos de temperatura óptimos de 35-50 °C, y rangos de pH de 7.0 a 10.0. Su crecimiento no es inhibido por NaCl (3% w/w). Producen catalasa, deaminasa y fosfatasa. Degradan caseína, gelatina, almidón, xilano y tirosina. No presentan actividad

contra la celulosa. Pueden utilizar un gran número de componentes como fuentes de carbono entre estos la capacidad para utilizar glicerol. Los miembros de este género pueden ser aislados de suelo y sedimentos de lagos, pero son más comunes en abonos y alimentos fermentados. El mol% de G+C del DNA es 69-74 (Tm), (Nonomura y Ohara, 1971).

El género *Sccharomonospora* incluye 7 especies, *S.azurea*, *S.cyanea*, *S.glauca*, *S.viridis*, *S.xinjiangensis*, *S.halophila* y *S.paurometabolica*. El género *Saccharomonospora* contempla 2 especies halófilas, *S. halophila* aislada en Kuwait de una muestra de suelo pantanoso, y *S. paurometabólica* aislada de un suelo salino en China. (Al-Zarban y col., 2002; Li y col., 2003c).

El género *Actinopolyspora* incluye microorganismos con filamentos ramificados que forman extenso micelio vegetativo no fragmentado de aproximadamente 1µm de diámetro. Ocasionalmente se observan fragmentaciones cerca del centro de la colonia. Los esporóforos contienen 20 o mas esporas lisas cocoidales o cocobacilares producidas en hifas aereas. No se observan esporas en el micelio vegetativo. Los microorganismos son Gram positivos. La pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico con arabinosa y galactosa. No presentan ácidos micólicos. Su crecimiento es aerobio. Son quimio-organotróficos. Utilizan diferentes fuentes de carbono. El mol % de G+C del DNA es 64.2 (determinación espectrofotométrica). (Gochnauer y col., 1975).

El género *Actinopolyspora* solo contempla 3 especies y son todas halófilas. *A. halophila*, fue el primer actinomiceto halófilo reportado, fue aislado en Canadá como un contaminante en un medio con 25% de NaCl. *A. mortivallis* aislada de una muestra de suelo salado en California y *A. iraquensis* fue aislada de suelo salino en Iraq. (Gochnauer y col., 1975; Ruan y col, 1994; Yoshida y col., 1991).

Desde el punto de vista taxonómico, la especie bacteriana se define como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación DNA-DNA. Las cepas con este nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes rRNA 16S. Así, cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias de sus rRNA 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994).

Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99 - 100% a nivel de rRNA 16S. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación, (Stackebrandt y col., 2000).

La precisión de las inferencias filogenéticas de las secuencias del rRNA, depende del número de bases comparadas; y para ser completamente efectivas, al menos deben ser consideradas 1000 bases para cada organismo (Fry y col., 1991).

Aunque en los últimos años el estudio de las secuencias del gen rRNA 16S se ha considerado una herramienta estándar representativa de sistemas procarióticos, los resultados de éste estudio hacen pensar que el fragmento seleccionado del gen rRNA 16S no es lo suficientemente discriminante para separar las especies del género *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*, es decir que a nivel 16S se tienen secuencias nucleotídicas poco polimórficas para realizar una identificación mas precisa, asegurando únicamente que las cepas aisladas corresponden a los géneros mencionados. Para asegurar si los aislados podrían o no constituir un taxón nuevo es necesario realizar un estudio de homología DNA-DNA.

PROYECCIÓN

La búsqueda y aislamiento de nuevas cepas de actinomicetos halófilos contribuye a la obtención de nuevas fuentes naturales de productos de interés industrial. Los microorganismos extremófilos con un gran potencial biotecnológico, dentro del cual podemos mencionar el caso de la enzima *polimerasa taq* que ha revolucionado la historia de la biología molecular, cuando al participar en una reacción en cadena permite obtener millones de copias de DNA *in vitro* en pocas horas sin la necesidad de usar células vivas. Las bacterias halófilas al ser microorganismos extremófilos nos ofrecen una amplia gama de enzimas y otros productos de aplicación industrial, farmacéutica y cosmética entre otros, tal es el caso de la ectoína, que ha demostrado poseer un efecto protector sobre las enzimas lábiles y resulta ser un excelente protector al calor y a procesos de congelación y descongelación. En el grupo de los actinomicetos halófilos ya se ha demostrado la presencia de ectoína en *Actinopolyspora*

halófila, lo cual nos lleva a pensar que es muy probable que los actinomicetos halófilos, resulten ser microorganismos con importantes aplicaciones, debido a su fisiología como microorganismos adaptados a vivir en ambientes extremos.

Los actinomicetos halófilos al ser extremófilos cuentan con una perfecta adaptación a las condiciones de vida que prevalecieron durante las primeras etapas de la evolución biológica. El estudio de algunos modelos de ecosistemas terrestres que aparentemente serían inhóspitos para la vida, dadas sus condiciones físicas extremas como es el caso del Río Tinto, en España, han revelado condiciones ambientales muy parecidas a las de Marte. El estudio del ecosistema del Río Tinto ha permitido aislar cerca de 1,300 especies, con esto, nos ofrece altas posibilidades de esclarecer algunos puntos sobre los inicios de la vida en la tierra, así como desvelar algunas claves sobre la vida en otros planetas.

Respecto al caso particular de las bacterias halófilas, podemos decir que en muchas partes del mundo, se encuentran los depósitos de sal que se originaron a partir de períodos tempranos de la historia geológica de la tierra. Particularmente los sedimentos grandes que fueron depositados durante la era pérmica y triásica (280 a 195 millones de años antes del presente).

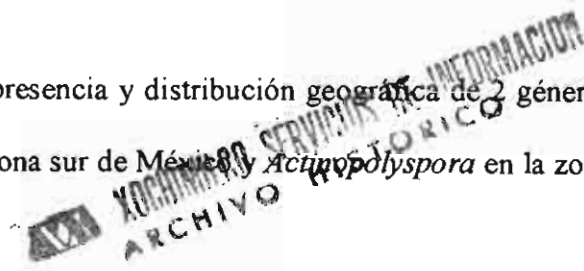
Exámenes microscópicos han revelado la presencia de bacterias en muestras disueltas de sal de roca (Sonnenfeld, 1984). Se han aislado bacterias extremadamente halofílicas de minas de sal triásicas y pérmicas en Gran Bretaña y Austria (Stan-Lotter, 1995).

La importancia del hallazgo de organismos viables a partir de épocas paleozoicas se extiende a otras áreas del estudio científico, tales como la búsqueda de vida extraterrestre.

Finalmente la posibilidad de poder aplicar las técnicas de aislamiento que se han desarrollado hasta ahora en la búsqueda de microorganismos halófilos, en muestras provenientes de ecosistemas fuera del planeta es muy alta y permitiría continuar con los estudios que hasta ahora han reportado hallazgos de microorganismos halófilos en muestras que los han conservado durante millones de años.

CONCLUSIONES

- 1.- Se creó la primera colección caracterizada fenotípica y molecularmente de actinomicetos halófilos aislados a partir de salinas y lagunas costeras en México.
- 2.- Se confirmó por estudios de microscopía electrónica que las cepas aisladas corresponden morfológicamente a géneros de actinomicetos.
- 3.- Se confirmó a nivel molecular por la presencia de una inserción específica en el rRNA 23S que las cepas aisladas son microorganismos de alto contenido de G + C (Actinomicetos).
- 4.- Se confirmó fisiológicamente que las cepas de actinomicetos aislados son microorganismos halófilos.
- 5.- Un estudio filogenético de la secuencia parcial del gen 16S, permitió identificar 2 géneros de actinomicetos que contemplan especies halófilas: *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora*.
- 6.- Este estudio pionero permitió conocer la presencia y distribución geográfica de 2 géneros de actinomicetos: *Saccharomonospora* en la zona sur de México y *Actinopolyspora* en la zona norte de México.



BIBLIOGRAFÍA

Abe F., Horikoshi K. 2001. The biotechnological potential of piezophiles. *Trends Biotechnol*, 19: 102–108.

Adams M. W., Perler F.B., Kelly R.M. 1995. Extremozymes: Expanding the limits of biocatalysis. *Bio/technology*, 13: 662-668.

Adams, R.L., Bygraves, J., Kogut, M., Russell, N.J. 1987. The role of osmotic effects in haloadaptation of *Vibrio costicola*. *J. Gen. Microbiol*, 133:1861.1870.

Alcocer J., Williams W. D. 1993. Lagos salinos mexicanos. *Biodiversidad marina y costera de México*. 849-865.

Al-Tai, A.M., Ruan, J.S. 1994. *Nocardiopsis halophila* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. *Int J Syst. Bacteriol*, 478.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-3402.

Al-Zarban, S.S., Al-Musallam, A.A., Abbas, I., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R.M. 2002. *Saccharomonispora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Syst Bacteriol and Evol. Microbiol*, 52: 555 – 558.

Belitsky B.R., Brill J., Bremer E., Sonenshein A.L. 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 183: 4389-4392.

Bernard, T., Jebbar, M., Rassouli, Y., Himdi-Kabbab, S., Hamelin, J., Blanco, C. 1993. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J Gen Microbiol*, 139: 129-136.

Bowman, J.P., Mccammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., Mcmeekin T.A. 1997. Diversity and association of psychophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3068-3078.

Bremer , E., Krämer, R. 2000. Doping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. En G. Storz y R. Hengge-Aronis (eds.) *Bacterial Stress Responses*. Washington, D. C.: ASM Press. pp. 79-97

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

Cánovas, D., Borges, N., Vargas, C., Ventosa, A., Nieto, J.J. 1999. Role of N- γ -acetildiaminobutirate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol*, 65: 3774-3779.

Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L.N., Ventosa, A., Nieto, J.J. 1998. Synthesis of glycine betaine from exogenous choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol*, 64: 4095-4097.

Cary S.C., Shank T., Stein J. 1998. Worms bask in extreme temperatures. *Nature*, 39: 1545-546.

Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 253-261.

Cavicchioli R., Thomas T. 2000. Extremophiles. En: J. Lederberg (ed). Enciclopedia de la Microbiología 2ª. Edición vol 2 pp 317-337. Prensa Académica. San Diego.

Chun, J., Bae, K.S., Moon, E.Y., Jung, S.O., Lee, H.K., Kim, S.J. 2000. *Nocardiopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Bacteriol and Evol. Microbiol*, 50: 1909-913.

Cui, X.L., Mao, P.H., Zeng, M., Li, W.J., Zhang, L.P., Xu, L.H., Jiang, Ch.L. 2001. *Streptomonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardioptaceae. *Int J Syst Bacteriol and Evol. Microbiol*, 51: 357 – 363.

Da Costa, M., Santos, H., Galinski, E.A. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archea*. En Scheper, T. (ed), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol 61*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 117-153.

DasSarma S. 1995. Halophilic Archaea: An Overview. En: DasSarma S., Fleischmann E.M (ed). *Archaea a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 3-11.

Deming J.W. 2002. Psychrophiles and polar regions *Curr Opin Microbiol*, 5: 301-309.

Demirjian D.C., Moris-Varas F., Cassidy C.S. 2001. Enzymes from extremophiles, *Curr Opin Chem Biol*, 5: 144-151.

Dennis P.P., Shimmin L.C. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61: 90-104.

Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F. 2000. An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science*, 287: 1796-1799.

Efron, B., Gong, G. 1983. A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *American Statistician*, 37, 36-48.

Eichler J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv*, 19: 261-278.

Eisen, J., Smith, S., Cavanaugh, C. 1992. Phylogenetic Relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* Say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. of Bact.* 174, 3416-3421.

Ewald, U. 1997. La Industria Salinera de México. FCE. México. pp 1560-1994.

Feller G., Gerday C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nat Rev Microbiol*, 1: 200-208.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

Ferragut, C., Leclerc, H. 1976. Etude comparative des méthodes de détermination du T_m de l'ADN bactérien. *Ann Microbiol*, 127, 223-235.

Fry, N., Warwick, S., Saunders, N., Embley, T. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol*, 137: 1215-1222.

Galinski E.A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. En R.K. Poole (ed), *Advances in Microbial Physiology*. London. Academic Press. pp. 273-329.

Galinski E.A., Pfeiffer H.P., Trüper H.G. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. *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., Louis, P. 1998. Compatible solutes : ectoine production and gene expression, *En A. Oren (ed), Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Enviroments*. Boca Raton: CRC Press.

Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Cabios*, 12: 543-548.

Georlette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., Marx J.C., Sonan G., Feller G., Gerday C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbio. Rev*, 28: 25-42.

Gochnauer M.B., Leppard G.G., Komaratat P., Kates M., Novitsky T., Kushner D.J. 1975. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *J Microbiol*, 21: 1500-1511.

Göller, K., Offer, A., Galinski, E.A. 1998. Construction of a NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett*, 161: 293-300.

Grossmann S., Gleitz M. 1993. Microbial responses to experimental sea ice formation: implications for the establishment of Antarctic sea ice communities. *J Exp Mar Biol Ecol*, 173: 273-289.

Haki G.D., Rakshit S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*, 89: 17-34.

Hayashi R. 1996. Use of High pressure in bioscience and biotechnology. En: R. Hayashi, C. Balny (Eds.), *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Elsevier, pp 1-6.

Hei D.J., Clark D.S. 1994. Pressure stabilization of proteins from extreme thermophiles. *Appl Environ Microbiol*, 60: 932-999.

Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 735-750.

Inbar, L., Lapidot, A. 1988. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ^{13}C and ^{15}N -labeled and ^{13}C and ^{15}N -NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 263: 16014-16022.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vandoise Sci Nat*, 44: 223-270.

Javor B.J. 1989. Hypersaline environments; Microbiology and biogeochemistry. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.

Kamekura M., Hamawata T., Onishi, H. 1992. Application of halophilic nuclease H from *Micrococcus varians* subs. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol*, 44: 994-995.

Kamekura, M., Bardócz, S. Anderson, P., Wallace, R., Kushner, D.J. 1986. Polyamines in moderately and extremely halophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 880: 204-208.

Kappes, R.M., Kempf, B., Bremer, E. 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol*, 178: 5071-5079.

Kar N.S., Dasgupta A.K. 1996. The possible role of surface charge in membrane organization in an acidophile, Indian. *J Biochem Biophys*, 33: 398-402.

Koneman, E.W. 1983. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 2nd ed. Lippincott Philadelphia.

Kuhlmann, A.U., Bremer, E. 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 68: 772-783.

Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations. *En: Kushner D.J. (ed) Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London, pp 317 -368.

Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., Mcdougall, J., Strom, A.R. 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 5: 1049-1064.

Lamosa, P., Martins, L.O., Da Costa, M., Santos, H. 1998. Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3591-3598.

Larsen P.I., Sydnes L.K., Landfald B., Strom A.R. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol*, 147: 1-7.

Lawson, P.A., Collins, M.D., Schumann, P., Tindall, B.J., Hirsch, P., Labrenz, M. 2000. New LL- diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella lacustris* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 23: 219-229.

Lechevalier MP y Lechevalier HA. 1970. Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. En: (ed) Prause H. The actinomycetales. Gustv-Fiche. Jena.

Li, M.G., Li, W.J., Xu, P., Cui, X.L., Xu, L.H. Jiang, Ch.L. 2003a. *Nocardiopsis xinjiangensis* sp. nov., an halophilic actinomycete isolated from a saline soil sample in China. *Int J Syst Bacteriol Evol Microbiol*, 53: 317 - 321.

Li, W.J., Tang, S.K., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Xu, L.H., Jiang, Ch.L. 2003c. *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. *Int. J. Syst Bacteriol Evol Microbiol*, 53: 1591 - 1594.

Li, W.J., Xu P., Tang, S.K., Xu, L.H., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Jiang, Ch.L. 2003b. *Prauserella halophila* sp. nov. and *Prauserella alba* sp. nov. Moderately halophilic actinomycetes from saline soil. *Int. J. Syst. Bacteriol Evol Microbiol*, 53: 1545 - 1549.

Li, W.J., Xu, P., Zhang, L.P., Tang, S.K., Cui, X.L., Mao, P.H., Xu, L.H., Schumann, P., Stackebrandt, E., Jiang, Ch.L. 2003d. *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui *et al.* 2001. *Int J. Syst. Bacteriol Evol Microbiol*, 53: 1421 - 1425.

Louis P., Trüper H.G., Galinski E. 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41: 648-688.

Louis, P., Galinski, E. 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.

Lucht, J.M., Bremer, E. 1994. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol Rev*, 14: 3-20.

Ludwig H., Scigalla W., Sojka B. 1996. Pressure and temperature induced inactivation of microorganisms. En: J. L. Markley, D. B. Northrop, C. A. Royer (Eds.), High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology, Oxford University Press, New York, pp 346-363.

Ma Y., Xue Y., Grant W.D., Collins N.C., Duck-worth A.W., van Steenbergen R.P., Jones B.E. 2004. *Alkalimonas amylolyticagen. nov.*, sp. nov., and *Alkalimonas delamerensisgen. nov.*, sp. nov., novel alkaliphilic bacteria from soda lakes in China and East Africa. *Extremophiles*, 8: 193-200.

MacElroy R.D. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6:74-75.

Madigan M.T., Marris B.L. 1997. Extremophiles. *Scientific American*, 276: 82-87.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock Biología de los microorganismos. Ed. Pearson-Prentice Hall. Tenth edition. U.S.A.

Margesin R., Feller G., Gerday C., Russell N. 2002. Cold-Adapted Microorganisms: Adaptation Strategies and Biotechnological Potential. En: The Bitton Ed., Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol.2, G. John Wiley & Sons, New York, pp 871-885.

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

Marmur J. 1961. A Procedure for the isolation of Deoxyribonucleic Acid from microorganism. *J Mol Biol*, 3: 208-218.

Márquez, M. C. 1987. A taxonomic study of heterotrophic and halophilic and non – halophilic bacteria from a solar saltern. *J Gen Microbiol*, 133: 45 - 56.

Martins, L.O., Santos, H. 1995. Accumulation of mannolyglycerate and di-*myo*-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl Environ Microbiol*, 61: 3299 - 3303.

Mergeay M., Monchya S., Vallaeyts T., Auquier V., Benotman A., Bertin P., Taghavi S., Dunn J., van der Lelie D., Wattiez R. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 385-410.

Min-Yu, L. Ono, H., Takano, M. 1993. Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. Annu. Rep. Int. Center Cooperative Res. Biotechnol. Japan. 16:193-200.

Monteoliva-Sánchez, M., Ferrer, M.R., Ramos-Cormenzana, A. Quesada, E., Monteoliva, M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *J Gen Microbiol*, 134: 199 - 203.

Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J. 1993. The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *J Gen Microbiol*, 139: 1877-1884.

Moore, E. 1999. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Mol Microbiol Ecol M*, 1-15.

Mozhaev V.V., Bec N., Balny C. 1994. Pressure effects on enzyme reactions in mainly organic media: α -chymotrypsin in reversed micelles of Aerosol OT in octane, *Biochem Mol Biol Int*, 34: 191-199.

Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, R. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. 6a. Edition. ASM Press.

Niehaus F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 711-729.

Nyysola A., Kerovuo J., Kaukinen P., Von WeymRNA N., Reinikainen T. 2000. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem*, 275: 22196-22201.

Olalde V. y Aguilera L.I. 1998. Microorganismos y biodiversidad. *Terra* 16: 289-292

Ono, H., Sawada, K., Khunajakr, N., Tao, T., Yamamoto, M., Hiramoto, M., Shinmyo, A., Takano, M., Murooka, Y. 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., Guverich P., Azachi M., Henis Y. 1993. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations, En: E. Rosenberg (ed). *Microorganisms to Combat Pollution*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 263-274.

Oren, A. 1999. Bionergetics aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 334-348.

Overdier, D.G., Olson, E.R., Erickson, B.D., Ederer, M.M., Csonka, L.N. 1989. Nucleotide sequence of the transcriptional control region of the osmotically regulated *proU* operon of *Salmonella typhimurium* and identification of the 5' endpoint of the *proU* mRNA. *J Bacteriol*, 171: 4694-4706.

Owen, R. J., Hill, L. R. 1979. The estimation of base compositions, base pairing and genome sizes of bacterial deoxyribonucleic acids. En: Skinner, F. A. y Lovelock, D. W. ed. *Identification Methods for Microbiologists*. 2nd ed. Academic Press, London. pp. 277-296

Pace, N., Olsen, G., Woese, C. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*. 45: 325-326.

Peters, P., Galinski, E.A., Trüper H.G. 1990. The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett*, 71: 157-162.

Pledger R.J., Crump B., Baros J.A. 1994. A barophilic response by two hyperthermophilic, hydrothermal vent Archaea: an upward shift in the optimal temperature and acceleration of growth rate at supra-optimal temperatures by elevated pressure. *FEMS Microbiol Ecol*, 14: 233-242.

Pocard, J.A., Vincent, N., Bomcopagni, E., Smith, L.T., Poggi, M.C., Le Rudulier, D. 1997. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiol.* 143: 1369-1379.

Prescott, G.W. 1978. How to know the freshwater algae. 3rd ed. Wm. C. Brown, Dubuque, Iowa.

Ramírez, HC. 2005. Detección y tipificación de actinomicetos patógenos basadas en técnicas moleculares. En: Serrano JA, y Sandoval H. (ed) Identificación y diagnóstico de actinomicetales patógenos. Universidad de los Andes, Mérida Venezuela pp: 203-218.

Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80 Exeter Software, New York.

Röling W.F.M., Van Verseveld H. 1996. Characterization of *Tetragenococcus halophila* populations in Indonesian soy mash (ketchup) fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 62: 1203-1207.

Roller C., Wolfgang L., Schleifer, K.H. 1992. Gram – positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J Gen Microbiol*, 138: 1167-1175.

Rossi M., Ciaramella M., Cannio R., Pisan F.M., Moracci M., Bartolucci S. 2003. Meeting Review (Extremophiles 2002). *JouRNAl of Bacteriology*, 185: 3683-3689.

Rothschild L.J., Manicynelli R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409: 1092-1101.

Ruan, J.S., Al-Tai, A.M., Zhou, Zh., Qu, L.H. 1994. *Actinopolyspora iraqiensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. *Int. J Syst Bacteriol*, 759-763.

Russell N.J. 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. En: R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds). *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press. Boca Raton: pp. 163-210.

Saitou, N., Imanishi, T. 1989. Relative efficiencies of the Fitch- Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molec Biol and Evol*, 6: 514 -525.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schleper C., Pühler G., Kühlmorgen B., Zillig W. 1995. Life at extremely low pH. *Nature*, 375: 741-742.

Seckbach, J. 1994/5. The first eukaryotic cells-acid hot-spring algae. *J Biol Physics*, 20: 335-345.

Serrano JA, y Sandoval H. 2005. Identificación y diagnóstico de actinomicetales patógenos. Universidad de los Andes, Mérida Venezuela.

Serrano, JA, Sandoval, H., Ramírez, N., Ventosa, A. 2003. Método simplificado para el estudio morfológico por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de actinomicetos halófilos. *Rev Soc de Microbiol Ven*, 3: 42-46.

Severin, J., Wohlfarth, A., Galinski, E.A. 1992. The predominant role of the recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of the halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol*, 138: 1629-1638.

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Clasification. Freeman, W. H., San Francisco.

Sokal, R. R., Michner, C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull*, 38:1409-1438.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 1043-1047.

Stackebrandt E, Goebel BM. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 44: 846-849.

Stan-Lotter H. 1995. On the isolation of halophilic microorganisms from salt deposits of great geological age. *Marsbugs: The Electronic Exobiology Newsletter*, 2: 3.

Staneck, J.L., Roberts, G.D. 1974. Simplified approach to the identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol*, 28: 266-231.

Stanier R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M. 1966. The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*, 43: 159-271.

Strom, A.R., Kaasen, I. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and regulation of gene expression. *Mol Microbiol*, 8: 205-210.

Valderrama, M.J., Monteoliva-Sánchez, M., Quesada, E., Ramos-Cormenzana, A. 1998. Influence of salt concentration on the cellular composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Res Microbiol*, 149: 675-679.

Valls M., de Lorenzo V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev*, 26: 327-338.

Van Den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opinion in Microbiology*, 6: 1-6.

Ventosa A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria, En F. Rodriguez-Valera (ed), *Halophilic Bacteria*. CRC Press. Boca Raton: pp. 71-84.

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

Ventosa, A., Quezada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Comenzana, A. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram – negative rods. *J Gen Microbiol*, 128: 1959-1968.

Viramontes C. 1998. La producción de sal en Oaxaca. Una tradición milenaria. En: *La sal en México* tomo I. Dirección General de Culturas Populares. México. pp 35-36.

Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J., Weiner, A. 1987. *Molecular Biology of the Cell*. 4ta Edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

- Wiegel J., Keubrin U.V. 2004. Alkalitermophiles. *Biochem Soc Trans*, 32: 193-198
- Williams R. 1998. La diosa de la sal: Los ámbitos de la mitología y el simbolismo. En: Juan Carlos reyes Garza (ed). La sal en México tomo II. Dirección General de Culturas Populares. México. pp 363-366.
- 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.
- Wood, J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signal and membrane based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 230-262.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Krämer, R., Poolman, B., Van Der Heide, T., Smith, L.T. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solutes accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol*, 130: 437-460.
- Yano J.K., Poulos T.L. 2003. New understandings of thermostable and piezostable enzymes. *Curr Opin Biotechnol*, 14: 360-365.
- Yassin, A.F., Galinski, E.A., Wohlfarth, A., Jahnke, K.D., Schaal, K.P., Trüper, H.G. 1993. A new actinomycete species, *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 266 - 71.

Yosida M., Matsubara K., Kudo T., Horikoshi K. 1991. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol*, 15-20.

ANEXO

ESTUDIO FENOTÍPICO
Base de datos

Tabla A. Pruebas bioquímicas realizadas a actinomicetos halófilos.

Cepa	Indol	Rojo de Metilo	Voges Proskauer	NO ₃	NO ₂	NH ₃	Citratos	Ácido sulfhídrico	Fenilalanina desaminasa	Ureasa	Arginina	Lisina
JA6.001	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS2.002	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS2.006	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.013	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.030	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
LRS4.058	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
LRS4.062	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LRS4.074	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LRS4.080	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LRS4.085	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
LRS4.091	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
LRS4.096	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
LRS4.097	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.099	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.100	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.102	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.106	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.120	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.123	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.125	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.126	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.127	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
LRS4.130	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.132	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-


 SISTEMA NACIONAL DE ARCHIVOS
 ARCHIVO HISTÓRICO

COSE - 1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COSE - 1b	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
COSE-1c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Y3A1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
CAD96508-1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
CAD96508-2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
CAD96514-2a	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HS4-1b	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabla A. Pruebas bioquímicas realizadas a actinomicetos halófilos. Continuación

Cepa	Gelatina	Caseína	Almidón	Tirosina	Tween 80	Fosfatasa	DNasa	Lecitínasa
JA6.001	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS2.002	+	-	+	+	+	+	+	+
LRS2.006	+	-	+	+	+	+	+	+
LRS4.013	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.030	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.058	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.062	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.074	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.080	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.085	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.091	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.096	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.097	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.099	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.100	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.102	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.106	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.120	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.123	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.125	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.126	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.127	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.130	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.132	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.135	+	+	+	-	+	+	+	+

LRS4.142	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.145	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.146	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.147	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.148	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.152	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.154	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.160	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.166	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.167	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.169	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.171	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.172	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.180	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.183	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.195	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.196	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.197	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.199	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.201	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.202	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.205	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.207	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.210	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.215	+	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.243	+	+	+	-	+	+	+	+
LRSE2.002	+	+	+	+	+	+	+	+
COSE - 1a	+	+	-	-	+	-	+	+

COSE - 1b	+	nc	-	-	+	-	+	+
COSE-1c	+	nc	-	-	+	-	+	+
Y3A1	+	-	+	+	+	+	+	+
CAD96S08-1	+	+	+	+	+	-	+	+
CAD96S08-2	+	nc	+	+	+	+	+	+
CAD96S14-2a	+	-	+	+	+	+	+	+
HS4-1b	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla B. Producción de ácidos a partir de carbohidratos.

Clave	Arabinosa	Fructosa	Galactosa	Glicerol	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Manitol	Sacarosa	Trehalosa
JA6.001	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS2.002	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
LRS2.006	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
LRS4.013	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.058	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
LRS4.062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.080	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.085	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
LRS4.091	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.096	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.099	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.102	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LRS4.106	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.120	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LRS4.123	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.125	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LRS4.126	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.127	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.130	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.135	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

LRS4.142	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
LRS4.145	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.147	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.148	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.154	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.160	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.167	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LRS4.169	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
LRS4.171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.196	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
LRS4.197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.201	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.205	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
LRS4.207	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.210	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
LRS4.215	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LRS4.243	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LRSE2.002	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
COSE - 1a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

COSE - 1b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
COSE-1c	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Y3A1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CAD96S08-1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
CAD96S08-2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CAD96S14-2a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
HS4-1b	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabla C. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía.

Cepa	Amigdalina	Celobiosa	Galactosa	Galactosamina	Gluconolactona	Glucosa	Glucosamina	Inulina	L
JA6.001	+	+	-	-	-	+	-	+	
LRS2.002	-	-	-	+	-	+	-	-	
LRS2.006	-	+	-	+	-	+	-	-	
LRS4.013	+	+	+	+	-	+	-	-	
LRS4.030	-	+	+	+	-	+	-	-	
LRS4.058	-	+	-	+	-	+	-	-	
LRS4.062	+	+	+	+	-	+	-	-	
LRS4.074	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.080	+	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.085	+	+	-	+	-	+	-	-	
LRS4.091	+	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.096	+	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.097	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.099	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.102	+	+	+	+	-	+	-	+	
LRS4.106	+	+	+	+	-	+	+	-	
LRS4.120	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.123	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.125	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.126	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.127	+	+	+	+	-	+	-	+	
LRS4.130	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.132	+	+	+	+	-	+	-	+	
LRS4.135	-	+	+	+	-	+	-	-	

LRS4.142	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.145	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.146	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.147	+	+	+	-	-	+	-	+
LRS4.148	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.152	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.154	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.160	+	+	+	-	-	+	-	+
LRS4.166	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.167	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.169	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.171	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.172	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.180	-	-	-	-	-	-	-	+
LRS4.183	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.195	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.196	+	+	+	-	-	+	-	-
LRS4.197	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.199	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.201	+	+	+	-	-	+	-	+
LRS4.202	-	+	+	-	-	+	-	-
LRS4.205	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.207	+	+	+	+	-	+	-	-
LRS4.210	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.215	+	+	+	+	-	+	-	+
LRS4.243	+	+	+	+	-	-	-	-
LRSE2.002	+	+	+	+	-	+	-	-
COSE - 1a	-	-	-	-	-	-	-	-

COSE - 1b	-	-	-	-	-	-	-	-
COSE-1c	-	-	-	-	-	-	-	-
Y3A1	-	-	+	+	-	+	-	-
CAD96S08-1	+	+	+	+	-	+	-	-
CAD96S08-2	+	+	-	-	-	+	-	+
CAD96S14-2a	-	-	-	-	-	-	-	-
HS4-1b	-	+	-	-	-	+	-	-

Tabla C. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía. Continuación.

Cepa	Maltosa	Manosa	Melibiosa	Rafinosa	Ribosa	Salicina	Trehalosa	Xilosa	Arabinosa	Sacar
JA6.001	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
LRS2.002	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
LRS2.006	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
LRS4.013	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.030	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.058	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LRS4.062	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
LRS4.074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.085	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LRS4.091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.097	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
LRS4.099	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.123	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LRS4.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.127	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
LRS4.130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.132	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
LRS4.135	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+

Tabla D. Utilización de alcoholes como única fuente de carbono y energía.

Cepa	Eritritol	Etanol	Manitol	Mesoinositol	Propanol	Sorbitol	Glicerol
JA6.001	+	+	+	+	+	+	+
LRS2.002	+	+	+	+	+	+	+
LRS2.006	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.013	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.030	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.058	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.062	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.074	-	-	-	+	-	-	-
LRS4.080	+	+	-	+	+	+	+
LRS4.085	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.091	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.096	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.097	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.099	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.100	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.102	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.106	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.120	-	+	+	+	+	+	+
LRS4.123	-	+	-	+	+	+	+
LRS4.125	-	+	+	+	+	+	+
LRS4.126	-	-	-	+	-	+	+
LRS4.127	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.130	-	-	-	+	+	+	+
LRS4.132	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.135	+	+	+	+	+	+	+

LRS4.142	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.145	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.146	-	+	+	+	+	+	+
LRS4.147	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.148	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.152	-	+	+	+	+	+	+
LRS4.154	-	+	+	+	+	+	+
LRS4.160	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.166	-	-	-	+	-	+	+
LRS4.167	-	+	+	+	-	+	+
LRS4.169	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.171	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.172	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.180	-	+	+	+	+	+	-
LRS4.183	-	+	+	+	+	+	-
LRS4.195	-	+	+	+	+	+	-
LRS4.196	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.197	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.198	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.199	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.201	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.202	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.205	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.207	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.210	+	-	-	-	-	-	+
LRS4.215	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.243	-	-	+	-	-	-	+
LRSE2.002	+	+	+	+	+	+	+

COSE - 1a	+	+	+	+	+	+	+
COSE - 1b	+	+	+	+	+	+	+
COSE-1c	+	+	+	+	+	+	+
Y3A1	+	+	+	+	+	+	+
CAD96S08-1	+	+	+	+	+	+	+
CAD96S08-2	+	+	+	+	+	+	+
CAD96S14-2a	-	-	+	+	-	+	-
HS4-1b	+	+	+	+	+	+	+

Tabla E. Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.

Cepa	Butírico	Benzoico	Caprílico	Cítrico	Glucónico	Glucurónico	Glutámico	Hipúrico	Láctico	Málico
JA6.001	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS2.002	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS2.006	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.013	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LRS4.030	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LRS4.058	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LRS4.062	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
LRS4.074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.085	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.091	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.099	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.102	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.106	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.127	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.132	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.135	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

LRS4.142	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.145	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.147	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.160	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.169	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
LRS4.171	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
LRS4.172	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.196	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.197	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.199	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.201	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.202	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.207	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.210	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.215	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRS4.243	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LRSE2.002	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
COSE - 1a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

COSE - 1b	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
COSE-1c	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Y3A1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CAD96508-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CAD96508-2	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
CAD96S14-2a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HS4-1b	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-

Tabla E. Utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía. Continuación

Cepa	Propiónico	Quínico	Sacárico	Succínico	Tartárico	Salicílico	Malónico	Benzóico	Fumárico	Acético	Vo
JA6.001	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
LRS2.002	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS2.006	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	
LRS4.013	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.030	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.058	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	
LRS4.062	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.080	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.085	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.091	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.096	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.099	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.102	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.106	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.120	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.123	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.125	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.127	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.132	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	

LRS4.135	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.142	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.145	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.146	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.147	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.154	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
LRS4.160	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.166	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.167	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.169	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.171	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.172	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.180	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
LRS4.183	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
LRS4.195	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
LRS4.196	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.197	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
LRS4.199	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.201	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.202	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.207	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LRS4.215	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
LRS4.243	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
LRSE2.002	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	

COSE - 1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COSE - 1b	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
COSE-1c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Y3A1	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CAD96S08-1	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
CAD96S08-2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CAD96S14-2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HS4-1b	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Tabla F. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Cepa	Arginina	Glicina	Glutamina	Isoleucina	Lisina	Ornitina	Prolina	Serina	Treonina	Valina	Betaina	Creatina
JA6.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS2.002	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS2.006	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.013	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.030	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.058	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
LRS4.062	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
LRS4.074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.080	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.085	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LRS4.091	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.097	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.099	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.102	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS4.106	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS4.120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.123	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LRS4.125	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LRS4.126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.127	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS4.130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.132	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-

LRS4.135	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
LRS4.142	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS4.145	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS4.146	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.147	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.148	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
LRS4.152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.160	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LRS4.166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.169	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
LRS4.171	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
LRS4.172	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LRS4.180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.196	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
LRS4.197	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LRS4.199	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
LRS4.201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.202	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
LRS4.205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.207	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LRS4.210	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.215	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
LRS4.243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRSE2.002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

COSE - 1a	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
COSE - 1b	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
COSE-1c	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Y3A1	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
CAD96S08-1	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
CAD96S08-2	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
CAD96S14-2a	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
HS4-1b	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-

Tabla G. Pruebas enzimáticas realizadas a actinomicetos halófilos.

Cepas	Fos. Alc	Estear	Est lip	Li+asa	L. aril.	V. aril.	C. aril.	Tripsina	a-quim.	F. ácido
JA6.001	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LRS2.002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS2.006	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.013	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
LRS4.030	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LRS4.058	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LRS4.062	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.074	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.080	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LRS4.085	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
LRS4.091	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LRS4.096	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.097	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.099	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.120	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.123	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.125	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
LRS4.126	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LRS4.130	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LRS4.132	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LRS4.135	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.142	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
LRS4.145	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.146	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LRS4.147	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.148	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 SISTEMA NACIONAL DE EXPERIMENTACIÓN Y INVESTIGACIÓN AGROPECUARIAS
 ARCHIVO HISTÓRICO

LRS4.154	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.160	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.166	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LRS4.167	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.169	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.171	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.172	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.183	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.196	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.197	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.205	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LRS4.207	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.210	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LRS4.215	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
LRS4.243	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LRSE2.002	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
COSE - 1b	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
CAD96S08-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
CAD96S14-2a	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HS4-1b	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

LRS4.154	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.160	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.166	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.167	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.169	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.171	-	-	-	+	-	-	-	-
LRS4.172	-	+	-	+	+	+	-	-
LRS4.183	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.196	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.197	-	+	-	+	+	+	-	-
LRS4.205	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.207	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.210	-	-	-	-	-	+	-	-
LRS4.215	-	-	-	-	-	-	-	-
LRS4.243	-	-	-	-	-	+	-	-
LRSE2.002	-	-	-	-	-	-	-	-
COSE - 1b	-	-	-	-	-	-	-	-
CAD96S08-2	-	-	-	-	-	-	-	-
CAD96S14-2a	-	-	-	-	-	-	-	-
HS4-1b	-	-	-	-	-	-	-	-

Clave:

Fos. Alc	Fosfatasa lcalina
Estear	Esterasa (C 1)
Est lip	Esterasa ipasa (C8)
Lipasa	Lipasa (C 14)
L. aril.	Leucina arilamidasa
V. aril.	Valina rilamidasa
C. aril.	Cistina rilamidasa
Tripsina	Tripsina
a-quim.	α -Quimiotripsina
F. ácida	Fosfatasa ácida
Naftol	Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa
a-galac	α -galactosidasa
b-galac.	β -galactosidasa
b-gluc.	β -glucuronidasa
a-gluco.	α -glucosidasa
b-gluco.	β -glucosidasa
N-ac b-gl	N-acetil-b-ucosaminidasa
a-manos.	α -manosidasa
a-fuco.	α -fucosidasa

PRODUCTOS DE TRABAJO PUBLICACIONES

Artículos publicados:

MÉTODO SIMPLIFICADO PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE ACTINOMICETOS HALÓFILOS.

Serrano JA, Sandoval HA, **Ramírez N**, Ventosa A.

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 3: 42 -46 2003.

LAS BACTERIAS HALÓFILAS Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

Ramírez N, Sandoval, AH, Serrano, JA

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología

Aceptado para publicación en el Volumen 24, Número 2 (Julio-Diciembre 2004)

Artículos enviados:

MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS.

ACTINOMICETOS HALÓFILOS EN MÉXICO.

Ramírez, N; Serrano, JA; Sandoval, AH.

Artículo enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas

Enviado: Mayo de 2005

AMPLIFICATION OF THE SPECIFIC INSERTION IN THE 23S GENE, AS A CRITERION OF PURITY IN PREPARATIONS OF ACTINOMYCETES DNA

Ramírez, N.; Ramírez, HC.; Melgoza, LM.; Sandoval H.

Artículo enviado a Journal de Mycologie Médicale

Enviado: Agosto de 2004

Resúmenes presentados en congresos

ISOLATION OF TRULY HALOPHILIC ACTINOMICETES
12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes.
Vancouver, Canada. Agosto de 2001.

ISOLATION OF ACTINOMICETES FROM HIPERSALINE ENVIRONMENTS IN THE SOUTH OF MEXICO.
Halophiles 2001. International Conference on Halophilic Microorganisms
Sevilla, España. Septiembre de 2001.

AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS DE IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA A PARTIR DE HÁBITATS HIPERSALINOS.
XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.
Manzanillo, Col. Octubre de 2001.

UNUSUAL CRYSTAL FORMATION FOUND IN HALOPHILIC ACTINOMYCETES
Internacional Union of Microbiological Societies (IUMS), Congress 2002.
Paris, France. Agosto de 2002.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HALOPHILE ACTINOMYCETES FROM MEXICO
10 Th International Symposium on Microbial Ecology
ISME-10 Microbial Planet: Sub-Surface To Space.
Cancun Méx. Agosto de 2004.

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TEST FOR TAXONOMIC CHARACTERIZATION OF HALOPHILIC ACTINOMICETES
International Congress on Halophiles Microorganisms
Ljubliana Slovevia. Septiembre de 2004

PHILOGENY OF HALOPHILE ACTINOMYCETES FROM MEXICO, BASED ON 16S rDNA SEQUENCE ANALYSIS
International Congress on Halophiles Microorganisms
Ljubliana Slovevia. Septiembre de 2004

ISOLATION OF HALOPHILIC FILAMENTOUS FUNGI FROM SALTERN PONDS IN MEXICO
International Congress on Halophiles Microorganisms
Ljubliana Slovevia. Septiembre de 2004

BACTERIAS HALOFILAS, FUENTE DE RECURSOS CON UN ELEVADO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E INDUSTRIAL
XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas
Acapulco Gro. Octubre de 2004

Método simplificado para el estudio morfológico por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de actinomicetos halófilos.

A simplified method for the morphological study of halophilic actinomycetes by combining light microscopy with scanning electron microscopy.

Serrano JA¹, Sandoval AH², Ramírez N^{2,3}, Ventosa A³.

1. Grupo de Investigaciones de Actinomicetos Patógenos Humanos y del Suelo. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. E-mail: jacielo@cantv.net.
2. Departamentos de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México DF. E-mail: hsandov@cueyatl.uam.mx.
3. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España. E-mail: ventosa@us.es.

Palabras-clave: Actinomicetos halógenos, microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica.

RESUMEN

Se propone una técnica simplificada para el estudio, tanto por microscopía óptica como electrónica de barrido, de actinomicetos halófilos, aislados de ambientes hipersalinos del sur de México y de España. Los actinomicetos fueron cultivados en medio sólido para el cultivo de microorganismos halófilos MH y mantenidos a 37°C durante una semana. Previamente a su incubación, fueron colocados fragmentos de cobre objetos estériles, que se introducían en un ángulo de 45° en el agar del medio. Luego eran retirados y eran prelavados con una solución de sales conteniendo 10% de NaCl y 2% de MgSO₄ y, en seguida, fijados en una solución con glutaraldehído al 2.5%, luego lavados y deshidratados en una serie de etanol (70 al 100%). A continuación las muestras eran, o bien coloreadas por técnicas de Gram o de Kinyoun para alcohol-ácido resistencia, o procesadas para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 6300. Con esta técnica simplificada se pudo observar detalles morfológicos tincionales de estos microorganismos, así como su bien preservada

morfología celular externa al microscopio de barrido, observándose las formas filamentosas con la presencia de sus adornos celulares externos, tales como esporas, y la presencia de unas estructuras cristalinas de diversas formas, arreglos y tamaños.

ABSTRACT

It is a simplified technique that proposes the morphological studies of Halophilic Actinomycetes isolated from hypersaline environments in Southern Mexico and Spain, by combining light microscopy with scanning electron microscopy. For cultivating the halophilic microorganisms, the Actinomycetes were inoculated onto a solid medium (MH), and incubated at 37°C for one week. Prior to incubation, fragments of sterile coverslips were introduced at a 45° angle in the agar medium. Later, these coverslip fragments were retrieved and washed in a salt solution containing 10% NaCl and 2% MgSO₄. Afterwards they were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution and then washed and dehydrated through an ethanol series (70 to 100%). These samples were stained by either Gram

or Kinyoun methodology. Alternatively, some of the coverslip fragments were processed for observation using a Jeol-JSM 6300 scanning electron microscope. Through these simplified techniques, the tincorial and morphological details were preserved. The cellular morphology was observed by scanning electron microscopy. By these methods, some details of the filamentous organisms were observed including external cellular components such as spores and unusual crystalline structures exhibiting different forms, arrangements and sizes.

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son bacterias que se caracterizan por la variabilidad de su forma (5-6, 13). La morfología representa el último resultado de la adaptación a un ambiente específico, y por lo tanto representa un parámetro verdadero para evaluar el proceso de desarrollo celular en diferentes hábitats (5-6). Es interesante resaltar que tanto en las células eucariotas como en las procariontas existe una muy cercana relación entre la forma y la bioquímica celular (8-9).

Los actinomicetos conforman un grupo de bacterias filamentosas. Gram-positivas, que producen filamentos ramificados. Algunas especies producen filamentos septados, los cuales, a lo largo de su ciclo de crecimiento, fragmentan, produciendo células bacilares y cocoidales; otras especies producen filamentos no septados. A estos filamentos se les denomina micelio, por analogía al micelio que forman los hongos, pero en realidad tienen dimensiones de células bacterianas y composición química de su pared celular propia de organismos procariontes (3-4,13). Los actinomicetos son microorganismos de distribución cosmopolita, aunque prevalecen en áreas tropicales y subtropicales. Algunos de ellos son patógenos para el ser humano y los animales, produciendo lesiones en diversos órganos, tales como el pulmón, el sistema nervioso central y riñones, entre otros, así como lesiones a nivel de la piel y el tejido subcutáneo (13). Algunas de las

especies de actinomicetos tienen gran importancia biotecnológica, por su capacidad para producir diversos tipos de metabolitos útiles en la industria farmacéutica, tales como esteroides y antibióticos (13).

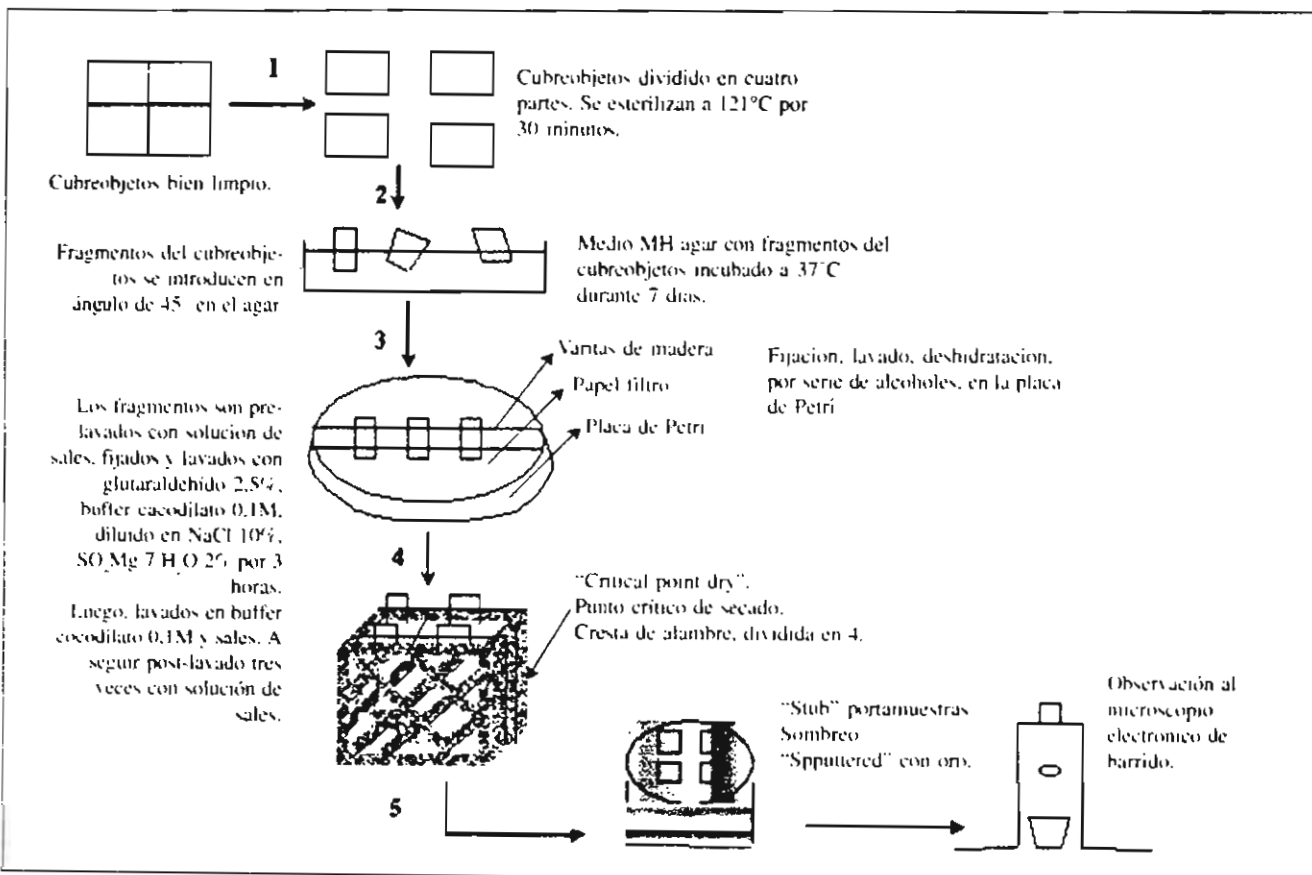
Aunque estos microorganismos han sido encontrados en diferentes tipos de hábitat, es sólo recientemente que han sido aislados de ambientes hipersalinos. (1-3, 11,16-17). Estos microorganismos, que son capaces de vivir en ambientes con ciertas concentraciones de sal, pueden ser agrupados dentro de los grupos de microorganismos halo tolerantes o halófilos (14), los cuales poseen características morfológicas y bioquímico-metabólicas muy particulares, que les permiten vivir en estos medios. Los microorganismos halófilos son microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos, los cuales tienen diversas aplicaciones industriales (14). El presente trabajo se refiere a una técnica sim-

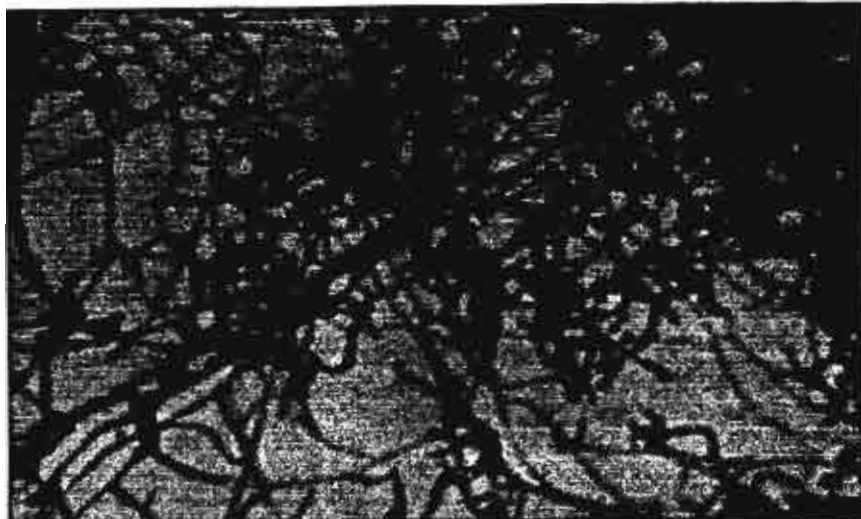
plificada para el estudio morfológico de los actinomicetos halófilos, tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica de barrido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio morfológico fueron utilizadas cepas de actinomicetos halófilos, aisladas de ambientes hipersalinos localizados en el Sur de México (10) y en España. Las muestras fueron examinadas tanto por microscopía óptica, como de barrido. Las mismas fueron cultivadas en medio (agar) para bacterias halófilas (MH) (15), e incubadas a 37°C, durante siete días. Para su observación morfológica se siguió la siguiente técnica preparativa (ver diagrama 1). Cubreobjetos bien limpios fueron cortados, usando para esto a un lápiz de diamante, en cuatro secciones; éstas fueron esterilizadas y, luego de ser esterilizadas, fueron colocadas en un ángulo de cuarenta y cinco grados, en el medio de agar MH y a continuación

Diagrama 1. Metodología utilizada para la preparación de muestras de actinomicetos halófilos para su observación al microscopio electrónico de barrido.





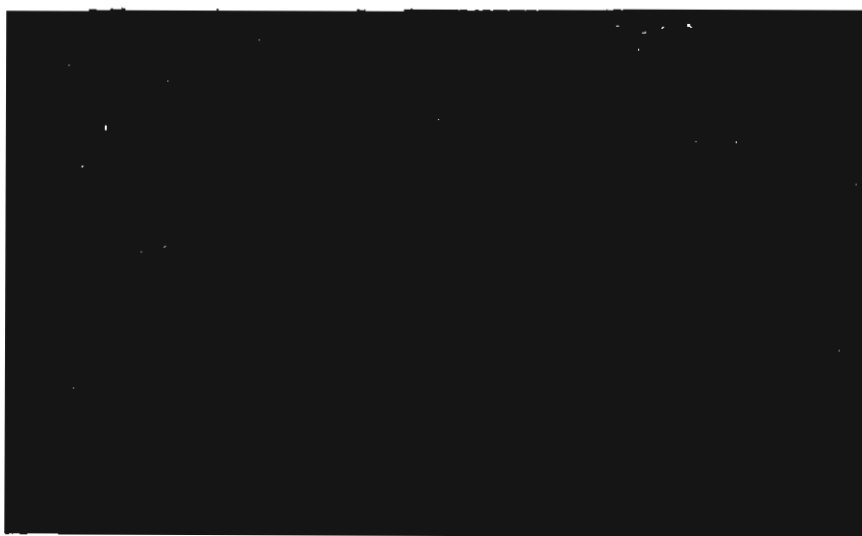
Figuras 1 y 2: Coloración de Gram de cepa N° LRS4.74, de actinomiceto halófilo moderado, aislada en la Laguna El Rosario, Estado de Oaxaca, México.

una pipeta Pasteur, con una solución de tampón cacodilato al 0.1 M, conteniendo la misma, 10% de NaCl y 2% de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A continuación, las muestras eran cubiertas con una solución de 2.5% de glutaraldehído, diluido en la misma solución usada para el lavado. Posteriormente, las muestras eran fijadas durante tres horas y luego lavadas con la solución de sales. De seguido, las muestras eran deshidratadas en series de etanol, del 70 al 100%, por 10 minutos en cada paso. Para la observación al microscopio óptico, las muestras fueron coloreadas por el método de Gram y el de Kinyoun para alcohol-ácido-resistencia. Para la observación al microscopio electrónico de barrido, las muestras fueron procesadas en un equipo de desecado (critical point dry), marca SAMDRI-780[®] de Tousimis Research Corp. Rockville MD (EE UU). Luego de su desecación, las muestras fueron colocadas en un portamuestras metálico especial para uso en el microscopio de barrido (stub). Se colocaron cuatro muestras, las cuales eran adheridas al portamuestras usando pintura de plata. Luego, las muestras fueron sombreadas con oro, en un "sputter" Denton Vacuum DESK II (Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV, México). Las muestras recubiertas con oro, fueron examinadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM-6300, a una aceleración de

fueron incubados. En cada placa fueron introducidos unos seis pedazos de cubreobjetos estériles, esto con el objetivo de tomar muestras del crecimiento celular bacteriano a diferentes tiempos. En cada toma de muestras se retiraban dos secciones de cubreobjetos, las cuales eran enseguida procesadas para su preparación para el estudio morfológico.

Luego de retirado del agar, la sección de cubreobjetos, con el crecimiento de la muestra, era colocada sobre un soporte hecho con dos pedazos de aplicadores de madera, colocados los mismos dentro de una caja de Petri. La superficie del fondo de la placa era recubierta con un papel filtro y luego se procedía a lavar las muestras usando

Figura 3: Coloración de Gram de cepas LRS4.102 de actinomiceto halófilo débil, aislada en la Laguna El Rosario, Estado de Oaxaca, México.



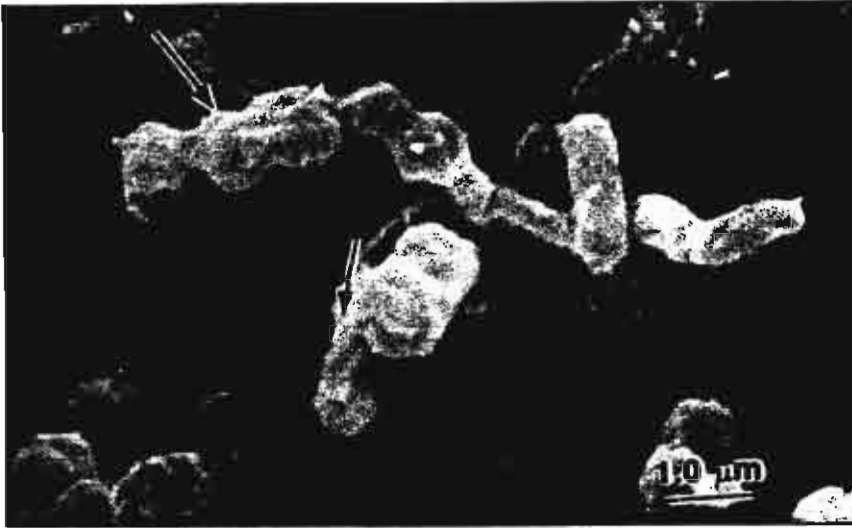


Figura 4: Cepa LRS4.74, vista al microscopio electrónico de barrido. Nótese las formaciones espiraladas (flechas) que adornan la superficie externa de las células filamentosas. 10.000 x.

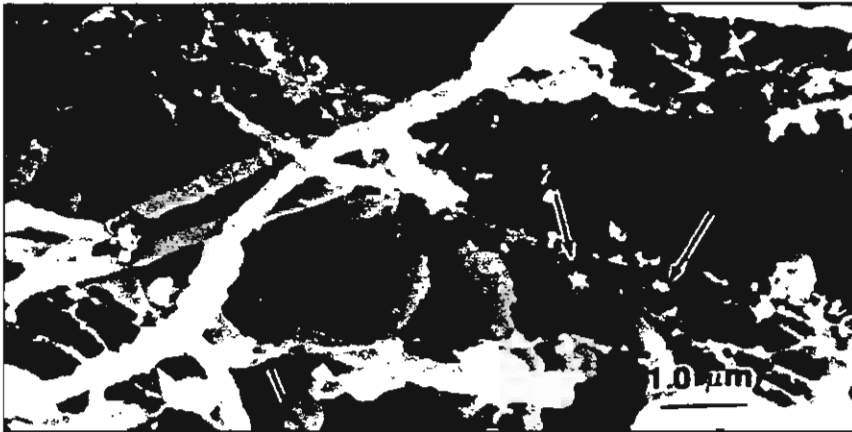


Figura 5: Cepa LRS4.74, vista al microscopio electrónico de barrido. Nótese las formaciones filamentosas finas, como cordones adornados con pequeñas formaciones cristalinas (flechas). 5.000 x.

van las cepas de actinomicetos halofílicos preparadas para su observación en el microscopio electrónico de barrido. Se puede notar que el micelio celular está bien conservado, mostrando sus estructuras con una turgencia adecuada, lo que permite una buena observación de la morfología de estos microorganismos. La formación de las estructuras cristalinas, presente en la superficie de la célula, se puede observar con una buena definición morfológica, mostrando los diversos tipos de estructuras cristalinas presentes en la superficie externa micelial.

DISCUSIÓN

Las técnicas preparativas utilizadas para el estudio de organismos halofílicos extremófilos o halotolerantes generalmente requieren de un adecuado uso de soluciones debidamente balanceadas en su tonicidad, de manera de evitar los procesos de choque osmótico, los cuales introducen cambios muy drásticos en la preservación de la morfología de las células en estudio (3,16-17). La técnica preparativa, descrita en el presente trabajo, usada para el estudio morfológico, tanto al microscopio óptico como electrónico de barrido, permite que las mismas sean conservadas tanto para las observaciones al microscopio óptico como en el de barrido, a diferencia de otros autores, que utilizan bloques de agar para realizar sus preparaciones (16-17), las cuales no se pueden

voltaje de 10Kv, a aumentos de 5.000x a 25.000x del Departamento de Física del CINVESTAV, México.

RESULTADOS

En las (figuras 1, 2 y 3) se pueden observar las cepas de actinomicetales halofílicos coloreadas por el método de Gram; éstas se observan como preparaciones muy limpias, sin precipitados, bien coloreadas y conservando sus estructuras, lo que permite una muy buena definición morfológica, tanto del micelio aéreo como de substrato; así mismo se pueden observar sus estructuras (adornos miceliales), tales como las esporas.

En las (figuras 4, 5, 6 y 7) se obser-

Figura 6: Cepa LRS4.102, vista al microscopio electrónico de barrido. Nótese las formaciones filamentosas de las células, las cuales presentan formas cristalinas en su porción celular más externa (flechas). 5.000 x.



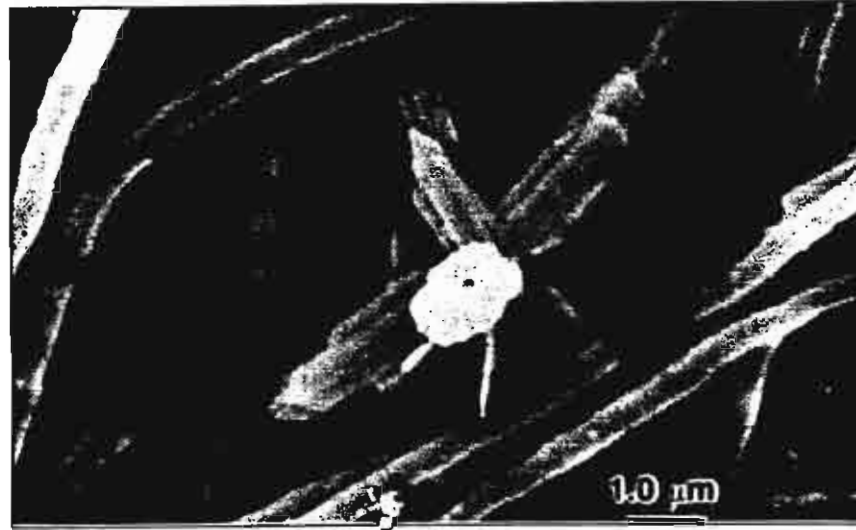


Figura 7: Cepa LRS4.102, vista al microscopio electrónico de barrido. Detalle a mayor aumento de una de las formas cristalinas que adornan las células filamentosas del actinomiceto halófilo. 10.000 x.

conservar para estudios o examen posterior.

Con el uso de esta técnica simplificada se pudo observar la morfología de los actinomicetos halófilos estudiados. Se pudo estudiar las estructuras del micelio, tanto aéreo como de substrato, así como las características de las estructuras presentes en la superficie externa de la célula y adornos del micelio, tales como esporas únicas o múltiples, así como las estructuras cristalinas presentes en la superficie externa del micelio aéreo de estos actinomicetos. Estas raras formaciones cristalinas, encontradas en estos actinomicetos halófilos, fueron previamente reportadas por Sandoval y col. (12), las cuales, como se puede observar en las figuras 4-7, se encuentran unidas a la capa externa de la pared celular de estos microorganismos. Llama la atención que estas formaciones cristalinas no son solubles en las soluciones tampón utilizadas en los procedimientos preparativos de las muestras para microscopía electrónica de barrido. Estos autores reportan que los cristales observados son ricos en sodio y en carbón orgánico, pero que no en cloruros. Según Sandoval y col. (12), estas formaciones cristalinas, con estas características químicas, podrían significar la forma con la que estos actinomicetos regulan el uso del cloruro de sodio, protegién-

do así a las estructuras celulares de posibles efectos dañinos de esta sal.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Kouri, del Departamento de Patología del CINVESTAV, México, así como al personal profesional, auxiliar y técnico de dicho departamento, por su apoyo logístico para la realización del presente trabajo. A la Auxiliar, Sra. Alicia Ramírez R., por su apoyo en los procesos técnicos y preparativos. A la Biól. María de Lourdes Rojas M., por su apoyo en la preparación de las muestras para el microscopio electrónico de barrido. A la Ing. Ana Berta Soto, del Departamento de Física del CINVESTAV, México, por su apoyo en las observaciones al microscopio electrónico de barrido. A Aída (la pequeña), por su apoyo en la preparación de los medios de cultivo y técnicas microbiológicas. A Yosberlin Vergara, por su trabajo dactilográfico.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Al-Tai AM, Ruan J. *Nocardioopsis halophila* sp. Nov. a New Halophilic Actinomycete Isolated From Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994; 44: 474-478.
2. Cui X-L, Mao P-H, Zeng M, Li-W JM, Zhang L-P, Xu L-H, and Jiang C-L. *Streptomonospora salina* gen. nov., sp. nov. a new member of the family *Nocardiopsaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51: 357-363.

3. Gochmauer MB, Leppard GG, Komaratat P, Kates M, Novitsky T, Kushner DJ. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et. sp. Nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol* 1975; 21: 1500-1511.
4. Goodfellow M, Isik K, and Yates E. Actinomycete Systematics: An Unfinished Synthesis. *Nova Acta Leopoldina* 1999; NF 80, Nr. 312: 47-82.
5. Goodfellow M. Actinomycetes: *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Streptomyces* and related genera. In: Colle JG, Fraser AG, Marmion BP & Simoons A (Eds) *Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology*, Churchill Livingstone, Edinburgh UK 1990; pp 343-359.
6. Locci R. Developmental micromorphology of actinomycetes. In Arai T. (Ed.): *Actinomycetes: The Boundary Microorganisms*, Tokyo: Toppan Co. Ltd 1976; pp 249-297.
7. Locci R. Micromorphological development of *Actinomyces* and related genera. *Zentralbl. Bakt. I. Abt. Suppl* 1978; 6: 173-180.
8. Morgan P, and Dow CS. *Bacteria in Their Natural Environments* (Fletcher M, and Floodgate GD, ed.) Academic Press, London 1985; pp. 131-169.
9. Moss MO. *The Ecology and Physiology of Fungal Mycelium* (Jennings DH, and Rayner ADM, ed.). Cambridge Univ. Press, Cambridge 1984; pp. 127-142.
10. Ramírez N, Castro K, González A, Márquez MC, Sandoval H, and Ventosa A. Isolation of Actinomycetes from Hypersaline in the South of Mexico. In International Conference on Halophilic Microorganisms Sevilla España 2001; Abstract N° P11.
11. Ruan JI-Sheng, Al-Tai AM, Zhou Z-H, Qu Liang-Hu. *Actinopolyspora iraqiensis* sp. nov. a New Halophilic Actinomycete Isolated from Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994; 44: 759-763.
12. Sandoval H, Serrano JA, Ramírez N, Ventosa A. Unusual Crystal Formation Found in Halophilic Actinomycetes. *Proceed. IUMS Congress (Paris), the World of Microbes*, 2002, pp.195
13. Serrano JA, Sandoval AH. (Eds) *Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos*. Talleres Gráficos ULA Mérida, Venezuela 1992; pp. 27-256.
14. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. *Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62: 504-544.
15. Ventosa A. Numerical Taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen. Microbiol* 1982; 4:564-570
16. Yassin AF, Galinski EA, Wohlfarth A, Jahnke KD, Schaal KP, Truper HG. A New Actinomycete Species, *Nocardioopsis lucentensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1993; 43: 266-271.
17. Yoshida M, Matsubara K, Kudo T, Horikoshi K. *Actinopolyspora mortvallis* sp. nov., a Moderately Halophilic Actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1991; 41: 15-20.

Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas.

The halophilic bacteria and their biotechnological applications.

Ramírez N*, Sandoval AH*, Serrano JA**

* Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, México DF.

** Grupo de Investigaciones de Actinomicetos Patógenos Humanos y del Suelo. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Palabras-clave: Bacterias, halófilos, actinomicetos, biotecnología.

RESUMEN

Los autores presentan una extensa revisión sobre las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. Revisan aspectos relacionados con su ecología en los ambientes hipersalinos y sus características como microorganismos extremófilos y sus diversas e importantes aplicaciones y potencialidades en la industria y en la biotecnología. Estas bacterias son fáciles de cultivar, y presentan escasos requerimientos nutricionales; su tolerancia a elevadas concentraciones salinas reduce al mínimo los riesgos de contaminaciones en el laboratorio, lo que permitiría su explotación como fábricas celulares alternativas a *Escherichia coli* para la producción de proteínas recombinantes. Son útiles en la producción de enzimas, polímeros, solutos compatibles y en la biodegradación de residuos, así como en la producción de alimentos fermentados. La revisión abarca aspectos relativos a la microbiología de los actinomicetos halófilos, refiriéndose a estudios realizados por los autores en cepas de actinomicetos halófilos aislados en medios hipersalinos de México y España.

ABSTRACT

The authors present an extensive review on the halophilic bacteria and their biotechnological applications,

along with some aspects related to their ecological behavior in hypersaline environments. They also examined their characteristics as extremophilic microorganisms, including their various important applications and potential use in the industry and in biotechnology.

Due to their low nutritional requirements and tolerance to high saline concentrations these bacteria are easy to be cultivated and the risks of contamination in the laboratory are minimal. These facts allow them to be used as alternative cellular factories instead of *Escherichia coli* in the production of recombinant proteins. They are also useful in the production of enzymes, polymers, and compatible solutes, in the biodegradation process of residues, as well as, in the production of fermented food. Finally, this work includes aspects related to the microbiology of halophilic actinomycetes discussed in previous studies carried out by the authors in strains of halophilic actinomycetes isolated in hypersaline mediums in Mexico and Spain.

INTRODUCCIÓN

La evolución ha forjado todas las formas de vida en la tierra; la diversidad estructural y funcional que apreciamos en las células representa un conjunto de éxitos evolutivos que, a través del proceso de selección natural, con-

fieren un valor de supervivencia (adaptabilidad) a los microorganismos de hoy. La diversidad microbiana puede ser apreciada en términos de variaciones en el tamaño celular y la morfología, estrategias metabólicas, movilidad, división celular, biología del desarrollo, adaptación a ambientes extremos y muchos otros aspectos estructurales y funciones de la célula (42).

Durante las últimas décadas se ha demostrado que las comunidades microbianas pueden encontrarse en muchas condiciones adversas, como temperatura, pH y salinidad, entre otras. Los microorganismos que habitan en estos ambientes extremos son llamados extremófilos, y poseen características bioquímicas y metabólicas que les permiten vivir en hábitats poco comunes, resultando ser microorganismos muy útiles para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos (44, 82).

Las bacterias halófilas, al pertenecer al grupo de microorganismos extremófilos capaces de vivir en ambientes salinos, ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la biotecnología.

Los microorganismos no halófilos capaces de crecer tanto en ausencia como en presencia de sal son llamados halotolerantes; los halotolerantes que son capaces de crecer aproximadamente al 15% (w/v) de NaCl (2,5 M) son

considerados halotolerantes extremos. Los microorganismos que requieren sal para su crecimiento son llamados halófilos. De acuerdo a la definición de Kushner (30), es posible distinguir entre halófilos débiles, como lo son la mayoría de los organismos marinos, considerando que el agua de mar contiene cerca del 3% (w/v) de NaCl; halófilos moderados, cuyo crecimiento óptimo se encuentra en un rango del 3 al 15% (w/v) de sal; y halófilos extremos, que presentan un crecimiento óptimo al 25% (w/v) de NaCl (44).

ECOLOGÍA

Los ambientes hipersalinos están bastante extendidos por todo el mundo; sin embargo, los ambientes extremadamente salinos son raros. La mayoría de éstos se encuentran en zonas calientes y secas. La composición iónica de los lagos salinos varía considerablemente. El predominio de unos u otros iones depende de la topografía, geología y condiciones climáticas generales que rodean el lago. El Gran Lago Salado, en el Estado de Utah, EE.UU., por ejemplo: este lago está

fundamentalmente constituido por agua de mar concentrada, debido a que la proporción relativa de cada ión es la del agua de mar, sólo que mucho más alta. El catión principal es el sodio, mientras que el anión primario es el cloro; existen cantidades significantes de sulfato y un ligero pH alcalino. Por el contrario, en el Mar Muerto, en Israel, es relativamente baja la concentración del catión sodio, pero alta la del magnesio. La química del agua de los lagos carbonatados se asemeja a la del Gran Lago Salado; pero, debido a los carbonatos que se incorporan al agua de las rocas circundantes, el pH es bastante más alcalino, presentando valores de entre 10 y 12; además, el magnesio y el calcio están prácticamente ausentes, debido a que los mismos precipitan a altos valores de pH. A pesar de que parece que son ecosistemas duros para la vida, los lagos salados representan ecosistemas muy bio-productivos.

Las salinas marinas son también buenos hábitats para los procariotas, halófilos extremos. Como se sabe, las salinas son aguas de mar estancadas,

que se evaporan lentamente por la acción del sol. A medida que la salina se aproxima a la concentración de sales que permitan el crecimiento de los halófilos extremos, las aguas se vuelven de color rojizo, debido al apareamiento masivo de arqueas halófilas que crecen en este hábitat (la coloración rojiza proviene de los carotenoides y otros pigmentos).

También suelen encontrarse en las salinas procariotas poco comunes, como las bacterias cuadradas. También se han aislado halófilos extremos en alimentos con alta concentración de sal, como salmueras, salsa de soja y pescado (42).

La ecología y diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada; muchos de estos microorganismos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad, ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta (85).

En la tabla 1 se mencionan algunos de los puntos geográficos característicos de los diferentes ambientes salinos, el rango de salinidad que presentan así como el pH característico en cada caso.

Tabla 1. Ecología de los microorganismos halófilos, diferentes hábitats salinos.

Lados salinos	Suelos salados	Hábitats salinos y fríos	Hábitats salinos y alcalinos	Alimentos salados	Hábitats poco comunes
Salinas de España y Salar de Atacama, Chile (15 a 30%)	Mar Rojo (25-30%) Alicante, España (2,4-12,7%)	Antártica, 300 lagos hipersalinos (28%) Vestfold Hills, lago salino frío. (0-5°C) (0,5-20%)	Lago Megadi, Kenia y lago Wadi Natrum, Egipto (pH=9) (10%) Lago Venere, isla Pantelleria, Italia (pH= 9,7) (9-17%)	Pescado seco y salsa de soja (6,5-10%) Bacalao (19%)	Plantas del desierto: <i>Atriplex halinus</i> , desierto del Neguev, Israel (0,5-20%) Animales del desierto: fosas nasales de iguanas (12% a 45°C)
Lago Assal, Djibuti, Somalia (27,7%)					
Lago Salado, Utah, EE. UU. (22%)		Valles Dry, suelo salino (12% a -40°C)			
Mar Muerto, Israel (28%)					

APLICACIONES

Desde que se inició su estudio, las bacterias halófilas moderadas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico. Así, no sólo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. Por ejemplo, son microorganismos fáciles de cultivar y con escasos requerimientos nutricionales, pudiendo utilizar una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía (84). Además, su tolerancia a elevadas concentraciones salinas (83) reduce al mínimo los riesgos de contaminaciones en el laboratorio, lo que permitiría su explotación como fábricas celulares alternativas a *Escherichia coli* para la producción de proteínas recombinantes. A continuación se describen algunas de las más interesantes aplicaciones de estos microorganismos.

ENZIMAS

Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad. La mayoría de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento provienen de bacterias halófilas moderadas. Así, se han descrito varias hidrolasas de interés industrial de tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y 5'-nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas. La nucleasa H, producida por *Micrococcus varians*, subsp. *halobius*, por ejemplo, es especialmente interesante para la producción de los agentes aromatizantes ácido 5'-inosínico y ácido 5'-guanílico (27).

En los últimos años se ha llevado a cabo un amplio estudio de las posibles hidrolasas extracelulares de bacterias halófilas moderadas. Cabe destacar el aislamiento y caracterización de una amilasa de *Halomonas meridiana* (11). Así mismo, gracias a

la obtención y posterior complementación de mutantes defectivas en la α amilasa, se ha conseguido clonar y secuenciar el gen responsable de la síntesis de dicha amilasa (12). Recientemente se han aislado, de salinas del sur de España, un total de 122 cepas de bacterias halófilas moderadas, capaces de producir diferentes hidrolasas: amilasas, lipasas, proteasas, nucleasas y pululaninas (74).

POLÍMEROS

Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolera. Gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo, incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así su tensión superficial. Las bolsas de petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros (83). En 1986, Pfiffner y col. aislaron más de 200 cepas de bacterias halófilas moderadas, capaces de crecer en las bolsas subterráneas de crudo y producir biopolímeros surfactantes resistentes a las condiciones ambientales de hipersalinidad.

H. eurihalina produce un exopolisacárido cuando se cultiva a 32°C de temperatura y una concentración del 7,5% de sales totales. Las soluciones de este polisacárido tienen un comportamiento pseudoplástico, son bastante termoestables y presentan una elevada viscosidad a pH ácido (62). Diversos estudios llevados a cabo con dicho biopolímero han puesto de manifiesto su potencial en procesos de biorremediación o en la industria petrolera (45). Así mismo, *H. eurihalina* sintetiza también otros polímeros de gran interés en Farmacología (58).

SOLUTOS COMPATIBLES

Las bacterias halófilas moderadas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se de-

nominan solutos compatibles (7), que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial, ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturación por calor y la alta salinidad (40). También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática (biosensores, PCR, etc.) y en la industria farmacéutica y cosmética (44).

Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como la lactato deshidrogenasa y la fructoquinasa. Así, en diversos estudios en los que se comparó el efecto protector sobre estas enzimas de distintos solutos compatibles (glicina-betaína, trealosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares), se puso de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores del calor y los procesos de congelación y descongelación. Hasta la fecha, estos compuestos sólo pueden obtenerse biológicamente, lo que ha aumentado considerablemente el interés a nivel industrial de las bacterias halófilas moderadas productoras de estos solutos compatibles. Así, en 1995, Frings y col (18) descubrieron un método de obtención de ectoína e hidroxiectoína a partir de una cepa halófila moderada de *Marinococcus*. Posteriormente se ha desarrollado un proceso industrial mejorado de obtención de ectoína a partir de una cepa de *H. elongata*. Dicho proceso, conocido como "bacterial milking" ("ordeñado"), consiste en someter a la bacteria a cambios bruscos en la salinidad del medio de cultivo.

Con un primer choque hiperosmótico se induce la acumulación citoplasmática de los solutos compatibles y, a continuación, se elimina la sal del medio, de manera que la bacteria expulsa el contenido citoplasmático, con los solutos compatibles, para compensar el choque hiposmótico (76).

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS

Las bacterias halófilas moderadas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos. Constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas (56). Esto sucede, por ejemplo, en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas.

Así Oren y col. (55) demostraron la degradación de varios compuestos aromáticos nitro-sustituídos a concentraciones salinas del 13 al 14% por las bacterias *Halanaerobium praevalens* y *Orenia marismortui*. A partir de distintos ambientes hipersalinos se han aislado microorganismos capaces de degradar compuestos hidrocarbonados, incluso hexadecanos y fenantrenos (47). En 1992, Woolard e Irvine (89) describieron la utilización de una biopelícula de bacterias halófilas moderadas, aisladas del Gran Lago Salado, Utah, EE.UU., para el tratamiento de aguas residuales hipersalinas contaminadas con fenol. Asimismo, Maltseva y col. (43) han aislado varias cepas pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*, capaces de utilizar como fuente de carbono y energía compuestos cloroaromáticos, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, potente herbicida que contamina muchos hábitats.

En 1991, DeFrank y Cheng (15) purificaron y caracterizaron una anhidrasa del ácido organofosfórico de una bacteria halófila moderada. Dicha bacteria, aislada a partir de un manantial hipersalino de Utah (EE.UU.), e identificada provisionalmente dentro del género *Alteromonas*, es capaz de degradar varios compuestos tóxicos organofosforados. Posteriormente se aislaron otras cinco cepas capaces de degradar compuestos organofosforados y derivados (16).

Por otro lado, es frecuente la contaminación medioambiental por meta-

les pesados, debido a los procesos industriales. Recientemente se ha aislado y caracterizado un gran grupo de bacterias halófilas moderadas resistentes a cinco de los más importantes contaminantes industriales: cadmio, cobre, cinc, cromo y mercurio (70). Estas cepas, resistentes a metales pesados, podrían emplearse en procesos de detoxificación o como bioindicadores de ambientes hipersalinos contaminados (80).

ALIMENTOS FERMENTADOS

Las bacterias halófilas moderadas también tienen diversas aplicaciones en el campo de la alimentación. Así en la elaboración de la salsa de soya intervienen determinadas especies del género *Tetragenococcus*. Los granos de trigo y soya se resuspenden en agua con NaCl al 19% y se deja durante 9 meses en oscuridad. *T. halophila* se emplea como indicador de la fermentación, pudiendo alcanzar una densidad de 10^8 UFC/ml en la salsa de soya, que contiene una concentración aproximadamente 3M de NaCl (71).

OTROS USOS POTENCIALES

Además de los usos citados anteriormente, existe un amplio grado de posibles aplicaciones que aún están siendo objeto de estudio: (i) en la eliminación de fosfatos de ambientes hipersalinos (69); (ii) en el procesamiento de residuos hipersalinos provenientes de la industria del aceite de oliva o de los procesos de curtido de pieles; (iii) utilización industrial de los biosurfactantes producidos por algunas bacterias halófilas moderadas; (iv) producción de enzimas de interés en biología molecular, antibióticos, o carotenoides de interés para la industria alimentaria; (v) en la recuperación de los suelos áridos o semiáridos, caracterizados por condiciones de estrés osmótico (por salinidad, desecación o frío) mediante la obtención de plantas transgénicas capaces de tolerar altas concentraciones de sal, gracias a los genes implicados en la osmotolerancia de las bacterias halófilas moderadas. En este punto cabe destacar la transferencia de los genes de síntesis de ectoína de *H. elongata* a cultivos de tejidos de *Nicotiana taba-*

cum (51) que presentaron una significativa mayor tolerancia al estrés osmótico.

OSMOADAPTACIÓN BACTERIANA

Los seres vivos están permanentemente expuestos a determinados factores biológicos, físicos o químicos existentes en el medio ambiente. Dichos factores se encuentran sujetos a variaciones que pueden amenazar la supervivencia de los organismos, lo que hace necesario desarrollar estrategias de adaptación a estas variables. Uno de estos parámetros es la concentración de solutos, no sólo importante en ambientes hipersalinos, sino en cualquier ambiente natural en los que la desecación o la lluvia puedan provocar importantes variaciones en la osmolaridad. La osmolaridad es la presión osmótica de una solución, expresada en moles de soluto por litros de solución (87). Un aumento en la presión osmótica del medio conlleva a una baja actividad de agua, lo que provoca una deshidratación por parte de la célula, que puede significar su muerte (6). En procariotas, la osmoadaptación comprende un complejo sistema de mecanismos fisiológicos y genéticos de adaptación al estrés osmótico. Así los microorganismos halotolerantes y halófilos han desarrollado una serie de mecanismos específicos de adaptación a elevadas concentraciones salinas, que posiblemente se encuentren conectados entre sí formando un complejo circuito que se encuentra osmorregulado. Las dos primeras respuestas específicas de la célula frente a un aumento de la presión osmótica externa son la adaptación de la composición lipídica de las membranas y la acumulación citoplasmática de compuestos osmoprotectores para compensar el estrés osmótico (54).

RESPUESTA ESPECÍFICA AL ESTRÉS OSMÓTICO

ADAPTACIÓN DE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LAS MEMBRANAS

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el cito-

plasma del medio externo, en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos. Con respecto a los fosfolípidos, a medida que aumenta la salinidad, la membrana se enriquece en fosfatidilglicerol y/o en di-fosfatidilglicerol (cardiolipina), fosfolípidos cargados negativamente, a costa de una disminución en la fosfatidiletanolamina (PE), un fosfolípido neutro (73). Estas modificaciones en la composición de lípidos polares aportan consistencia a la membrana, a la vez que son necesarios para mantener la estructura en doble capa lipídica (73), ya que PE, en respuesta a la salinidad, tiende a formar fases en una única capa.

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana también experimenta modificaciones con respecto a la temperatura y la salinidad, siendo estos diferentes en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Así, en bacterias halófilas moderadas Gram-negativas, el cambio más destacable es un aumento de los ácidos grasos ciclopropánicos, a costa de los insaturados, de los cuales derivan. Este efecto se ha descrito en *Pseudomonas halosaccarolytica* (50), *H. halmophila* (49), *H. canadiensis* (1), *H. salina* (81) y *Chromohalobacter salexigens*. La transformación de ácidos grasos insaturados en ciclopropánicos proporcionaría a la célula una disminución en la fluidez de la membrana, contribuyendo así a mantener la integridad de la misma (73).

COMPUESTOS OSMOPROTECTORES

Sin duda, la principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos y halotolerantes para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma, para compensar la presión os-

mótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación. El primero de ellos, denominado mecanismo "salt-in" es típico de arqueas y Haloanaerobiales (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- . El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas (Dennis y Shimmin, 1997). Esto determina que los organismos que utilizan este mecanismo tengan una limitada capacidad para adaptarse a los cambios en la osmolaridad del medio, por lo que su crecimiento se restringe a ambiente con concentraciones salinas muy elevadas (54).

El segundo mecanismo, conocido como "salt out", es el que utilizan las bacterias, tanto halófilas como no halófilas, además de las arqueas metanógenas halófilas moderadas. Así, estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan **solutos compatibles** (7). Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede por ejemplo cuando las bacterias se cultivan en un medio mínimo (19). Dado el ahorro de energía que supone para la célula, el transporte es preferido a la síntesis "de novo" (54). Los osmoprotectores incorporados desde el medio externo son acumulados junto con los producidos por la célula, o bien pueden reemplazarlos totalmente. A su vez, existen canales proteicos que responden frente a un choque hipoosmótico, diferentes a los sistemas de transporte, que funcio-

nan como válvulas de seguridad, permitiendo la expulsión de los solutos compatibles acumulados (88). La mayor flexibilidad y versatilidad de este mecanismo explica el hecho de que se encuentre mucho más extendido en la naturaleza, habiéndose observado también en hongos, plantas y animales, incluso en células humanas (85).

Los solutos compatibles son moléculas polares sencillas, altamente solubles y sin carga, o bien con carga neta neutra a pH fisiológico, con capacidad estabilizadora de proteínas frente al calor, la desecación o la congelación (20). Estos efectos beneficiosos se basan en el modelo de "exclusión preferencial". Según dicho modelo, los solutos compatibles quedarían excluidos de la primera capa de hidratación de las proteínas, lo que daría lugar a una hidratación preferencial de la superficie de las mismas, disminuyendo así el volumen que ocupan y estabilizando su estructura.

Los solutos compatibles que acumulan las bacterias halófilas moderadas se han identificado recientemente mediante técnicas de RMN y HPLC. Dichas técnicas han permitido, entre otros avances, identificar las tetrahidropirimidinas (ectoína e hidroxiectoína), y elucidar las rutas biosintéticas de varios solutos compatibles. A continuación se describen los principales solutos compatibles.

Aminoácidos.

Aunque este tipo de compuestos fueron los primeros solutos compatibles que se identificaron, no parecen tener una gran importancia en bacterias halófilas moderadas. La excepción la constituye la prolina, que es acumulada por algunas especies Gram-positivas, como *Salinococcus roseus* y *S. hispanicus* (21).

Sin embargo, en bacterias no halófilas, los aminoácidos parecen poseer una mayor importancia. Así, la prolina es un importante osmoprotector en *Bacillus subtilis*, cuya ruta biosintética recientemente se ha elucidado, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. El glutamato es el anión regulado osmóticamente más abundan-

te en enterobacterias. Asimismo, éstas también acumulan alanina y glutamina, aunque a niveles muy inferiores (4).

Azúcares.

En muchos microorganismos, incluyendo algunas bacterias halófilas moderadas, es frecuente la acumulación de sacarosa y trealosa, como respuesta a un choque hiperosmótico, aunque estos compuestos alcanzan concentraciones intracelulares poco elevadas, inferiores a 500 mM (21), y sólo pueden reemplazar parcialmente a los solutos compatibles nitrogenados. En *E. coli*, sin embargo, la trealosa es el principal osmoprotector que se acumula cuando se cultiva en medio mínimo, teniendo lugar su síntesis a partir de la glucosa-6-fosfato en respuesta a un choque hiperosmótico. Los genes responsables de la síntesis (*otsAB*) están regulados por la osmolaridad del medio y la fase estacionaria de crecimiento del cultivo (41). La trealosa también interviene en la protección de la célula frente a otros tipos de estrés, como el calor, la desecación, o la congelación (79). Sin embargo, la trealosa no funciona como agente osmoprotector si se suministra externamente (33).

Glicina betaina (Betaina).

La mayoría de las bacterias, incluyendo las bacterias halófilas moderadas, acumulan betaina como principal soluto compatible cuando se cultivan en medio complejo con elevadas concentraciones salinas. La betaina se acumula tras su transporte desde el medio externo, o bien por oxidación de su precursor, la colina. También existen bacterias capaces de sintetizar betaina "de novo". Esta síntesis, muy común en bacterias fotótrofas, no se observa en quimioheterótrofas, a excepción de las halófilas extremas *Actinopolyspora halophila* y *Halothiorhodospira halochloris* (78). Esta ruta de síntesis, que se inicia a partir del aminoácido glicina, comprende tres reacciones de metilación, con sarcosina y la dimetilglicina como intermediarios, y la S-adenosil metionina como donador de grupos metilos (52).

Los mecanismos de transporte y de

síntesis de betaina por oxidación de colina han sido estudiados en profundidad en bacterias no halófilas, como *B. subtilis* (28), *E. coli* (31), *S. typhimurium* (57) y *Sinorhizobium meliloti* (61). En bacterias halófilas moderadas, estos estudios son más recientes, destacando la caracterización bioquímica del sistema de transporte de alta afinidad por betaina, y la clonación de los genes de síntesis de betaina a partir de colina en *C. salexigens* (9).

Ectoína y hidroxiectoína.

La ectoína (2-metil-4-carboxi-3, 4, 5, 6-tetrahidropirimidina) se describió por primera vez en la bacteria purpúrea fotosintética *Halorhodospira halochloris* (anteriormente *Ectothiorhodospira halochloris*, de donde proviene el nombre de ectoína) (22), aunque se encuentra ampliamente distribuida en bacterias, así como su derivado hidroxilado, la hidroxiectoína (2-metil-4-carboxi, 5-hidroxi-3, 4, 5, 5-tetrahidropirimidina). La ectoína se forma por deshidratación intramolecular del ácido N- γ -acetildiaminobutírico (NADA), que da lugar a la formación del derivado pirimidínico. La ruta biosintética de la ectoína fue elucidada en *H. halochloris* y *H. elongata* por Peters y col. (59). Esta ruta comienza con la transformación del aspartato semialdehído en ácido diaminobutírico (DA), que a su vez es transformado en ácido N-acetildiaminobutírico (NADA), que es convertido finalmente en ectoína. Se han aislado y caracterizado parcialmente las enzimas implicadas en dicha ruta en *H. elongata* (53); la DA transaminasa, la DA acetil transferasa y la NADA deshidratasa, más conocida como ectoína sintasa. En *Brevibacterium linens* (5) y *Streptomyces parvulus* (25) se ha propuesto la existencia de una ruta biosintética alternativa a partir del glutamato.

El primer implicado en la síntesis de ectoína que se ha secuenciado es el gen *ectC* de *Halomonas* sp. KS-3, clonado por PCR mediante oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de la secuencia de la enzima ectoína sintasa (48). Hasta el momento se han caracterizado los genes de síntesis de ectoína de *Marinococcus halophilus* (39),

H. elongata (24) y *Sporosarcina pasteurii* (29).

Por el momento no se ha podido aún determinar completamente la ruta de síntesis de hidroxiectoína, desconociéndose los intermediarios y las enzimas implicadas. En *H. elongata* (24) y *C. salexigens* existen evidencias de que la hidroxiectoína se forma a partir de la ectoína por hidroxilación directa, y recientemente se ha postulado la existencia en *C. salexigens* de una ruta alternativa de síntesis a partir de NADA, precursor inmediato de la ectoína (8).

En las especies del género *Halomonas* y en *C. salexigens*, la ectoína y la hidroxiectoína son los solutos predominantes cuando las células se cultivan en un medio sin betaina o colina (86), alcanzando concentraciones considerablemente elevadas, que son suficientes para conseguir, junto con los iones intracelulares, un equilibrio osmótico con el medio. Por otro lado, en la cepa tipo de *H. elongata* se ha observado que el transporte de betaina no es suficiente para suprimir la síntesis de ectoína, aunque parece ser que la desplaza a concentraciones salinas más elevadas (86). Así, en cultivos de *H. elongata* en medio complejo con 0,85 M; de NaCl a 40°C, sólo se detectó acumulación de betaina, mientras que a 1,7 M de NaCl se observó la acumulación de ambos solutos compatibles.

Otros solutos compatibles de origen bacteriano.

Existe una amplia gama de compuestos solutos compatibles, cuya composición química varía, dependiendo de la especie bacteriana que los sintetiza. Además de los descritos anteriormente, destaca especialmente el glucosilglicerol, que es acumulado por un gran número de cianobacterias halófilas moderadas. También se ha destacado en *Rhodobacter sulfidophilus*, *Pseudomonas mendocina*, *P. alkaligenes* y *C. salexigens*.

Por otro lado, en algunas bacterias Gram-positivas, como *Halobacillus halophilus*, *Planococcus* sp. y *Sporosarcina halophila*, mediante 13C-RMN se han podido detectar diaminoácidos N-acetilados, como la Ne-acetilisina y la

N8-acetilornitina (86, 78).

En la arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus* (46) se ha detectado la acumulación de manosilglicerato y di-mio-inositolfosfato, en respuesta a aumentos de temperatura o salinidad. El manosilglicerato se acumula preferentemente al aumentar la salinidad, mientras que el di-mio-inositolfosfato se acumula a temperaturas superiores a la temperatura óptima de crecimiento (14). Por otro lado, en varias especies del género *Thermococcus* se ha identificado un nuevo soluto compatible, la β -galactopiranosil-5-hidroxisilina, que probablemente se sintetiza a partir de la peptona presente en el medio de cultivo (32).

Por último cabe destacar que, además de los solutos compatibles obtenidos por síntesis, muchas bacterias son capaces de transportar desde el medio extracelular una gran variedad de compuestos que pueden actuar como osmoprotectores. Dichos compuestos, liberados al medio por otros microorganismos tras un choque hipoosmótico, o provenientes de la muerte celular de animales o plantas, son captados por transportadores de baja especificidad por sustrato. Los solutos compatibles disponibles tras su transporte son innumerables. Un ejemplo en la incorporación desde el medio externo de poliamidas (putrescina, cadaverina, espermidina y espermita) por *Salinivibrio costicola* (26), aunque no parece que aumenten su estabilidad osmótica tras un choque hipoosmótico. En *Halomonas* y *Chromohalobacter* también se ha detectado espermidina, aunque en concentraciones similares a las encontradas en bacterias no halófilas.

ACTINOMICETOS HALOFILOS

En la actualidad está creciendo el interés por conocer mejor la gran diversidad de microorganismos halófilos, y cada vez es mayor el número de investigaciones relacionadas con el tema. Tal es el caso de los actinomicetos, organismos productores de una amplia variedad de metabolitos secundarios. Los actinomicetos halófilos representan un reducido grupo de microorganismos que, al combinar su capacidad

productora con su resistencia a las condiciones extremas de salinidad, resultan microorganismos de gran interés como fuente productora de productos industriales, tanto en el campo farmacéutico como en el cosmético y el biotecnológico.

El número de actinomicetos halófilos que se conocen actualmente es muy reducido; en los últimos años se han reportado muy pocos géneros de actinomicetos halófilos, de modo que el estudio de la biología de actinomicetos halófilos, incluyendo su aislamiento, identificación y caracterización, empieza a mostrar la diversidad de estos microorganismos en varias partes del mundo.

En 1975 se dio a conocer por vez primera el reporte de un actinomiceto capaz de crecer en altas concentraciones de salinidad, *Actinopolyspora halophila* (23). Dieciséis años más tarde, en 1991, se reporta el segundo actinomiceto halófilo, *A. mortivallis* (91). En los años siguientes, y hasta 2003, se reportaron 13 especies más, existiendo en la actualidad 15 miembros conformando este grupo. A continuación se presenta de manera breve las principales características de los actinomicetos halófilos reconocidos a la fecha.

Actinopolyspora halophila.

Fue aislado como un contaminante de un medio de cultivo que contenía 25% de NaCl. Ha sido clasificada como *A. halophila* en la familia *Nocardiaceae*. La morfología y características bioquímicas de este microorganismo lo distinguen de otros miembros de la familia *Nocardiaceae* y otros géneros poseedores de pared celular tipo IV. Requiere altas concentraciones de NaCl para crecer, y puede crecer hasta en NaCl a saturación. La concentración más baja que le permite crecer en medio líquido es del 12%, mientras que en medio sólido es del 10%. Las colonias desarrolladas a bajas concentraciones de sal presentan cavidades semejantes a placas virales. No presenta crecimiento en medios que contienen el 30% de KCl en lugar de NaCl. Este organismo puede crecer en medio simple con sales de NH_4^+ como fuente de nitrógeno y diferentes azúcares, así como

otros componentes como fuentes de carbono. No obstante, tiene un requerimiento casi tan grande como los cocos y bacilos; contiene ácido m-diaminopimélico y es sensible a la lisozima; ambas propiedades sugieren la presencia de una pared celular mucopéptidica. También contiene algunos fosfolípidos comunes de otros actinomicetos. Sin embargo, no contiene lípidos característicos de otras bacterias halófilas extremas. Produce ácido a partir de ramnosa y fructosa. Utiliza los siguientes sustratos como fuente de carbono y energía: fructosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, manitol e inositol. Hidroliza tweens 20, 40, 60 y 80. Hidroliza la caseína. No hidroliza urea, xantina y almidón. No reduce nitratos. Licúa la gelatina. Su rango de temperatura es 10 - 43°C, con un óptimo de 37°C. Es sensible a la lisozima y resistente a la penicilina. Su contenido de G + C es 64,2 mol% (23).

Actinopolyspora iraqienseis.

Aislada de una muestra de suelo de Irak. Presenta crecimiento óptimo en un rango de 10 a 15% de NaCl en medio líquido. El rango de temperatura óptima es entre 30 y 35°C. Las colonias son pequeñas (2-4 mm de diámetro), elevadas y convexas. La masa de esporas blanca y abundante en medio sólido al 10-15% de NaCl. El micelio aéreo forma cadenas cortas de esporas. Las esporas son esferoidales y de superficie lisa, con diámetro de 1mm. La pared celular contiene principalmente meso-DAP y cantidades traza de L-DAP. La hidrólisis de la pared celular contiene arabinosa, galactosa y ribosa. Las menaquinonas predominantes son MK-9 (H4). Los fosfolípidos incluyen fosfatidil colina, lisofosfatidil glicerol, fosfatidil glicerol y difosfatidil glicerol. Los ácidos micólicos están ausentes. Utiliza glucosa, maltosa, manitol, sacarosa, fructosa, L-arabinosa, inositol, rafinosa y galactosa como fuente de carbono. No presenta crecimiento en L-ramnosa, D-xilosa o manosa. Produce ácido a partir de manitol y rafinosa. Hidroliza el almidón, xantina y tween 80. No hidroliza urea, esculina y celulosa. Es sensible a lisozima. Es sensible a los siguientes antibióticos: amoxi-

cilina, carbencilina, cefalexina, cloranfenicol, eritromicina y novobiocina. Resistente a clindamicina, oxacilina y vancomicina (72).

Actinopolyspora mortivallis.

Aislado de suelo salado del Valle de la Muerte, California. Crece en medio con un rango de 5-25% de NaCl. Presenta micelio aéreo ramificado y cadenas de esporas. Las esporas son ovoides o cilíndricas. Descomponen la caseína y la xantina. Hidroliza tweens 20, 40, 60 y 80. Utiliza las siguientes fuentes de carbono: xilosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y glucosa, pero no utiliza, ramnosa, manitol, inositol y arabinosa. Produce ácido a partir de: xilosa, sacarosa y glucosa. No reduce nitratos. Licúa la gelatina. Peptoniza leche. Es sensible a penicilina a concentraciones de 10 µg/ml. El rango de temperatura de crecimiento es de 10-50°C, con un óptimo de 45°C. El rango de tolerancia a NaCl es 5 a 30%, con un crecimiento óptimo en concentraciones de NaCl entre 10 y 15% a 45°C. El contenido de G + C es 68 mol%. Se distingue de *A. halophila* por las siguientes características: descomposición de xantina, perfil de utilización de fuentes de carbón, reducción de nitratos y peptonización de leche (91).

Friedmanniella lacustris.

Aislado de agua del lago salado Ekho, Antártica. Cocos y bacilos pequeños con algún polímero extracelular en cultivos viejos. El tamaño de las células es de 0,9-1,3 µm, con formación de esporas en el exterior formando agregados. Crece bien en medio PYGV + ASW con vitaminas. La temperatura óptima de crecimiento es de 26°C. El pH óptimo es 7,5. Tolera más del 6% (w/v) de NaCl, con un óptimo del 4%. Azúcares de su pared celular: glucosa, manosa, ribosa, ramnosa y galactosa. La principal menaquinona respiratoria es MK-9 (H₄) y MK-8 (H₄) como componente menor. Ácidos grasos: ai-C_{15:0}. Los lípidos polares contienen fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y un fosfolípido no identificado. Los ácidos micólicos están ausentes. La composición de bases de DNA es de 73 mol% de G+C (34).

Nocardioides aquaticus.

Aislado de agua del lago salado Ekho, Antártica. Cocos y bacilos pequeños en cultivos viejos, no móviles, con formación de esporas en el exterior, el tamaño de las células es de 0,9-1,0 µm. Crecen bien en medio oligotrófico PYGV y ASW, con bajas concentraciones de peptona, extracto de levadura y glucosa, así como sales minerales, vitaminas y ASW. Su temperatura óptima de crecimiento es de 16-26°C. El pH óptimo de crecimiento es de 7-8. El tipo de peptidoglicano es A 3 y basado en la presencia del ácido m-diaminopimélico. Presenta glucosa y galactosa como azúcares de pared celular. La principal menaquinona es MK-8 (H₄), y como componentes menores MK-6 (H₄) y MK-7 (H₄). Presenta los ácidos grasos C_{18:1}, C_{16:0} y C_{17:0}. Los fosfolípidos presentes son fosfatidil inositol y fosfatidilglicerol. Ausencia de ácidos micólicos. La composición de bases de DNA es 69 mol% G + C (34).

Nocardioipsis halophila.

Aislado de una muestra de suelo de salino en Irak. Crece en medio sintético y orgánico, a una concentración por arriba del 20% de NaCl (w/v) y es resistente a la lisozima. El hidrolizado de la célula completa contiene ácido meso-diaminopimélico (pared celular tipo III). El fosfolípido predominante es de tipo PIII. Predomina la menaquinona MK-10 (H₆, H₈). Los ácidos micólicos están ausentes. Forma abundante micelio aéreo blanco y largas cadenas de esporas ramificadas que tienen apariencia de zigzag. El micelio vegetativo es extensamente ramificado y poco fragmentado (2).

Nocardioipsis kunsanensis.

Es un actinomiceto halófilo moderado, aislado de una salina de Kunsan, República de Corea. El análisis del rDNA 16S indica que el aislado corresponde al género *Nocardioipsis*, pero es genéticamente diferente de otras especies de *Nocardioipsis*. Contiene ácido meso-diaminopimélico, menaquinonas MK-10 (H₆, H₈), fosfolípidos tipo PIII. Es diferenciado de las especies de *Nocardioipsis* descritas debido a sus características morfológicas y fisiológicas (10).

Nocardioipsis lucentensis.

Aislada de una muestra de suelo salado cerca de Alicante, España, el hidrolizado de la célula completa presenta el isómero meso del ácido diaminopimélico y azúcares no característicos. La composición de la pared celular es de tipo III. La principal menaquinona es MK-10 (H₈) y el tipo de fosfolípido es PIII (presenta fosfatidilcolina). Las cadenas de esporas son flexibles y en estadio temprano de esporulación se observa hifas aéreas en forma de zigzag. Este microorganismo produce solutos compatibles del tipo ectoína; se caracteriza por la presencia de micelio aéreo color blanco y micelio vegetativo color amarillo y café. El contenido de G+C es de 71,0 mol% (90).

Nocardioipsis xinjiangensis.

Aislada de una muestra de suelo salino de la provincia de Xinjiang, República Popular China. Esta cepa muestra abundante micelio aéreo y vegetativo y cadenas cortas de esporas que nacen del micelio aéreo. Las esporas son bacilares, con superficie rugosa no móviles. Contiene en su pared celular ácido meso-diaminopimélico, alanina y ácido glutámico (pared celular tipo III). Contiene glucosa, ribosa, galactosa, xilosa y arabinosa como azúcares de la pared celular. Los fosfolípidos predominantes son fosfatidil inositol y fosfatidil glicerol. Como menaquinonas predominantes contiene MK-10 (H₂) y MK-10 (H₄). Su contenido de G + C es de 74,3 mol% (35).

Prauserella halophila* y *Prauserella alba.

Ambas cepas fueron aisladas a partir de una muestra de suelo colectada en la provincia de Xinjiang, China. Fueron aisladas usando agar almidón caseína complementado con 20% de NaCl. Aeróbicos Gram-positivos. En medio Czapek el micelio aéreo es bien desarrollado y el micelio vegetativo es fragmentado. El micelio aéreo forma cadenas largas de esporas con ramificaciones cortas. De acuerdo al análisis filogenético y propiedades quimiotaxónicas, las dos cepas son consideradas miembros del género *Prauserella*. Ambas cepas difieren morfológicamente de *P. rugosa*. La cantidad de hibri-

dación DNA-DNA revela valores de similitud con *P. rugosa* por debajo del 70%. El contenido de G+C es de 65,8 y 66,7 mol%, respectivamente (36).

Saccharomonospora halophila.

Aislada de suelo pantanoso en Kuwait. Bacteria Gram-positiva halófila. Produce micelio aéreo azul a grisáceo, con esporas solas o en pares. Los marcadores quimiotaconómicos coinciden con *Saccharomonospora*. Contiene ácido meso-diaminopimélico como aminoácido diagnóstico en la peptidoglicana. Los azúcares diagnósticos contenidos son arabinosa y galactosa. Presenta fosfatidil inositol, fosfatidiletanolamina, hidroxifosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina y difosfatidilglicerol. MK-9 (H_4) como menaquinona principal. La secuencia del 16S rDNA muestra un 96,8% de similitud con *S. cyanea* (3).

Saccharomonospora paurometabólica.

Aislada de una muestra de suelo colectada en la provincia de Xinjiang, China. La morfología muestra las características típicas del género *Saccharomonospora*: micelio aéreo y vegetativo bien desarrollado, esporas solas que nacen del micelio aéreo, mientras que algunas esporas se encuentran esporádicamente solas naciendo del micelio vegetativo. La pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico. Presenta galactosa, arabinosa y ribosa como azúcares de la pared celular. La menaquinona principal es MK-9 (H_4), mientras que MK-9 (H_2) se encuentra en cantidades más pequeñas. Contiene los siguientes fosfolípidos: fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e hidroxifosfatidiletanolamina. Su contenido de G+C es de 71 mol%. El análisis filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA muestra una relación con *S. halophila* con un 98,7% de similitud. La hibridación DNA-DNA muestra una relación del 53,8% con *S. halophila* (37).

Streptomonospora alba.

Aislada de una muestra de suelo colectada en la provincia de Xinjiang, China. Presenta micelio aéreo y vegetativo. La pared celular contiene ácido

meso-diaminopimélico. El hidrolizado de la pared celular contiene galactosa y arabinosa. La composición de menaquinonas varía con el medio usado para cultivo celular. En medio extracto de levadura-glucosa complementado con 10% de NaCl la menaquinona principal es MK-9 (H_4), mientras que en medio ISP 2 enriquecido con vitaminas las menaquinonas principales son: MK-10 (H_2), MK-9 (H_2) y MK-10 (H_4). Contiene fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol, metilfosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y un fosfolípido no identificado (38).

Streptomonospora salina.

Aislada de una muestra de suelo recolectada en un lago salado en el oeste de China. Presenta micelio aéreo bien desarrollado pero sin fragmentar, forma cadenas cortas de esporas de forma oval a bacilar con superficie rugosa. El micelio vegetativo presenta ramificación con hifas no fragmentadas y esporas redondas a ovales. Contiene ácido meso-diaminopimélico, ácido DD-diaminopimélico, glicina, lisina y ácido aspártico. En su pared celular contiene glucosa, galactosa, ribosa, xilosa, arabinosa y manosa. Contiene fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. Las principales menaquinonas son: MK-9 (H_4), MK-10 (H_2) y MK-10 (H_4) (13).

ACTINOMICETOS HALOFILOS EN MÉXICO

En la actualidad está creciendo el interés por conocer mejor la gran diversidad de microorganismos halófilos, y cada vez es mayor el número de especies descritas. Tal es el caso de los actinomicetos halófilos.

La República Mexicana, dada su situación geográfica, forma, clima, y geología, presenta una gran variedad de condiciones geográficas; estas condiciones han dado como resultado una gran riqueza de suelos, flora y fauna, así como gran diversidad microbológica en ambientes de extrema salinidad.

En el año 2001 se dio inicio del proyecto experimental titulado "*Caracterización de actinomicetos aislados a partir de ambientes hipersalinos*", el

cual se está llevando a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, en colaboración con la Universidad de Sevilla, España, y la Universidad de los Andes, en Mérida, Venezuela. Se han realizado muestreos en diferentes zonas geográficas de México y España, con ambientes salinos extremos, suelos salados, lagunas saladas, salinas costeras y zonas desérticas, con el objetivo de conocer la diversidad de microorganismos halófilos.

Hasta la fecha ha sido posible la creación de una colección de 60 cepas de actinomicetos halófilos, aislados de ambientes hipersalinos localizados en la vertiente del océano pacífico en México, los cuales han sido caracterizados por medio de un estudio fenotípico y molecular (63-66).

Cabe mencionar que los actinomicetos aislados en México tienen un alto porcentaje de similitud con dos de los géneros de actinomicetos que incluyen especies halófilas. Los géneros encontrados por secuenciación del gen 16S muestran una distribución geográfica diferente, siendo el género *Actinopolyspora* predominante en el norte del país (por arriba del Trópico de Cáncer); mientras que el género *Saccharomonospora* predomina en el sur del país (63, 64, 75, 77).

En la figura 1 se muestran los géneros de actinomicetos que incluyen especies halófilas. Las cepas representadas con las claves JA6-1 y LRS... fueron aisladas la zona sur de México; las cepas COSE 1a y COSE-1b fueron aisladas de la zona norte de México y las cepas CAD96S8-2, CAD96S14-2a y HS4-1b son cepas provenientes del sur de España.

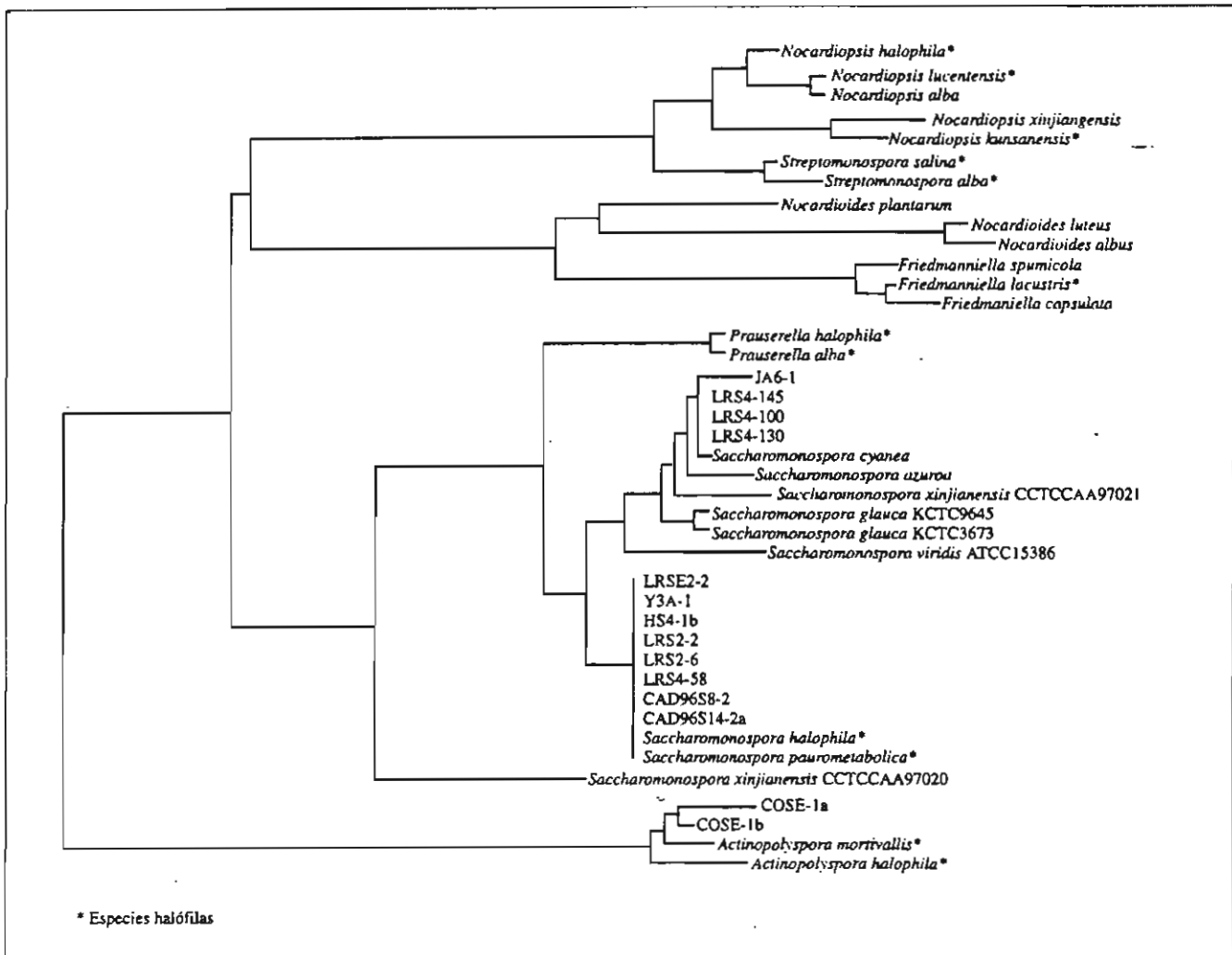
AGRADECIMIENTOS

A los doctores María Isabel Calderón, María del Carmen Márquez y Antonio Ventosa, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, España.

M. en C. Ninfa Ramírez Durán actualmente es becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 141507.

Erika Colmenares P. Edición y corrección de este artículo.

Figura 1. Géneros de actinomicetos que incluyen especies halófilas.



BIBLIOGRAFÍA:

- ADAMS RL, BYGRAVES J, KOGUT M, RUSSELL NJ. The role of osmotic effects in haloadaptation of *Vibrio costicola*. *J. Gen. Microbiol.* 1987; 133: 1861-1870.
- AL-TAI AM, RUAN JS. *Nocardioopsis halophila* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994; pp 478.
- AL-ZARBAN SS, AL-MUSALLAM AA, ABBAS I, STACKEBRANDT E, KROPPESTEDT RM. *Saccharomonospora halophila* sp. Nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 555-558.
- BELITSKY BR, BRILL J, BREMER E, SONENSHEIN AL. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 4389-4392.
- BERNARD T, JEBBAR M, RASSOULI Y, HIMDI-KABBAB S, HAMELIN J, BLANCO C. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139: 129-136.
- BREMER E, KRÄMER R. 2000. Doping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. P. 79-97. In: G. Storz y R. Hengge-Aronis (eds.) *Bacterial Stress Responses*. Washington, D. C.: ASM Press.
- BROWN AD. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 1976; 40: 803-846.
- CÁNOVAS D, BORGES N, VARGAS C, VENTOSA A, NIETO JJ. Role of N-g-acetildiaminobutirato as an enzyme stabilizer and a n intermediate in the biosintesis of hydroxyectoine. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 3774-3779.
- CÁNOVAS D, VARGAS C, CSONKALN, VENTOSA A, NIETO JJ. Synthesis of glycine betaine from exogenous choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 4095-4097.
- CHUN J, BAE KS, MOON EY, JUNG SO, LEE HK, KIM SJ. *Nocardioopsis kunsanensis* sp. Nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2000; 50: 1909-913.
- CORONADO MJ, VARGAS C, HOFEMEISTER J, VENTOSA A, NIETO JJ. Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000a; 183: 67-71
- CORONADO MJ, VARGAS C, MELLADO E, TEGOS G, DRAINAS C, VENTOSA A, NIETO JJ. The alpha-amylase gene amyH of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology.* 2000b; 146: 861-868.
- CUI XL, MAO PH, ZENG M, LI WJ, ZHANG LP, XU LH, JIANG CH L. *Streptomonospora salina* gen. nov., sp. Nov., a new member of the family Nocardioaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2001; 51: 357-363.
- Da COSTA M, SANTOS H, GALINSKI EA. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*, pp. 117-153. In: Scheper, T. (ed), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol 61*. Berlin: Springer-Verlag.
- DE FRANK JJ, CHENG TC. Purification and properties of an organophosphorus acid

- anhydrase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 1938-1943.
16. DE FRANK JJ, BEAUDRY WT, CHENG TC, HARVEY SP, STROUP AN, SZAFRANIEC LL. Screening of halophilic bacteria and *Alteromonas* species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chem. Biol. Interact.* 1993; 87: 141-148.
 17. DENNIS PP, SHIMMIN LC. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic *Archaea*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; 61: 90-104.
 18. FRINGS E, SAUER T, GALINSKI EA. Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *J. Biotechnol.* 1995; 43: 53-61.
 19. GALINSKI EA. 1995. Osmoadaptation in bacteria, p. 273-329. *In*: R.K. Poole (ed), *Advances in Microbial Physiology*. London: Academic Press
 20. GALINSKI EA, LOUIS P. 1998. Compatible solutes: ectoine production and gene expression. *In*: A. Oren (ed), *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*. Boca Raton: CRC Press.
 21. GALINSKI EA, TRÜPER HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994; 15: 95-108.
 22. GALINSKI EA, PFEIFFER HP, TRÜPER HG. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinocarboxylic acid. *Eur. J. Biochem.* 1985; 149: 135-139.
 23. GOCHNAUER MB, LEPPARD GG, KOMARATAT P, KATES M, NOVITSKY T, KUSHNER DJ. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *J. Microbiol.* 1975; 21: 1500-1511.
 24. GÖLLER K, OFFER A, GALINSKI EA. Construction of a NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 161: 293-300.
 25. INBAR L, LAPIDOT A. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of ^{13}C and ^{15}N -labeled and ^{13}C and ^{15}N -NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 16014-16022.
 26. KAMEKURA M, BARDÓCZ S, ANDERSON P, WALLACE R, KUSHNER DJ. Polyamines in moderately and extremely halophilic bacteria. *Biochim Biophys. Acta.* 1986; 880: 204-208.
 27. KAMEKURA M, HAMAWATA T, ONISHI H. Application of halophilic nuclease H from *Micrococcus varians* subs. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982; 44: 994-995.
 28. KAPPES RM, KEMPF B, BREMER E. 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 5071-5079.
 29. KUHLMANN AU, BREMER E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 772-783.
 30. KUSHNER DJ. 1978. Life in high salt and solute concentrations. *In*: Kushner DJ. (ed) *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London. pp 317-368.
 31. LAMARK T, KAASEN I, ESHOO MW, FALKENBERG P, MCDOUGALL J, STROM AR. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 1049-1064.
 32. LAMOSA P, MARTINS LO, DA COSTA M, SANTOS H. Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 3591-3598.
 33. LARSEN PI, SYDNES LK, LANDFALD B, STROM AR. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch. Microbiol.* 1987; 147: 1-7.
 34. LAWSON PA, COLLINS MD, SCHUMANN P, TINDALL BJ, HIRSCH P, LABRENZ M. New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekbo lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella lacustris* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 2000; 23: 219-229.
 35. LI MG, LI WJ, XU P, CUI XL, XU LH, JIANG ChL. *Nocardopsis xinjiangensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a saline soil sample in China. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2003a; 53: 317-321.
 36. LI WJ, XU P, TANG SK, XU LH, KROPFENSTEDT RM, STACKEBRANDT E, JIANG Ch L. *Präuserella halophila* sp. nov. and *Präuserella alba* sp. nov. Moderately halophilic actinomycetes from saline soil. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2003b; 53: 1545-1549.
 37. LI WJ, TANG SK, STACKEBRANDT E, KROPFENSTEDT RM, SCHUMANN P, XU LH, JIANG ChL. *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2003c; 53: 1591-1594.
 38. LI WJ, XU P, ZHANG LP, TANG SK, CUI XL, MAO PH, XU LH, SCHUMANN P, STACKEBRANDT E, JIANG ChL. *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001. *Int. J. Syst. Bacteriol. Evol. Microbiol.* 2003d; 53: 1421-1425.
 39. LOUIS P, GALINSKI EA. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 1997; 143: 1141-1149.
 40. LOUIS P, TRÜPER HG, GALINSKI EA. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41: 648-688.
 41. LUCHT JM, BREMER E. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994; 14: 3-20.
 42. MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2003. Crecimiento microbiano. *En*: *Biología de los Microorganismos 10ª edición* Prentice hall; pp 137 - 160.
 43. MALTSELVA O, MCGOWAN C, FULTHORPE R, ORIEL P. Degradation of dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiology.* 1996; 142: 1115-1112.
 44. MARGESIN R, SCHINNER F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles.* 2001; 5: 73-83.
 45. MARTÍNEZ-CHECA F, TOLEDO FL, VÍLCHEZ R, QUESADA E, CALVO C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurlalina* strain H-28 in media containing hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 58: 358-363.
 46. MARTINS LO, SANTOS H. Accumulation of mannoglycerate and di-myoinositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 3299-3303.
 47. MCMEEKIN TA, NICHOLS PD, NICHOLS SD, JUHASZ A, FRANZMANN PD. Biology and biotechnological potential of halotolerant bacteria from Antarctic saline lakes *Experientia* 1993; 49: 1042-1046.
 48. MIN-YU L, ONO H, TAKANO M. Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. *Annu. Rep. Int. Center Cooperative Res. Biotechnol. Japan.* 1993; 16:193-200.
 49. MONTEOLIVA-SÁNCHEZ M, FERRER MR, RAMOS-CORMENZANA A, QUESADA E, MONTEOLIVA M. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *J. Gen. Microbiol.* 1988; 134: 199-203.
 50. MONTEOLIVA-SÁNCHEZ M, RAMOS-CORMENZANA A, RUSSELL NJ. The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica*. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139: 1877-1884.
 51. NAKAYAMA H, YOSHIDA K, ONO H, MUROOKA Y, SHINMYO A. Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 2000; 122:1239-1247.
 52. NYSSOLA A, KEROVUO J, KAUKINEN P, VON WEYMARN N, REINIKAINEN T. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 22196-22201.

53. ONO H, SAWADA K, KHUNAJAKR N, TAO T, YAMAMOTO M, HIRAMOTO M, SHINMYO A, TAKANO M, MUROOKA Y. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. J. Bacteriol. 1999; 181: 91-99.
54. OREN A. Bionergetics aspects of halophilism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999; 63: 334-348.
55. OREN A, GUVERICH P, HENIS Y. Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57: 3367-3370.
56. OREN A, GUVERICH P, AZACHI M, HENIS Y. 1993. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations, p. 263-274. In: E. Rosenberg (ed). Microorganisms to Combat Pollution. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
57. OVERDIER DG, OLSON ER, ERICKSON BD, EDERER MM, SONKA LN. Nucleotide sequence of the transcriptional control region of the osmotically regulated *proU* operon of *Salmonella typhimurium* and identification of the 5' endpoint of the *proU* mRNA. J. Bacteriol. 1989; 171: 4694-4706.
58. PÉREZ-FERNÁNDEZ ME, QUESADA E, GÁLVEZ J, RUIZ C. Effect of exopolysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas eurihalina*, on the proliferation *in vitro* of human peripheral blood lymphocytes. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2000; 22: 131-141.
59. PETERS P, GALINSKI EA, TRÜPER HG. The biosynthesis of ectoine. FEMS Microbiol. Lett. 1990; 71: 157-162.
60. PFIFFNER SM, MCINERNEY MJ, JENNEMAN GE, KNAPP RM. Isolation of halotolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of the exopolymer. Appl. Environ. Microbiol. 1986; 51: 1224-1229.
61. POCARD JA, VINCENT N, BOMCOPAGNI E, SMITH LT, POGGI MC, LE RUDULIER D. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. Microbiology. 1997; 143: 1369-1379.
62. QUESADA E, BÉJAR V, CALVO C. Exopolysaccharide production of *Volcaniella eurihalina*. Experiencia. 1993; 49: 1037-1041.
63. RAMÍREZ N, MARQUEZ MC, CASTRO K, SANDOVAL H. 2001a. Isolation of truly halophilic actinomycetes. 12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Vancouver, Canada. Agosto 5-9 de 2001.
64. RAMÍREZ N, CASTRO K, GONZÁLEZ A, MARQUEZ MC, SANDOVAL H, VENTOSA A. 2001b. Isolation of Actinomycetes from hypersaline environments in the South of Mexico. Halophiles 2001. International Conference on Halophilic Microorganisms. Sevilla, 23-27 de septiembre de 2001.
65. RAMÍREZ N, CASTRO K, GONZÁLEZ A, MARQUEZ MC, SANDOVAL H, VENTOSA A. 2001c. Aislamiento de actinomycetos de importancia farmacológica a partir de hábitats hipersalinos. XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Manzanillo, col. 21-25 de octubre de 2001.
66. RAMÍREZ N, MARQUEZ MC, CASTRO K, SANDOVAL H. 2001d. Aislamiento de actinomycetos a partir de ambientes hipersalinos europeos y mexicanos. VI Congreso de Investigación Departamental. Oaxtepec, Mor. 7-9 de noviembre del 2001.
67. RAMÍREZ N, SANDOVAL H, MARQUEZ MC, ARAHAL D, RAMÍREZ H. 2004a. Isolation and characterization of halophile actinomycetes from Mexico. International Symposium on Microbial Ecology, ISME-10. Cancun México, august 22-27, 2004.
68. RAMÍREZ N, VENTOSA A, RAMÍREZ H, SANDOVAL H. 2004b. Phylogeny of halophile actinomycetes from Mexico, based on 16s rDNA sequence analysis International Congress on Halophilic Microorganism "Halophiles 2004". 4-9 september 2004. Ljubljana, Slovenia.
69. RAMOS-COMENZANA A. 1991. Halophilic organisms and the environment, p. 15-24. En Rodríguez-Valera (ed), General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms. New York, NY: Plenum Press.
70. RIOS M, NIETO JJ, VENTOSA A. Numerical taxonomy of heavy metal-tolerant nonhalophilic bacteria isolated from hypersaline environments. Int. Microbiol. 1998; 1: 38-44.
71. RÖLING WFM, VAN VERSEVELD H. Characterization of *Tetragenococcus halophila* populations in Indonesian soy mash (kecap) fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62: 1203-1207.
72. RUAN JS, AL-TAI AM, ZHOU ZH, QU LH. *Actinopolyspora iraqiensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 1994; 759-763.
73. RUSSELL NJ. 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms, p. 163-210. In: R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds). The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press.
74. SÁNCHEZ-PORRO C, MARTÍN S, MELLADO E, VENTOSA A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. J. Appl. Microbiol. 2003; 94: 295-300.
75. SANDOVAL H, SERRANO JA, RAMÍREZ N, VENTOSA A. 2002. Unusual crystal formation found in halophilic actinomycetes. Internacional Union of Microbiological Societies (IUMS), Congress 2002. Paris, France 27 de julio - 1 de agosto de 2002.
76. SAUER T, GALINSKI EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. Biotechnol. Bioeng. 1998; 57: 306-313.
77. SERRANO JA, SANDOVAL H, RAMÍREZ N, VENTOSA A. Método simplificado para el estudio morfológico por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de actinomycetos halófilos Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2003; 3: 42-46.
78. SEVERIN J, WOHLFARTH A, GALINSKI EA. The predominant role of the recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of the halophilic eubacteria. J. Gen. Microbiol. 1992; 138: 1629-1638.
79. STROM AR, KAASEN I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and regulation of gene expression. Mol. Microbiol. 1993; 8: 205-210.
80. TREVORS JT, ODDIE KM, BELLIVEAU BH. Metal resistance in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 1985; 32: 39-54.
81. VALDERRAMA MJ, MONTEOLIVA-SÁNCHEZ M, QUESADA E, RAMOS-CORMENZANA A. Influence of salt concentration on the cellular composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. Res. Microbiol. 1998; 149: 675-679.
82. VAN DEN BURG B. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current opinion in Microbiology. 2003; 6: 1-6
83. VENTOSA A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria, p. 71-84. En F. Rodríguez-Valera (ed), Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press.
84. VENTOSA A, NIETO JJ. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World J. Microb. Biotechnol. 1995; 11: 85-94.
85. VENTOSA A, NIETO JJ, OREN A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62: 504-544.
86. WOHLFARTH A, SEVERIN J, GALINSKI EA. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. J. Gen. Microbiol. 1990; 136: 705-712.
87. WOOD JM. Osmosensing by bacteria: signal and membrane based sensors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999; 63: 230-262.
88. WOOD JM, BREMER E, CSONKA LN, KRÁMER R, POOLMAN B, VAN DER HEIDE T, SMITH LT. Osmosensing and osmoregulatory compatible solutes accumulation by bacteria. Comp. Biochem Physiol. 2001; 130: 437-460.
89. WOOLARD CR, IRVINE RL. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. Abstr. Ann. Water. Environ. Fed. Conf., New Orleans. USA; 1992.
90. YASSIN AF, GALINSKI EA, WOHLFARTH A, JAHNKE KD, SCHAAL KP, TRÜPER HG. A new actinomycete species, *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993; 266-271.
91. YOSIDA M, MATSUBARA K, KUDO T, HORIKOSHI K. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov.; a moderately halophilic actinomycete. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991; 15-20.

MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS. ACTINOMICETOS HALÓFILOS EN MÉXICO.

EXTREMOPHILE MICROORGANISMS. HALOPHILE ACTINOMYCETES IN MEXICO.

Ninfa Ramírez D.,¹ José Antonio Serrano R.,² Horacio Sandoval T.¹

1. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco
Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán 04960, México D. F.
Departamento de Sistemas Biológicos.
Tel 54837256 Fax 54837525 ninfard@hotmail.com hsandov@correo.xoc.uam.mx

2. Grupo de Investigaciones de Actinomicetos Patógenos Humanos y del Suelo. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Correo electrónico: jacielo@cantv.net

RESUMEN

Hoy en día es conocido que los ambientes que hasta hace poco eran considerados inhabitables por el hombre son colonizados por determinados organismos capaces de adaptarse a esos nichos ecológicos llamados ambientes extremos; estos organismos son llamados Extremófilos. Las bacterias halófilas son microorganismos capaces de crecer en condiciones de extrema salinidad. Los ambientes hipersalinos se localizan en zonas calientes y secas como los lagos salinos y suelos salados de México.

Los Actinomicetos son un grupo de bacterias filamentosas, generalmente grampositivas, que forman filamentos ramificados y cuyo hábitat principal es el suelo. Actualmente se sabe que algunas especies de actinomicetos son capaces de crecer en condiciones de extrema salinidad, formando el grupo de los actinomicetos halófilos. Los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora* que incluyen este tipo de especies halófilas han sido localizados en diferentes puntos geográficos del planeta. En este artículo se muestra un panorama general de los diferentes tipos de microorganismos extremófilos, haciendo especial referencia al caso de los actinomicetos halófilos. Por otro lado, basado en procesos de muestreo, técnicas de identificación y caracterización para actinomicetos halófilos, se reporta la predominancia de los géneros *Saccharomonospora* y *Actinopolyspora* en las zonas sur y norte de México respectivamente.

Palabras clave: Extremófilo, halófilo, actinomiceto, *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora*.

ABSTRACT

In the present days is already well known that environments that were considered inhabitable to man have been colonized by certain type of organisms capable of adapted to these ecological niches known as extreme environments. The halophilic bacteria are microorganisms capable of growth in extreme conditions of salinity. The salinity environments are localized in hot and dry geographical areas, such as salty lakes and salty soils from Mexico.

The actinomycetes are Gram positives filamentous bacteria which form branched filamentous cells and are mainly found in soil. Recently have been found that some actinomycetes species are able to growth in extreme environmental conditions of salinity, this group of microorganisms are halophilic actinomycetes.

Among these halophilic actinomycetes can be found organisms that belong to the genus *Saccharomonospora* and *Actinopolyspora*, microorganisms that have been found in several geographical areas of earth.

The present article represents an overview on the different kinds of extremophilic microorganisms with particular reference to the halophilic actinomycetes. The present work shows results of research studies conducted to demonstrate the presence of halophilic actinomycetes in different geographical regions of Mexico. As a result of these studies we were able to demonstrate the presence of the genus *Saccharomonospora* in the south region and *Actinopolyspora* in the north region of Mexico.

Key words: Extremophile, halophile, actinomycete, *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora*.

INTRODUCCIÓN

La vida prospera en los extremos físicos y químicos que, hasta hace poco tiempo, se creían imposibilitados para albergar vida, el término "extremo" se utiliza a menudo para caracterizar estos lugares.

El término extremófilo fue usado por vez primera por Macelroy en 1974 hace tres décadas (1). "Ambiente extremo", es un término relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la sobre vivencia de otro organismo. Los extremófilos se desarrollan bajo condiciones que podrían matar a la mayoría de otras criaturas y muchos no pueden sobrevivir en los ambientes considerados globalmente normales. Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperaturas muy altas (55-121 °C) o bajas (-2-20 °C), alta salinidad (NaCl 2-5M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 4) (2, 3).

Los extremófilos presentan un interés científico diversificado. En principio, son frecuentemente taxones nuevos que en el momento de su descubrimiento vienen a completar el conocimiento filogenético de los seres vivos y también a enriquecer los debates relativos al origen y a los límites de la vida. El descubrimiento de microorganismos que habitan en ambientes con temperaturas extremas, pH extremos, altas presiones y alta salinidad, ha despertado el interés de su estudio desde el punto de vista biotecnológico por las características de estos microorganismos; ya que sus biomoléculas son necesariamente resistentes a las condiciones agresivas de su entorno, lo que desemboca en intensos trabajos para intentar comprender los mecanismos íntimos de resistencia, pero también para estudiarlos en la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales entre las que la PCR (Polymerase Chain Reaction) constituye el más destacado ejemplo de la situación actual. Además, los ambientes extremos demuestran que la vida podría existir en algunos de los ambientes extremos encontrados en espacio y más allá (4).

La mayoría de las enzimas usadas hasta la fecha se origina de organismos mesófilos y, a pesar de sus muchas ventajas, el uso de estas enzimas es restringido debido a su estabilidad limitada en los extremos de la temperatura, del pH y de la fuerza iónica. Por otra parte, los extremófilos son una fuente potente de enzimas, que demuestran alta estabilidad bajo condiciones extremas (5, 6, 7).

Los extremófilos han despertado el interés de varias industrias, debido a sus enzimas, catalizadores biológicos que aceleran las reacciones químicas de la célula, y que en el caso de las arqueobacterias extremófilas les permiten colonizar los ambientes más inhóspitos. Las enzimas habituales tienen ciertas limitaciones, sin embargo las extremoenzimas, empiezan a operar justo en el punto donde las habituales dejan de funcionar. Existen numerosos procesos industriales que requieren el uso de estos aceleradores químicos, tal es el caso de las enzimas que participan por ejemplo en la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos como pan y vino, tratamiento de residuos, extracción de petróleo, obtención de biochips para la identificación de personas y el diagnóstico de enfermedades (8).

En este trabajo se presenta un panorama de los microorganismos extremófilos, incluyendo sus características ambientales y de crecimiento, mecanismos de adaptación, aplicaciones y los principales ejemplos de microorganismos extremófilos. Por otro lado se hace mención acerca de la presencia de microorganismos extremófilos (halófilos) encontrados en México, así como los géneros predominantes en diferentes zonas del país.

TERMÓFILOS

Se consideran como termófilos aquellos microorganismos que crecen en temperaturas por encima de 65 °C, los termófilos presentan óptimos de temperatura de 70 - 80 °C y máximos entre 80 - 113 °C. La mayoría de las bacterias crecen más rápidamente entre 25 y 40 °C, sin embargo no se han encontrado animales o plantas multicelulares que vivan por arriba de los 50 °C (9, 10).

El límite de temperatura a la que se pueden encontrar organismos no es conocido todavía aunque se cree que por encima de 150 °C ninguna forma de vida podría evitar la ruptura de los enlaces químicos que forman el ADN y otras moléculas esenciales. En función de la temperatura de crecimiento, los organismos se clasifican de la manera siguiente. Tabla 1.

TEMPERATURA	DESCRIPCIÓN
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento está por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110 y 113°C.
Termófilos	Crece por encima de los 45 ó 50°C
Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37°C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de los 10°C.
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5°C y con temperaturas máximas de 20 ó 25°C
Psicrófilos facultativos	Temperatura óptima de 15°C llegando a alcanzar los 20°C y también capaces de bajar hasta menos de 0°C.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos en función de su temperatura óptima de crecimiento.

Ambientes

Los hábitat naturales con temperaturas permanentemente altas (por encima de 45 – 50 °C) están restringidos a unas pocas zonas de la biosfera, normalmente relacionadas con fenómenos volcánicos: fuentes termales volcánicas terrestres, fuentes termales submarinas (fumarolas hidrotermales) asociadas a las grandes dorsales oceánicas y materiales en fermentación como acúmulos de abono (compostas) los cuales pueden alcanzar temperaturas de 65 °C.

Adaptaciones

Tienen alta estabilidad térmica de sus enzimas (redes de interacciones iónicas), modificaciones de la membrana plasmática. En **Bacteria**, presentan alargamiento de las cadenas de Ácidos Grasos (C₁₈-C₂₄), incremento de ácidos grasos saturados, presencia de ramificaciones, ciclos, hopanoides. En **Archaea**, los lípidos son muy especiales, se trata de ésteres de hidrocarburos unidos al glicol (el enlace éter es mas resistente). Algunas exhiben una monocapa bioquímica de C₄₀ – bifitanil – tetraéteres, (resultado de unirse “cola con cola” 2 C₂₀ – fitanil - diéteres) que condicionan una extrema resistencia a agentes ambientales (9, 11).

Ejemplos

Bacterias

Thermus acuaticus, crece a temperaturas mayores de 70 °C y es ampliamente utilizada en la industria para la tecnología PCR (Polymerase Chain Reaction).

Arqueas

Hay tres grupos principales de hipertermófilos en los arquea; los sulfuro dependientes (metabolizan azufre para obtener energía), los sulfuro reductores y los metanogénicos. La mayor parte de los termófilos de esta división son sulfuro dependientes y se presentan como sulfuro reductores anaeróbicos (crecen a temperaturas mayores de 90 °C y la mayoría son de origen marino) y sulfuro oxidantes aerobios (estos últimos menos termófilos). *Sulfolobus acidocaldarius*, crece prolíficamente a partir de 85 °C en fuentes termales ácidas o suelos superficiales (pH de 1 a 5). *Pyrolobus fumarii*, su temperatura óptima de

crecimiento son 105 °C pero puede crecer hasta a 113 °C, sin embargo detiene su crecimiento cuando se baja de 90 °C. Crece en las paredes de las fumarolas.

Eucariotas

Cyanidium caldarium, su afiliación taxonómica no es todavía muy clara pero generalmente se agrupa dentro de las algas rojas. Su crecimiento óptimo se produce a 45 °C y la máxima posible es de 57 °C, siempre en ambientes ácidos. (12). *Alvinella pompojana*, viven en madrigueras de chimeneas hidrotermales con fuertes gradientes de temperatura, a unos 68°C, aunque pueden exceder los 81 °C (13).

Aplicaciones

El caso espectacular lo ofrece el *Thermus aquaticus*, este microorganismo descubierto en 1968 fue localizado en las aguas de los géiseres del parque Yellowstone, en Wyoming. Una de sus enzimas, la *polimerasa taq*, hizo posible que dos décadas después en el año 1985, un investigador norteamericano, Kary Mullis desarrollara un método que permite, a partir de una muestra muy pequeña de ADN, obtener millones de copias de ADN *in vitro*, en unas pocas horas y sin necesidad de usar células vivas. Esta técnica, llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Estas secuencias se usan para diseñar dos oligonucleótidos sintéticos de ADN complementarios a una porción de cada una de las dos cadenas de la doble hélice. Actualmente, la PCR se utiliza de forma rutinaria en medicina para, entre otras cosas, la preparación de muestras genéticas, el diagnóstico de enfermedades de naturaleza hereditaria y la identificación de personas mediante la huella génica. Cuando Mullis empezó a desarrollar la técnica PCR, la enzima ADN polimerasa, que copia reiteradamente pedazos de ADN, provenía de organismos no termófilos, por lo que en el proceso necesario de incubación, el proceso se paralizaba al subir la temperatura. La *polimerasa Taq* fue la solución. Hoy esta enzima a veces es sustituida por la *polimerasa Pfu*, que ha sido aislada del hipertermófilo *Pyrococcus furiosus*, y que ofrece su mejor rendimiento a una temperatura de 100 °C (11, 14).

Varios tipos de enzimas termoestables son requeridas por las industrias, tales como la industria de detergentes, alimentos, almidón, textiles, piel, papel y farmacéutica. En la industria de los detergentes y jabones para la ropa se utilizan biocatalizadores que quiten las manchas a baja temperatura, mientras que en tratamientos de esterilización de ropa de quirófano se prefiere un jabón que tenga biocatalizadores que funcionen a altas temperaturas. La industria del cuero y las pieles requiere enzimas que degraden proteínas de la piel de los animales en condiciones de alta salinidad o minerales. En cada caso se emplearán enzimas provenientes de diferentes extremófilos.

Las enzimas resistentes al calor, se han usado para mejorar reacciones, usando temperaturas más altas, en procesos industriales tales como la obtención de ciclodextrinas a partir del maíz. Las ciclodextrinas son unas estructuras muy útiles para dispensar ciertos fármacos, estabilizar ciertos componentes aromáticos alimentarios, así como diversos usos industriales. En la tabla 2 se muestran las principales enzimas de los microorganismos termófilos y sus aplicaciones industriales (8, 14).

MICROORGANISMO TERMÓFILOS	ENZIMA	APLICACIÓN
	Proteasas	Detergentes, alimentos, elaboración de cerveza y panadería
	Glicosil hidrolasas (amilasas, pululanastas, glucoamilasas, glucosidasas, celulasas, xilanasas)	Almidón, celulosa, quitina, pectina y procesamiento de textiles.
	Quitinasas	Modificación de alimentos y productos para la salud
	Lipasas, estearasas	Detergentes, reacciones estereo-específicas (<i>trans</i> -esterificación, biosíntesis orgánica)
	ADN - polimerasas	Biología molecular (PCR)
	Deshidrogenasas	Reacciones de oxidación

Tabla 2. Enzimas de termófilos y sus aplicaciones.

PSICRÓFILOS

El agua es el disolvente primordial para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta ocurra. Esto pone un límite para el crecimiento de organismos por debajo de los 0 °C. Típicamente los organismos psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5 °C, aunque su rango de temperaturas no mortales puede ir desde los 20 °C hasta menos de 0 °C (9).

Ambientes

Los ambientes fríos son actualmente mucho más comunes y extensos que los calientes en la Tierra y en el Universo. En la tierra la temperatura media de los océanos es de tan solo 2 a 3 °C aunque puede ser mayor en la superficie, pero a 200 metros de profundidad esta se iguala casi totalmente, por otro lado hay extensas áreas en el ártico y antártico que permanecen heladas la mayor parte del año.

Las variaciones de temperaturas, pH y salinidad del medioambiente en el que se encuentren estos organismos son de decisiva importancia para su crecimiento. El régimen de salinidad del hielo marino varía durante el proceso de formación así como el pH debido a la actividad biológica o la precipitación de carbonatos (15, 16).

Los principales ambientes habitados por los extremófilos incluyen: regiones polares, montañas altas, glaciares, el fondo de los océanos, sistemas subterráneos bajos (cuevas), la atmósfera superior, las aplicaciones refrigeradas y las superficies de las plantas y de los animales que viven en los ambientes fríos, donde las temperaturas nunca exceden los 5 °C.

Muchos psicrófilos viven en los biotopos que tienen factores de más de una tensión, tales como baja temperatura y alta presión en los mares profundos, o la alta concentración de la sal y la baja temperatura en el hielo del mar (17, 18, 19, 20, 21).

Adaptaciones

Los psicrófilos han desarrollado mecanismos de adaptación para realizar sus funciones metabólicas a bajas temperaturas incorporando características únicas en sus proteínas y membranas. Comparado con las proteínas de mesófilos, las proteínas psicrófilos muestran disminución en interacciones iónicas y enlaces del hidrógeno, poseen menos grupos hidrofóbicos y más grupos cargados en su superficie. Debido a estas modificaciones a bajas temperaturas, las proteínas de los psicrófilos pierden su rigidez y ganan flexibilidad estructural para la realización de sus funciones catalíticas. Las membranas de los psicrófilos contienen una mayor proporción de ácidos grasos no saturados, por lo que su fluidez y capacidad de transportar los alimentos se mantienen bajo condiciones muy frías (17, 18, 19, 20, 21).

Ejemplos

Bacterias

Gram-negativas: *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Polaromonas*, *Psychroflexus*, *Polaribacter*, *Moritella*, *Vibrio* y *Pseudomonas*

Gram-positivas: *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus*.

Arqueas

Methanogenium, *Methanococcoides* y *Halorubrum*

Levaduras

Candida y *Cryptococcus*

Hongos

Penicillium y *Cladosporium*

Eucariotas

Polaromonas vacuolata, su temperatura óptima de crecimiento es de 4 °C, sin que pueda multiplicarse arriba de los 12 °C. *Reomita globosa*, flagelado heterotrófico del Antártico que puede soportar cambios de temperatura muy acusados con ciclos de congelación-descongelación y temperaturas diurnas en ocasiones de más de 20 °C. En la antártida hay al menos otras 24 especies de protistas, líquenes y mohos viven en estas condiciones. La temperatura óptima para el crecimiento de *Heteromita* es de 23 °C, pero bajo condiciones extremas demuestra adaptaciones como el enquistamiento y utilización apropiada de recursos durante cortos periodos de tiempo, que le permiten crecer activamente a temperaturas cercanas a los 0 °C (17, 18, 19, 20, 21, 22).

Aplicaciones

Los psicrófilos son capaces de degradar sustancias poliméricas tales como: almidón, celulosa, xilano, pectina, quitina, proteínas y lípidos; así como producir enzimas como: amilasa, celulasa, xilanasas, pectinasas, quitinasas, proteasa y lipasa respectivamente (8, 23, 24).

Polaromonas vacuolata, hallado en el océano Antártico, tiene una temperatura óptima de crecimiento es de 4 °C y es capaz de multiplicarse si la temperatura aumenta más allá de los 8 °C. (25). La industria alimentaria está poniendo los ojos en este extremófilo debido a que

el procesamiento de ciertos alimentos precisa a menudo de enzimas que trabajen en frío para evitar su deterioro, igualmente se han fijado también los fabricantes de perfumes ya que sus enzimas podrían utilizarse para retrasar la evaporación del excipiente y en los detergentes de lavado frío. Las enzimas de los psicrófilos podrían utilizarse para producir grasas y aceites insaturados de forma natural, esto nos permitiría la elaboración de productos alimenticios más sanos. En la tabla 3 se muestran las principales enzimas de los psicrófilos y sus aplicaciones industriales.

MICROORGANISMO PSICROFILOS	ENZIMA	APLICACIÓN
	Proteasas	Detergentes, alimentos (productos lácteos)
	Amilasas	Detergentes y panadería
	Celulasas	Detergentes, alimentos y textiles
	Deshidrogenasas	Biosensores
	Lipasas	Detergentes, alimentos y cosméticos

Tabla 3. Enzimas de psicrófilos y sus aplicaciones

ALCALÓFILOS

Se llaman alcalófilos aquellos organismos que viven en ambientes con pH por encima de 9 - 11 (9).

Ambientes

Los microorganismos alcalófilos se encuentran por lo general en hábitat muy básicos como lagos sódicos y suelos muy carbonatados, como los que se encuentran en Egipto, el Rift Valley de África y oeste de los Estados Unidos, pertenecen al género *Bacillus* y son también halófilos.

Adaptaciones

Los alcalófilos necesitan aislar el interior de la célula del medio alcalino exterior ya que algunas moléculas, especialmente las hechas a partir de ARN, se rompen con pH superior a 8. Como en el caso de otros extremófilos las células de los alcalófilos se protegen con extremoenzimas que se localizan cerca de la pared celular o por medio de secreciones externas.

A partir de los estudios realizados con especies alcalófilas de *Bacillus* se ha puesto de manifiesto que en vez de la habitual fuerza automotriz de protones, es un gradiente de Na^+ el que suministra la energía para el transporte y la movilidad, pero también se genera una fuerza motriz de protones responsable de la síntesis respiratoria de ATP (9).

Los alcalófilos además de la peptidoglicana tienen en su pared celular polímeros cargados nativamente, los cuales pueden reducir la densidad de la carga en la superficie de la célula y ayudar a estabilizar la membrana de la célula (26, 27, 28).

Ejemplos

Bacterias

Los procariotas mejor estudiados han sido bacterias aeróbicas no marinas, muchas de las cuales son especies de *Bacillus* (9).

Spirulina (cianobacterias), principal habitante de muchos lagos salados del Rift Valley, donde sirven de alimento a colonias inmensas de flamencos. Los excrementos de esos mismos flamencos al caer al agua de los lagos proporcionan un campo de cultivo fenomenal para, distintas especies de protistas (no cianobacterias) y especies de rotíferos.

Arqueas

Algunos microorganismos alcalófilos extremos son también halófilos y la mayor parte de estos pertenecen al dominio Archaea (9).

Aplicaciones

En la industria de detergentes se han aplicado enzimas alcalófilas, estos detergentes contienen aproximadamente 25% del total de una producción de estas enzimas. Recientemente las proteasas alcalinas son producidas por cepas de *Bacillus* alcalófilos y éstas son comercialmente utilizadas en procesos industriales. En la tabla 4 se muestran las principales enzimas de los alcalófilos y sus aplicaciones industriales (27).

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMOS ALCALÓFILOS	Amilasas y lipasas	Detergentes
	Proteasas, celulasas	Detergentes, alimentos
	Ciclodextrinas	Estabilización de sustancias volátiles
	Antibióticos	Industria farmacéutica

Tabla 4. Enzimas y otros metabolitos de alcalófilos y sus aplicaciones

ACIDÓFILOS

Hasta ahora se conocen muy pocos organismos capaces de vivir en medios con pH cercano a cero, sin embargo cuando los valores son más moderados hay un gran profusión. Se consideran acidófilos aquellos organismos que viven en medios con pH menor que 5 (9).

Ambientes

Los ambientes ácidos surgen naturalmente de actividades geoquímicas, como pueden ser la producción de gases sulfurosos de emanaciones volcánicas. También es posible crear ambientes ácidos debido a la propia actividad o metabolismo de los organismos (Río Tinto). Otro lugar donde es posible encontrar acidófilos es en las escorias de las minas, como por ejemplo en "The Iron Mountain Mine" en California del Norte donde vive un archaea *Ferroplasma acidarmanus* en disoluciones de pH 0.5 a 1.

Adaptaciones

Para soportar el pH bajo, los acidófilos emplean una gama de mecanismos por ejemplo: una superficie de membrana cargada positivamente, una alta capacidad tapón interna, sobre-expresión de H^+ que exporta las enzimas y sistemas únicos del transporte (26, 27, 29).

Ejemplos

Bacterias

En la tabla 5 se muestra algunas bacterias acidófilas y su asociación a ambientes con alta temperatura.

RELACIÓN CON LA TEMPERATURA	ESPECIES
Mesófilos	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>T. thiooxidans</i> , <i>T. prosperus</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> .
	<i>Acidiphilum cryptum</i>
	<i>T. acidophilus</i> , <i>T. organovorus</i> , <i>T. cuprinus</i> .
Termófilos moderados	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> , <i>Metrallosphaera sedula</i> .

Tabla 5. Relación de temperaturas de acuerdo al tipo de metabolismo

Arqueas

Ferroplasma acidarmanus, un acidófilo extremo que vive en ambientes de pH cercano a cero. Este archaea ha sido aislado y se estudia su mapa genético. Recientemente se añadieron dos nuevos procariotas a la escasa lista de organismos acidófilos; *Picrophilus óciame* y *Picrophilus torridus*, también termófilos y viven en solfaratas japonesas (30).

Eucariotas

Cyanidyum caldariuym, es capaz de vivir en pH cercano a cero, manteniendo el interior de la célula en un nivel casi neutro. *Acontium cylatium*, *Cephalosporium sp.*, y *Trichosporon cerebriae*, son tres eucariotas del Reino Fungi. Los últimos en añadirse a la lista son *Picrophilus oshimae* y *P. torridus* (31).

Aplicaciones

La acidez y la solubilidad del metal que producen las bacterias acidófilas desempeñan una función beneficiosa en minería. El sulfuro al combinarse con muchos metales, forma minerales muy insolubles, y muchas de las minas de donde se extraen dichos metales son sulfuros. Si la concentración del metal en la mina es baja, es posible que no sea económicamente rentable concentrar el mineral por medios químicos convencionales. En estas condiciones se suele aprovechar la lixiviación microbiana. Resulta especialmente útil en el caso del cobre, ya que el sulfato de cobre que se forma durante la oxidación de las minas de sulfuro HS⁻, se oxida espontáneamente en contacto con el aire. La mayoría de sulfuros metálicos también se oxidan espontáneamente, pero a mucha menor velocidad que el sulfuro libre. Bacterias como *Thiobacillus sulfolobus* puede actuar de catalizador y acelerar la tasa de oxidación de los minerales que contienen sulfuro, ayudando a la solubilización del metal (9).

Además de llevar a cabo procesos de desulfuración los acidófilos cuentan con enzimas de interés industrial, como se muestra en la tabla 6.

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMOS ACIDÓFILOS	Amilasas, glucoamilasas	Procesamiento de almidón
	Proteasas, celulasas	Componentes alimenticios
	Oxidasas	Desulfuración de carbón

Tabla 6. Enzimas de acidófilos y sus aplicaciones

XERÓFILOS

La pérdida de pequeñas fracciones de agua intracelular puede ser letal para muchas células, sin embargo existen ciertos organismos que pueden sobrevivir a una extrema desecación incluso durante largos periodos de tiempo. Los microbios especializados que pertenecen a los hongos, líquenes y algas tienen la capacidad de crecer en tales condiciones extremadamente secas. Estos organismos especializados se llaman los xerófilos (2,3).

Ambientes

Los organismos capaces de sobrevivir en condiciones de extrema sequedad van desde colonias de bacterias hasta colonias simbióticas de algas como hongos (líquenes). Generalmente las colonias de bacterias sobreviven mejor en las rocas expuestas al sol, pero en el caso de que las rocas hayan sido colonizadas previamente por líquenes las bacterias no pueden desarrollarse plenamente. Esto puede deberse a diferencias en la humedad o por ácidos orgánicos producidos por los líquenes.

Adaptaciones

Disacáridos como la sacarosa, protegen a las membranas y proteínas de la desecación estando relacionada la acumulación de estos disacáridos con la longevidad de ciertos organismos. Cuando se retira el agua de la capa de fosfolípidos de la membrana el disacárido actúa de forma que mantiene las membranas desecadas en un estado físico similar al de las membranas hidratadas.

Las bacterias absorben manganeso y hierro de la atmósfera y lo precipitan sobre la superficie de las rocas como una capa negra de óxido de manganeso o como una rojiza de óxido de hierro. Esta pequeña capa de precipitado también incluye partículas de arcilla cementadas que ayudan a las bacterias a combatir la desecación (9).

Ejemplos

Bacterias

Se conocen varios tipos de bacterias xerófilas como *Metallogenium* y *Pedomicrobium*. Su tamaño varía desde 0.4 a 2 micrómetros de largo por lo que son realmente muy pequeñas para producir ATP, ya que no cuentan con mitocondrias, utilizan la oxidación del manganeso y el hierro.

Eucariotas

Aunque los líquenes pueden soportar condiciones ambientales de extrema sequedad, generalmente no son tan resistentes como los microbios. El líquen se deseca muy rápidamente y puede perder hasta el 98% de su contenido en agua. Puesto que son los

primeros en colonizar las rocas tienen un papel muy importante en la formación de suelos atacando la superficie de la roca y arrancando fragmentos microscópicos de ésta (2, 3, 32).

Aplicaciones

Debido a que los estudios actualmente son muy limitados, el potencial biocatalítico de los microorganismos xerófilos y de sus enzimas todavía no se sabe.

METALÓFILOS

Los microorganismos que pueden crecer en la presencia de altas concentraciones de metales se llaman metalófilos.

Ambientes

Estos organismos, incluyendo varios miembros del género *Ralstonia*, colonizan los sedimentos, los suelos o las basuras industriales con alto contenido de metales pesados.

Adaptaciones

Una característica típica de *Ralstonia* (metal-resistente) es la presencia de grandes plásmidos que contienen genes para la múltiple resistencia a los metales pesados. Estos plásmidos confieren resistencia al Zn, Cd, Co, Pb, Cu, Ni y Cr.

Ejemplos

Ralstonia metallidurans, bacteria Gram-negativa no esporulada, se desarrolla en concentraciones milimolares de metales pesados tóxicos. Fue el primer aislado en 1976 del lodo de un tanque de decantación del cinc en Bélgica el cual había sido contaminado con metales pesados en elevadas concentraciones.

Aplicaciones

Puesto que la contaminación por metales pesados plantea una amenaza a la salud pública, a la industria pesquera y a la fauna, existe un interés creciente en desarrollar sistemas que puedan remover o neutralizan los efectos tóxicos de metales pesados en suelos, sedimentos y aguas residuales (1, 2, 3).

Muchos microorganismos, incluyendo *Ralstonia*, se podrían utilizar en la biorremediación de metales pesados. Estas bacterias también pueden ser utilizadas para inmovilizar ciertos metales pesados eficientemente. Esto sería posible debido a su capacidad para reducir dichos elementos a un estado redox mas bajo, produciendo metales con baja bioactividad. Las bacterias metalófilas exhiben un gran número de actividades enzimáticas que transforman ciertos metales por medio de reacciones como oxidación, reducción, mutilación y alquilación. Las transformaciones enzimáticas que conducen a la precipitación y a la inmovilización del metal estan siendo aplicadas a la biorremediación (33, 34).

PIEZÓFILOS (Barófilos)

Los microorganismos que gustan de las condiciones de alta presión (superior a 1 atm) para su desarrollo y crecimiento se llaman los piezófilos (conocidos antes como barófilos). Los organismos aislados a profundidades de alrededor de 400 m y utilizados en estudios que relacionan el crecimiento o la actividad metabólica con la presión, demuestran que son barotolerantes, se han obtenido barófilos en profundidades mayores entre 5.000 y 6.000 m;

mientras que a profundidades mayores de 10.000 m se han obtenido barófilos extremos (estrictos) (1, 2, 3, 11).

Ambientes

Se encuentran en las profundidades marinas. Los océanos son el principal hábitat para los piezófilos, incluyendo varios termófilos e hipertermófilos (35).

Adaptaciones

Un organismo que crece a presión elevada experimenta un aumento en la concentración de ácidos grasos no saturados presentes en la membrana plasmática. La velocidad de crecimiento relativamente lenta de los barófilos se debe, por una parte, a una combinación de efectos de la presión sobre los procesos bioquímicos de la célula y, por otra, a que estos organismos sólo crecen a bajas temperaturas, que causan una considerable disminución de la velocidad de las reacciones químicas.

La base molecular de piezófilos esta siendo investigada extensivamente, centrándose en aspectos de la regulación genética y en la función de ciertas proteínas aisladas en el fondo del mar.

Los factores de importancia global para el incremento de la estabilidad térmica son la superficie electrostática, la composición de aminoácidos (tal como una disminución de residuos termolábiles), interacciones entre cationes y anillos aromáticos entre otros (7, 36, 37).

Ejemplos

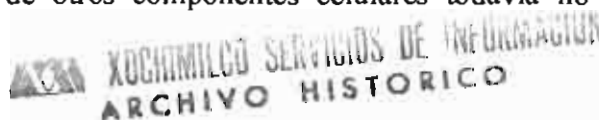
Los piezófilos se distribuyen entre los géneros *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Methanococcus*, *Pyrococcus* and *Thermus* (7, 35).

Aplicaciones

Las enzimas de los piezófilos que son estables a presiones elevadas han sido aisladas de una amplia variedad de microorganismos, la mayoría de los cuales son termófilos o psicrófilos con crecimiento óptimo arriba de una atmósfera (7, 35).

Durante el proceso y la esterilización de los materiales para alimentos, las altas presiones que superan los 100 MP se pueden utilizar para inducir la formación de geles, gránulos del almidón, desnaturalización y coagulación de proteínas; así como la transición de las fases de lípidos. El uso de la alta presión es utilizada para mejorar la conservación del sabor y del color de ciertos productos. Por lo tanto, las enzimas que pueden funcionar a presión y temperatura elevadas tienen grandes ventajas en procesos biotecnológicos (7, 35, 38, 39, 40).

Aunque existen muchos usos biotecnológicos posibles de los piezófilos y de sus enzimas, hay pocos usos prácticos conocidos. Esto es debido al hecho de que no es fácil cultivar este tipo de microorganismos bajo condiciones seguras de presión elevada. Por lo tanto, las características de estas enzimas y de otros componentes celulares todavía no se han investigado completamente (7, 35).



HALÓFILOS

Se llaman halófilos a aquellos organismos que requieren cierta concentración de NaCl para su desarrollo y crecimiento. Pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren, en la tabla 7 se muestran las distintas concentraciones de NaCl que necesitan los halófilos para crecer.

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

Tabla 7. Clasificación de halófilos en función de la salinidad

Ambientes

La ecología y diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada. Muchos de estos microorganismos han sido aislados de hábitat que presentan alta salinidad ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta (41). Los ambientes extremadamente salinos son raros, la mayoría se encuentran en zonas calientes y secas, como son lagos salinos, suelos salados y alimentos salados principalmente. Los lagos salinos como el Gran Lago Salado de Utah y el Mar Muerto. Las salinas marinas son también buenos hábitat para los procariotas halófilos extremos. Se han aislado halófilos extremos en alimentos con alta concentración de sal, como salmueras, salsa de soya y pescado (9).

Adaptaciones

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (42).

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación. El primero de ellos, denominado mecanismo “*salt-in*” es típico de Arqueas y *Haloanaerobiales* (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- . El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas (43).

El segundo mecanismo conocido como “*salt out*”, es el que utilizan las bacterias tanto halófilas como no halófilas, además de las arqueas metanógenas halófilas moderadas. Estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos

orgánicos de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan **solutos compatibles** (44). Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede, por ejemplo cuando las bacterias se cultivan en un medio mínimo (45). Los principales solutos compatibles descritos a la fecha son: aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína (46, 47, 48, 49, 50).

Ejemplos

Bacterias

La mayoría de las bacterias halófilas, Gram positivas y Gram negativas; aerobias o anaerobias facultativas son consideradas como miembros de los géneros: *Halomonas*, *Delega*, *Volcaniella*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halovibrio* y *Chromobacterium* (41).

Arqueas

Las arqueas halófilas se distribuyen en seis géneros principales, de los cuales cuatro incluyen miembros que crecen a pH neutro: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* y *Halococcus*. Los miembros pertenecientes a los géneros *Natronobacterium* y *Natronococcus* requieren condiciones alcalinas para su crecimiento (51).

Dentro de las especies más estudiadas, se puede mencionar, *Halobacterium halobium*, principal habitante del Gran Lago Salado de Utah en Estados Unidos, se adapta a la alta concentración de sal y escasez de oxígeno (es aerobia), desarrollando una proteína en la membrana llamada bacteriorodopsina; esta proteína contiene pigmentos que dan un color púrpura a la membrana y su capacidad de reaccionar ante la luz crea un gradiente protónico en la membrana, permite la síntesis del ATP, importar iones de potasio o exportar los del sodio; *Halobacterium salinarum*, concentra cloruro de potasio en su interior para evitar la deshidratación. Su crecimiento óptimo se da a 50°C, un pH 7.2 y concentraciones de NaCl de 3.5 a 4.3 M. también utiliza la bacteriorodopsina (52).

Eucariotas

Hay un amplio rango de grupos taxonómicos eucariotas, aunque muy pocos han sido estudiados en cultivos. *Dunaliella salina*, vive en lagos salados en los que muchas veces es la única alga presente. Sintetiza altas concentraciones del glicerol intracelular 7 M (56%) como soluto compatible para mantener el balance osmótico.

Actinomicetos

El número de actinomicetos halófilos que se conocen actualmente es muy reducido, en los últimos años se han reportado muy pocos géneros de actinomicetos halófilos; de modo que el estudio de la biología de actinomicetos halófilos incluyendo su aislamiento identificación y caracterización empieza a mostrar la diversidad de estos microorganismos en varias partes del mundo.

En 1975 se dio a conocer por vez primera el reporte de un actinomiceto capaz de crecer en altas concentraciones de salinidad, *Actinopolyspora halophila*, (53). Dieciséis años más

tarde, en 1991, se reporta el segundo actinomiceto halófilo, *A. mortivallis* (54). En los años siguientes y hasta 2003 se reportaron 13 especies más, existiendo hasta la actualidad 15 miembros conformando este grupo. A continuación se presenta de manera breve las principales características de los actinomicetos halófilos reconocidos a la fecha. Tabla 8.

MICROORGANISMO	PROCEDENCIA	CRECIMIENTO ÓPTIMO % NaCl
<i>Actinopolyspora halophila</i>	Contaminante en medio con 25% de NaCl. Canadá	10
<i>A. mortivallis</i>	Suelo salado. Valle de la muerte, California	5 - 25
<i>A. iraquensis</i>	Suelo salino. Iraq	10 - 15
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Suelo salado. Alicante, España.	10
<i>Nocardiopsis halophila</i>	Suelo salino. Iraq	20
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	Salinas de Kunsan. Korea	10
<i>Nocardioides aquaticus</i>	Lago salado Ekho. Antártida	1-6
<i>Friedmanniella lacustris</i>	Lago salado Ekho. Antártida	4
<i>Streptimonospora salina</i>	Lago salado Oeste de China	15
<i>Saccharomonospora halophila</i>	Suelo pantanoso Kuwait	10
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10
<i>Streptomonospora alba</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10 - 15
<i>Prauserella halophila</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10
<i>Prauserella alba</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	Suelo salino. Xinjiang, China	10

Tabla 8. Actinomicetos halófilos aislados en diferentes partes del mundo

Aplicaciones

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, debido a que no solo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. A continuación se describen algunas de las más interesantes aplicaciones de estos microorganismos.

Solutos compatibles. Las bacterias halófilas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles, y que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial ya que poseen un alto

poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad. También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática (biosensores, PCR, etc.) y en la industria farmacéutica y cosmética. Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como la lactato deshidrogenasa y la fructoquinasa. Así, en diversos estudios en los que se comparó el efecto protector sobre estas enzimas de distintos solutos compatibles (glicina betaina, trealosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares), se puso de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores al calor y los procesos de congelación y descongelación (44, 55, 56).

Biodegradación de residuos. Las bacterias halófilas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos. Constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas. Esto sucede por ejemplo en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas (57).

Enzimas. Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad. La mayoría de las enzimas halófilas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado a la fecha provienen de bacterias halófilas moderadas. Así se han descrito varias hidrolasas de interés industrial de tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y 5'- nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas. En la tabla 9 se ejemplifican las enzimas mas importantes producidas por halófilos (58).

	ENZIMA	APLICACIÓN
MICROORGANISMO HALÓFILOS	Proteasas	Síntesis peptídica
	Deshidrogenasas	Biocatálisis en medio orgánico

Tabla 9. Enzimas de microorganismos halófilos y sus aplicaciones

Alimentos fermentados. Las bacterias halófilas también tienen diversas aplicaciones en el campo de la alimentación. Así en la elaboración de la salsa de soya intervienen determinadas especies del género *Tetragenococcus*. Los granos de trigo y soya se resuspenden en agua con NaCl al 19% y se deja durante 9 meses en oscuridad. *T. halopila* se emplea como indicador de la fermentación pudiendo alcanzar una densidad de 10^8 UFC/ml en la salsa de soya, que contiene una concentración aproximadamente 3M de NaCl (59).

Polímeros. Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolera. Gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así su tensión superficial. Las bolsas de

petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros (60).

MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS EN MÉXICO

Las bacterias halófilas al pertenecer al grupo de microorganismos extremófilos capaces de vivir en ambientes salinos ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la biotecnología. Actualmente está creciendo el interés por conocer mejor la gran diversidad de microorganismos halófilos, tal es el caso de los actinomicetos halófilos; a pesar de que su grupo esta conformado por pocas especies cada vez es mayor el número de especies descritas.

Los actinomicetos halófilos representan un reducido grupo de microorganismos que al combinar su capacidad productora con su resistencia a las condiciones extremas de salinidad, resultan microorganismos de gran interés como fuente productora de productos industriales tanto en el campo, farmacéutico, cosmético y biotecnológico.

Actualmente, en la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco se está realizando un proyecto experimental titulado "*Caracterización de actinomicetos aislados a partir de ambientes hipersalinos*". En dicho proyecto se realizan muestreos en ambientes salinos extremos de distintas zonas geográficas de México, tales como: suelos salados, lagunas saladas, salinas costeras y zonas desérticas, esta investigación tiene como objetivo conocer la diversidad de los actinomicetos halófilos en este país.

A la fecha ha sido posible conformar una colección de 60 cepas de actinomicetos halófilos aislados provenientes de salinas y lagunas costeras localizadas en la vertiente del océano pacífico en México. Estas cepas han sido caracterizadas por medio de un estudio fenotípico y molecular.

La caracterización de los actinomicetos halófilos aislados en México, demuestra que tienen un alto porcentaje de similitud con dos de los géneros de actinomicetos que incluyen especies halófilas. Los géneros encontrados por secuenciación del gen 16S muestran una distribución geográfica diferente, siendo el género *Actinopolyspora* predominante en el norte del país mientras que el género *Saccharomonospora* predomina en el sur del país (61, 62).

En la figura 1 se muestran las características morfológicas de algunas cepas representativas donde se distinguen dos grupos:

Grupo *Saccharomonospora*: Colonias de color oscuro, azul a grisáceo, verde a negro y en algunos casos blancas; con textura suave y fijas en el agar, presentan micelio aéreo y vegetativo bien desarrollado. La tinción de Gram muestra micelio ramificado con presencia de esporas. Las imágenes de microscopía electrónica, permiten observar la presencia de micelio ramificado con esporas solas que nacen del micelio. Fig. 1 (A, B y C).

Grupo *Actinopolyspora*: Colonias pequeñas blancas, convexas de apariencia rugosa con formación de micelio extenso de color blanco, en el lado reverso del cultivo en agar las colonias son de color amarillo pardusco. La tinción de Gram permite observar micelio

ramificado con presencia de esporas en cadena. Al microscopio se observan filamentos ramificados que no fragmentan con formación de cadenas de esporas de forma oval a cilíndrica con superficie lisa. Figura 1 (C, D y F).

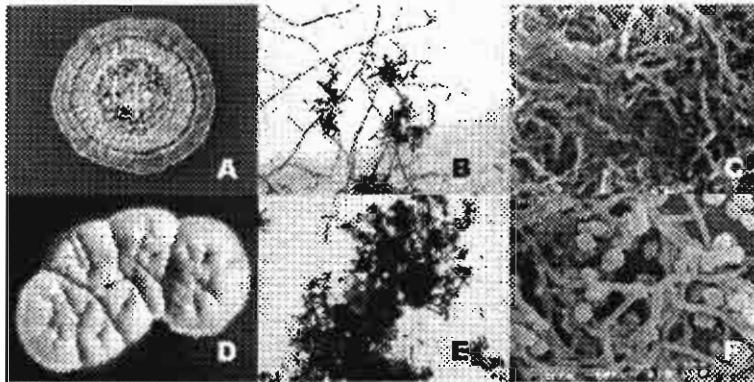


Figura 1. Morfología colonial, microscópica y microscopía electrónica de actinomicetos halófilos. A, B y C; Grupo *Saccharomonospora*. D, E y F; Grupo *Actinopolyspora*.

CONCLUSIONES

Los ambientes hipersalinos son comunes en diversos puntos de México. Debido a que nuestro país presenta una enorme diversificación de características climatológicas y ambientales, resulta favorable para la obtención de nuevas fuentes biológicas proveedoras de enzimas y metabolitos. Tal es el caso de los microorganismos extremófilos, de los cuales los actinomicetos halófilos son una importante alternativa, aunque actualmente no existen reportes acerca de la obtención de productos a partir de estos microorganismos, cada vez son más los reportes acerca de nuevas especies, así como su distribución en diversas partes del mundo.

AGRADECIMENTOS

Ninfá Ramírez Durán actualmente es alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Matricula: 201383665 y es becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 141507.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MacElroy R.D. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6: 74-75.
2. Madigan M.T., Mairs B.L. 1997. Extremophiles. *Scientific American*, 276: 82-87.
3. Rothschild L.J., Mancinelli R.L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409: 1092-1101.
4. Rossi M., Ciaramella M., Cannio R., Pisan F.M., Moracci M., Bartolucci S. 2003. Meeting Review (Extremophiles 2002). *Journal of Bacteriology*, 185: 3683-3689.
5. Adams M. W., Perler F.B., Kelly R.M. 1995. Extremozymes: Expanding the limits of biocatalysis. *Bio/technology*, 13: 662-668.

6. Haki G.D., Rakshit S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*, 89: 17-34.
7. Yano J.K., Poulos T.L. 2003. New understandings of thermostable and piezostable enzymes. *Curr Opin Biotechnol*, 14: 360-365.
8. Van Den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinión in Microbiology*, 6: 1-6.
9. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock Microbiología de los microorganismos. Ed. Pearson-Prentice Hall. Tenth edition.
10. Niehaus F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 711-729.
11. Gomes J., Steiner W. 2004. The biocatalytic potencial of extremophiles and extremozymes. *Food technol Biotechnol*, 42: 223-235.
12. Seckbach, J. 1994/5. The first eukaryotic cells-acid hot-spring algae. *J Biol Physics*, 20: 335-345.
13. Cary S.C., Shank T., Stein J. 1998. Worms bask in extreme temperatues. *Nature*, 39: 1545-546.
14. Irwin J.A., Baird A.W. 2004. Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal*, 57 (6).
15. Bowman, J.P., Mccammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., Mcmeekin T.A. 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3068-3078.
16. Grossmann S., Gleitz M. 1993. Microbial responses to experimental sea ice formation: implications for the establishment of Antarctic sea ice communities. *J Exp Mar Biol Ecol*, 173: 273-289.
17. Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 253-261.
18. Deming J.W. 2002. Psicrofilos and polar regions *CurrOpin Microbiol*, 5: 301-309.
19. Margesin R., Feller G., Gerday C., Russell N. 2002. Cold-Adap-ted Microorganisms: Adaptation Strategies and Biotechnological Potential. En: The Bitton Ed., Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol.2, G. John Wiley & Sons, New York, pp 871-885.
20. Feller G., Gerday C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nat Rev Microbiol*, 1: 200-208.

21. Georlette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., Marx J.C., Sonan G., Feller G., Gerday C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol. Rev*, 28: 25-42.
22. Prescott, G.W. 1978. How to know the freshwater algae. 3rd ed. Wm. C. Brown, Dubuque, Iowa.
23. Demirjian D.C., Moris-Varas F., Cassidy C.S. 2001. Enzymes from extremophiles, *Curr Opin Chem Biol*, 5: 144-151.
24. Eichler J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv*, 19: 261-278.
25. Irgens R.L., Gosink J.J., Staley J.T. 1996. *Polaromonas vacuolata* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, marine, gas vacuolate bacterium from Antarctica International. *Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 822-826.
26. Wiegel J., Keubrin U.V. 2004. Alkalitermophiles. *Biochem Soc Trans*, 32: 193-198
27. Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 735-750.
28. Ma Y., Xue Y., Grant W.D., Collins N.C., Duck-worth A.W., van Steenberg R.P., Jones B.E. 2004. Alkalimonasamylolyticagen. nov., sp. nov., and Alkalimonasdelamerensis gen. nov., sp. nov., novel alkaliphilic bacteria from soda lakes in China and East Africa. *Extremophiles*, 8: 193-200.
29. Kar N.S., Dasgupta A.K. 1996. The possible role of surface charge in membrane organization in an acidophile, Indian. *J Biochem Biophys*, 33: 398-402.
30. Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M., Banfield J.F. 2000. An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science*, 287: 1796-1799.
31. Schleper C., Pühler G., Kühlmorgen B., Zillig W. 1995. Life at extremely low pH. *Nature*, 375: 741-742.
32. Cavicchioli R., Thomas T. 2000. Extremophiles. En: J. Lederberg, ed. Enciclopedia de la microbiología 2^a. Edición vol 2 pp 317-337. Prensa académica San Diego.
33. Mergeay M., Monchya S., Vallaeyts T., Auquier V., Benotman A., Bertin P., Taghavi S., Dunn J., van der Lelie D., Wattiez R. 2003. Ralstoniametallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev*, 27: 385-410.
34. Valls M., de Lorenzo V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev*, 26: 327-338.

35. Abe F., Horikoshi K. 2001. The biotechnological potential of piezoophiles. *Trends Biotechnol*, 19: 102–108.
36. Pledger R.J., Crump B., Baros J.A. 1994. A barophilic response by two hyperthermophilic, hydrothermal vent Archaea: an upward shift in the optimal temperature and acceleration of growth rate at supra-optimal temperatures by elevated pressure. *FEMS Microbiol Ecol*, 14: 233-242.
37. Hei D.J., Clark D.S. 1994. Pressure stabilization of proteins from extreme thermophiles. *Appl Environ Microbiol*, 60: 932-999.
38. Hayashi R. 1996. Use of High Pressure in Bioscience and Biotechnology. En: R. Hayashi, C. Balny (Eds.), High Pressure Bioscience and Biotechnology. Elsevier, pp 1–6.
39. Ludwig H., Scigalla W., Sojka B. 1996. Pressure and Temperature Induced Inactivation of Microorganisms. En: J. L. Markley, D. B. Northrop, C. A. Royer (Eds.), High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology, Oxford University Press, New York, pp 346-363.
40. Mozhaev V.V., Bec N., Balny C. 1994. Pressure effects on enzyme reactions in mainly organic media: α -chymotrypsin in reversed micelles of Aerosol OT in octane, *Biochem Mol Biol Int*, 34: 191-199.
41. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 504-544.
42. Russell N.J. 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. En: R.H. Vreeland y L.I. Hochstein (eds). The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press. pp. 163-210
43. Dennis P.P., Shimmin L.C. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61: 90-104.
44. Brown A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol Rev*, 40: 803-846.
45. Galinski E.A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. En R.K. Poole (ed), Advances in Microbial Physiology. London. Academic Press. pp. 273-329.
46. Galinski E.A., Trüper H.G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 15: 95-108.
47. Belitsky B.R., Brill J., Bremer E., Sonenshein A.L. 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 183: 4389-4392.
48. Larsen P.I., Sydnes L.K., Landfald B., Strom A.R. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol*, 147: 1-7.

49. Nyysola A., Kerovuo J., Kaukinen P., Von Weymarn N., Reinikainen T. 2000. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J Biol Chem*, 275: 22196-22201.
50. Galinski E.A., Pfeiffer H.P., Trüper H.G. 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. *Eur J Biochem*, 149: 135-139.
51. DasSarma S. 1995. Halophilic archaea: An Overview. En: DasSarma S., Fleischmann E.M (ed). *Archaea a laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory Press. pp 3-11.
52. Javor B.J. 1989. *Hypersaline environments. Microbiology and biogeochemistry*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
53. Gochnauer M.B., Leppard G.G., Komarata P., Kates M., Novitsky T., Kushner D.J. 1975. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *J Microbiol*, 21: 1500-1511.
54. Yosida M., Matsubara K., Kudo T., Horikoshi K. 1991. *Actinopolyspora mortivallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol*, 15-20.
55. Louis P., Trüper H.G., Galinski E. 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41: 648-688.
56. Margesin R., Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 73-83.
57. Oren A., Guverich P., Azachi M., Henis Y. 1993. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations, En E. Rosenberg (ed). *Microorganisms to Combat Pollution*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 263-274.
58. Kamekura M., Hamawata T., Onishi, H. 1992. Application of halophilic nuclease H from *Micrococcus varians* subs. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol*, 44: 994-995.
59. Röling W.F.M., Van Verseveld H. 1996. Characterization of *Tetragenococcus halophila* populations in Indonesian soy mash (kecap) fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 62: 1203-1207.
60. Ventosa A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria, En F. Rodriguez-Valera (ed), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. pp. 71-84.
61. Serrano, J.A., Sandoval, H., Ramírez, N., Ventosa, A. 2003. Método simplificado para el estudio morfológico por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de actinomicetos halófilos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 3: 42-46.

62. Ramírez N., Sandoval A.H., Serrano J.A. 2004. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 24: 12-23.

Amplification of the specific insertion in the 23S gene, as a criterion of purity in preparations of actinomycetes DNA

Ramírez-Durán N., Ramírez-Saad H., Melgoza-Contreras L.M., Sandoval H.
Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad A. Metropolitana-Xochimilco
Calz. Del Hueso 1100. México, D.F. CP 04860. México

INTRODUCTION

The Actinomycetes conforms a group of Gram-positive filamentous bacteria. They are microorganisms of cosmopolitan distribution, prevalent in tropical and subtropical areas. Some of the actinomycetes species have great biotechnological importance, because their capacity to produce diverse types of useful metabolites in the pharmaceutical industry, as steroids and antibiotics. On the other hand, some species of this group are pathogens for the human being and the animals, producing lesions in diverse organs. (Serrano and Sandoval, 1992). The base composition of DNA of all genus of the actinomycetes falls inside a relatively narrow limit from 63 to 78% GC, calling to this group of high content in G + C (Madigan *et al*, 2003).

The molecular biology is having valuable applications in the field of medicine and pharmaceutical industry among many others, some of the basic techniques include methods to obtain specific and uniform sequences of DNA, or DNA segments of an appropriate size for the analysis and the manipulation of nucleic acids allowing identifying specific segments of DNA and RNA.

In 1992, Roller *et. al.*, determined the presence of a specific insert characteristic of Gram positive bacteria with high G + C (HGC), considered as a phylogenetic marker of approximately 100 base pairs located inside the rRNA 23S gene. (Roller, *et al* 1992). One of the molecular techniques that allows to assure that a microorganism is one of high content of G + C (HGC), is determining the presence of this insert located in the central part of the rRNA 23S gene.

The analysis of the rRNA 16S is one of the most appropriate to establish phylogenetic relationships in prokaryotic microorganisms because it possesses a greater number of differences in their nucleotides due to their size (1550 bp). The use of the analysis of the rRNA 16S offers multiple applications from the molecular until the environmental level, mainly in studies related to evolution (Murray, *et. al* 1995).

The isolation and the amplification of nucleic acids is nowadays an important technique in most of the laboratories of biological investigation, for what is critical to assure the quality and purity of the DNA for amplification reactions.

This paper is addressed to investigators whose work is related with the study of Gram-positive bacteria with HGC, in which is proposed a rapid method to verify the purity of DNA by means of a previous amplification of the insert of the 23S gene.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

Actinomycetes: *Nocardia asteroides*, *Dermatophilus congolensis*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomonospora halophila*.

Bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Extraction of DNA

The extraction of the DNA was carried out using the "Wizard Genomic DNA Purification Kit" (Promega A1120).

Mixtures of DNA

With the obtained DNA of the different strains they were carried out the following mixtures in proportion 1:1

N.asteroides + *S.aureus*

D.congolensis + *E.coli*

E.coli + S.aureus

S.aureus + E.coli + M.luteus

Amplification of the insert of the rRNA 23S in the mixtures of DNA

It was carried out the amplification of the insert of the 23S gene using the method of the polymerase chain reaction (PCR). The sequences of utilized primers were:

23 INSf: 5' - (AC) A (AGT) GCG TAG (AGCT) CG A (AT) G G - 3'

23 insR 5' - GTG (AT) CG GTT T (AGCT) (GCT) GGT A -3'.

The reaction was carried out using Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B (Promega M1661). The utilized parameters to make the reaction were: a 5 minutes pre-denaturation cycle (94°C); denaturation, 45 seconds at 94°C; annealing 45 seconds at 46°C and extension 50 seconds at 72°C. After 29 cycles a final cycle of post-extension for 5 minutes at 72°C. The amplified fragments were observed by an agarose gel electrophoresis at 3%, (Maniatis and Cabbage, 1982).

The obtained amplicon of eubacteria has a size of +/- 250 bp and the obtained of actinomycetes is of +/- 350 bp.

Amplification of the rRNA 16S (Burlage, 1998)

It was carried out the amplification of the gene rRNA 16S using the method of the polymerase chain reaction (PCR). The sequences of utilized primers were:

8f: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG and

1492r: TACGGYTACCTTGTTACGACTT (Sigma Genosys).

The reaction was carried out using Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B (Promega M1661). The utilized parameters of reaction were: a 5 minutes cycle of pre-denaturation at 94°C; denaturation 30 seconds at 94°C; annealing 20 seconds at 52°C; extension 90 seconds at 72°C. After 34 cycles a final cycle of post-extension for 7 minutes at 72°C. The amplified fragments were checked by an agarose gel electrophoresis at 1%.

Purification of the product of PCR

For the purification of products of the PCR 16S, the system Microcon PCR Filter Units was used (Millipore C 7480), placing the product of PCR, added of 400 μ l of TE-buffer in the "Microcon PCR filter", followed by 15 min. of centrifugation at 2000xg; later the filter was inverted and it was added 20 μ l of TE-buffer and finally centrifuged during 2 min. at 2000xg. The products of the reaction of amplification of 16S were checked by an agarose gel electrophoresis at 1%.

Sequence

The products of purified PCR of the mixtures: *N.asteroids* with *S.aureus*, *D.congolensis* with *E.coli* and *S.aureus* with *E.coli* and *M.luteus*; were sequenced at the Service of Sequence of the Institute of Cellular Physiology, of the Universidad National Autónoma de México. The obtained data were compared with the sequences deposited in the GeneBank.

RESULTS

In this paper the simulation of the isolation of actinomycetes DNA was made with taxonomic purposes, but assuming that the preparation had been contaminated with some other bacteria during the purification (*S.aureus* and *E.coli*).

When the amplified 16S gene is observed in an electrophoresis in agarose, it seems pure, however it is product of the amplification of the DNA of two different microorganisms, an actinomycete and a contaminating bacteria (Fig 1).

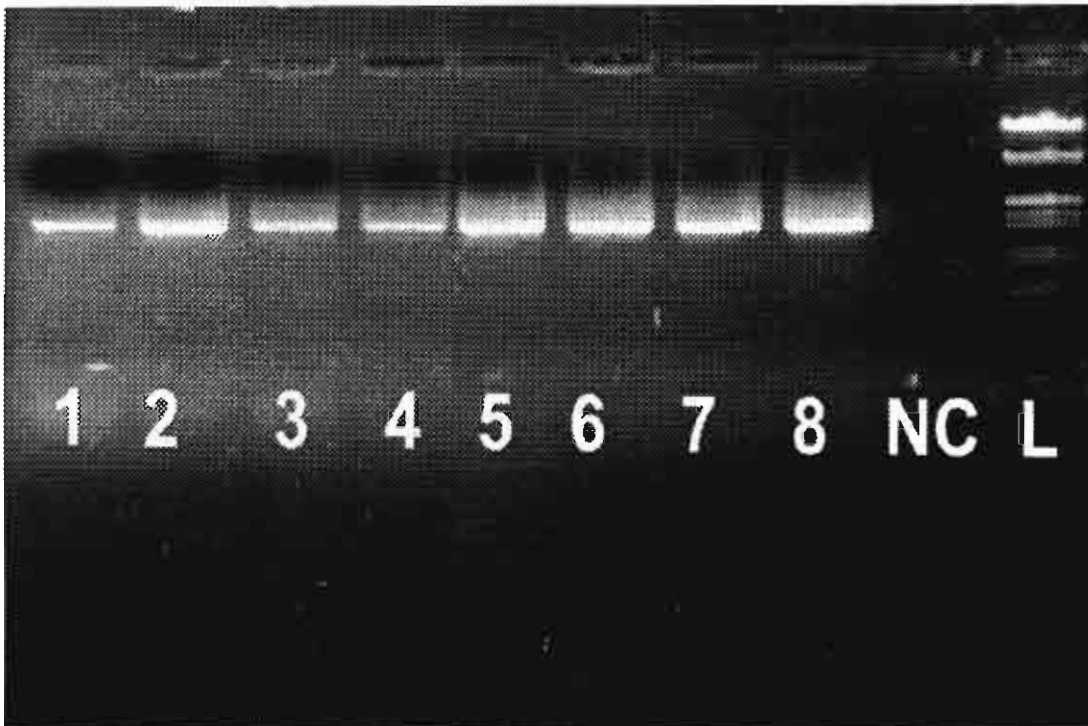
If the samples of purified DNA are amplified for the insert, in the 23S gene, characteristic of the actinomycetes, the image that is obtained in the electrophoresis is of a single band of 350 bp approximately when the DNA of actinomycete is free of contamination, but in the case of having contaminated DNA then two bands are observed, one of 250 bp approximately that corresponds to the contaminant and another of 350 bp approximately that belongs to the actinomycete (Fig. 2).

Additionally, when the products of amplification of the 16S gene of the mixtures were sequenced and the results compared with sequences deposited in the GeneBank, surprisingly only the contaminant bacteria were identified (Table 1).

Mixtures	Identification	Similarity (%)	Ratio of coincident bases
<i>N.asteroides</i> + <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	98	828/840
<i>D.congolensis</i> + <i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	98	811/820
<i>S.aureus</i> + <i>E.coli</i> + <i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	98	802/812

Table 1. Microorganisms identified by sequencing of DNA mixtures of actinomycetes with eubacteria

Figure 1. Amplification of the rRNA 16S



- 1.- *Nocardia asteroides***
- 2.- *Saccharomonospora halophila***
- 3.- *Staphylococcus aureus***
- 4.- *Escherichia coli***
- 5.- *N. asteroides* + *S.aureus***
- 6.- *Dermatophilus congolensis* + *E. coli***
- 7.- *E. coli* + *S. aureus***
- 8.- *S. Aureus* + *E. coli* + *M. luteus***
- NC.-NEGATIVE CONTROL**
- L.- LADDER**

Figure 2. Amplification of the insert of 23S gene



L.- LADDER

1.- *Nocardia asteroides*

2.- *Saccharomonospora halophila*

3.- *Staphylococcus aureus*

4.- *Escherichia coli*

5.- *N. asteroides* + *S.aureus*

6.- *Dermatophilus congolensis* + *E. coli*

7.- *E. coli* + *S. aureus*

8.- *S. aureus* + *E. coli* + *M. luteus*

L.- LADDER (100 - 1000 bp)

CONCLUSIONS

Amplification of a specific insert located in the central part of the rRNA 23S gene, characteristic of Gram positive bacteria with high G+C (HGC), could be, either, a good criterion of purity of a DNA preparation to be used in a further molecular manipulation as well as a molecular technique that allows to assure the presence of a microorganism of this kind (HGC), in any substrate.

ACKNOWLEDGEMENTS

Ninfa Ramírez Durán is student of Doctorado en Ciencias Biológicas in the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Registry number: 201383665 and she is fellow in the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Registry number: 141507.

BIBLIOGRAPHY

MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., PARKER J. (2003) Brock Microbiología de los microorganismos. Ed. Pearson-Prentice Hall. Tenth edition.

BURLAGE R. S., ATLAS R., STAHL D. GEESEY G. & SAYLOR G. (1998) Eds. Techniques in Microbial Ecology. Oxford University Press, New York pp327-334

MURRAY, P., BARON, E., PFALLER, M., TENOVER, F., y YOLKEN, R. (1995). Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition. ASM Press

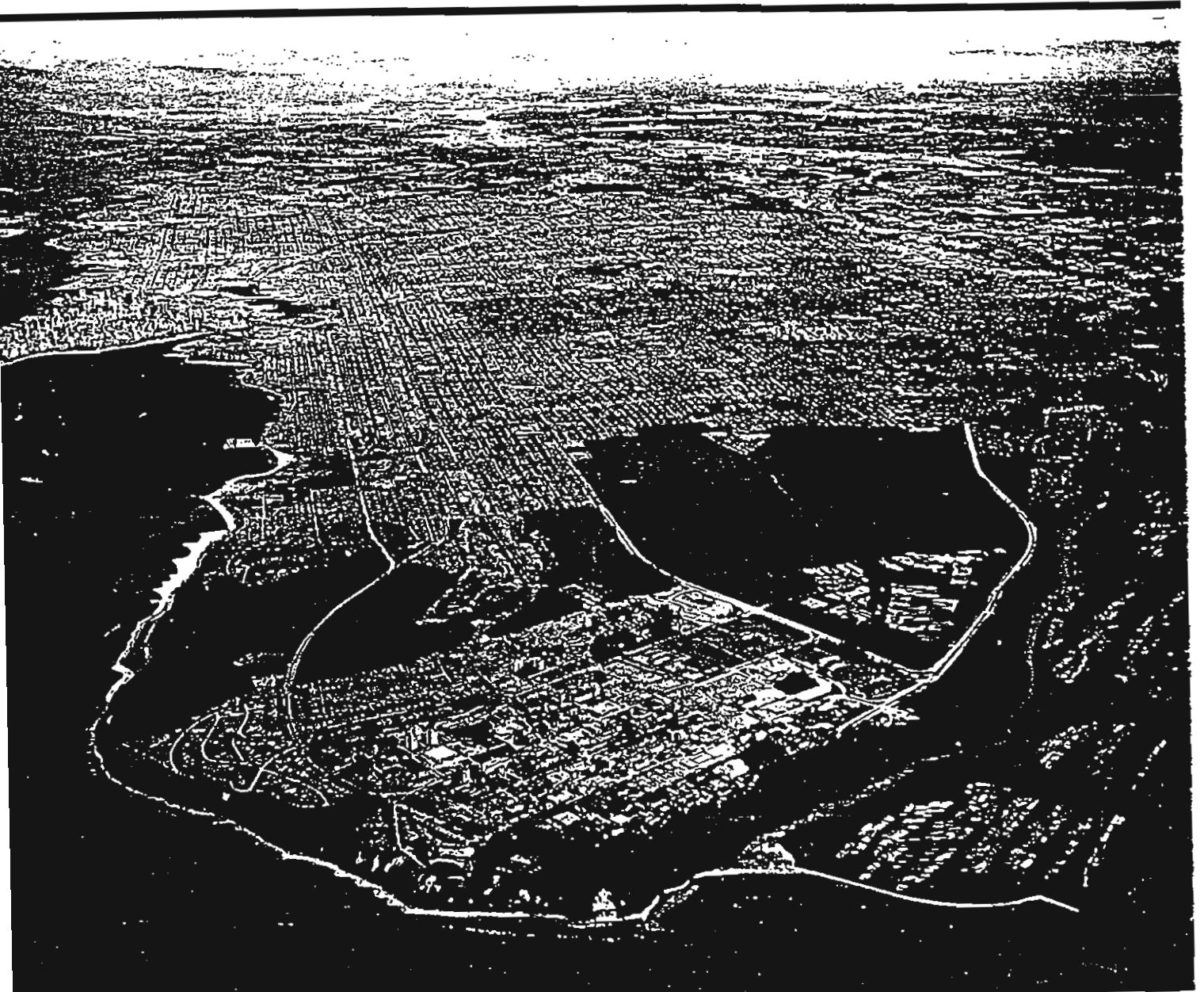
ROLLER C., LUDWIG W., SCHLEIFER KH. (1992). Gram-positive bacteria with a high DNA G + C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. J. Gen. Microbiol. **138**: 1167-1175.

SERRANO J. A., SANDOVAL H. (1992). Eds. Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetos Patógenos. Talleres gráficos ULA Mérida Venezuela pp. 27 - 256



PROGRAM & ABSTRACTS

12th International Symposium
on the Biology of Actinomycetes



The University of British Columbia

VANCOUVER, CANADA

P.066

Isolation of Truly Halophilic Actinomycetes:

Ramirez N., Marquez-MC., Castro K., Sandoval H. and Ventosa A. Depto. de Sistemas Biológicos, Universidad A. Metropolitana-Xochimilco, Mexico, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain

Current investigations are working on the isolation, taxonomic characterization, ecology and physiology of halophilic microorganisms, particularly studies have been reported that reveal the existence of actinomycetes in hypersaline ambients. The halophilic microorganisms are those that require certain concentration of salt for their growth while the halotolerant are non-halophilic microorganisms that tolerate the salt but they can grow without it, both are classified according to their requirements of salt for their growth in the following way:

Moderate Halophilic: 1-15% Moderate Halotolerant: 0-18%
Extreme Halophilic: 16-30% Extreme Halotolerant: 0-30%

They were carried out samplings in different hypersaline ambients of the south of Spain, such as: Cristina Island, Huelva; Cadiz; Punta Bacuta, Aragonese Islands and Arinaga as well as Utah (USA). Three different selective media were used for the actinomycetes isolation; the media were supplemented with a solution of salts with 8% of NaCl as final concentration. The selection of isolates was based on the colonial and microscopic morphology (Gram stain), taking as main approach the presence of gram-positive ramified mycelium characteristic of the actinomycetes. The saline profiles of obtained strains was performed in the same isolation media, varying the concentration of salt in the following range: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30%.

According to the approach of selection of strains and saline requirements, we obtained a total of 34 actinomycete strains (28 halotolerant and 6 halophilic), which grouped in the following way: marine halotolerants (4); moderate halotolerants (24); moderate halophilics (5) and extreme halophilic (1). The pH ranges and concentrations of salt in the sampling places were: for the halotolerant actinomycetes, pH=6.9-8.4; % salt=5.42-18.83; for the halophilic actinomycetes, pH=7.1-8.12; % salt=8.71-11.7.

The isolation and study of the biology of Actinomycetes that are able to live under extreme conditions allow us to obtain new resources that can contribute with important biotechnological and industrial applications.

MARQUEZ, M. C. et al. "A taxonomic Study of Heterotrophic and Halophilic and Non-halophilic Bacteria from a Solar Altern". Journal of General Microbiology, 81987) 133 p. 45-56.

MAHMOUD, A. et al. "Nocardiopsis halophila sp. nov., a New Halophilic Actinomycete Isolated from Soil". International Journal of Systematic Bacteriology, July 1994, p. 474-478.

SHENG, R. J. et al. "Actinopolyspora iraqiuisis sp. nov., a New Halophilic Actinomycete Isolated from Soil". International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1994 p. 759-763.

P.067

Molecular Detection of Targeted Actinomycetes - Potential and Limitations

Evans, J.A., Franco, C.M.M., McClure, N., Gürtler, H.
Biotechnology, Flinders University, Adelaide, Australia, and Health Care Discovery, Novo-Nordisk, Bagsvaerd, Denmark
A nested-PCR system based on signature sequences in the 16SrDNA genes was developed to detect the presence of the selected target actinomycetes in soil samples in order to optimise isolation of the targeted genus. This assay system was used to test a range of soil samples representing diverse geographical and climatic regions of Australia. High molecular weight DNA was extracted from the soils, from which a PCR product of 16SrDNA could be obtained. Each soil sample was assayed in triplicate.

This screening protocol yielded positive results from soil samples with a wide geographic distribution. Selected PCR products were cloned in and sequenced to confirm validity of the assay. Analysis of clones revealed sequence variation within and between sites, which may be due to the presence of different species or variants of the targeted organism, or due to artefacts generated via cloning. The latter was evaluated by cloning and sequencing of the prototype culture on which the probe sequence was based. Results indicated that significant variation can be generated.

P.068

Improved isolation of thermophilic actinomycetes

Zhang, X.¹, Kurtböke, I.², Franco C.M.M.
¹Biotechnology, School of Medicine, Flinders University, Bedford Park, SA 5042, Australia, ²ExGenix Operations Pty. Ltd., 576 Swan Street, Richmond, Victoria 3121, Australia

In this study we have devised a novel, efficient techniques to isolate thermophilic actinomycetes from both their natural overheated environments, as well as from soils.

Thermo-enrichment of soils with sterilized wet eucalyptus compost at 45°C for 21 days yielded best results. A total of 38 soil samples collected from different locations across Australia yielded 152 different thermophilic actinomycetes. The distribution of the isolates was: thermophilic *Streptomyces* 62%; *Thermomonospora* 17%; *Thermoactinomyces* 3%; *Saccharomonospora* 5%; and other unidentified genera 13%.

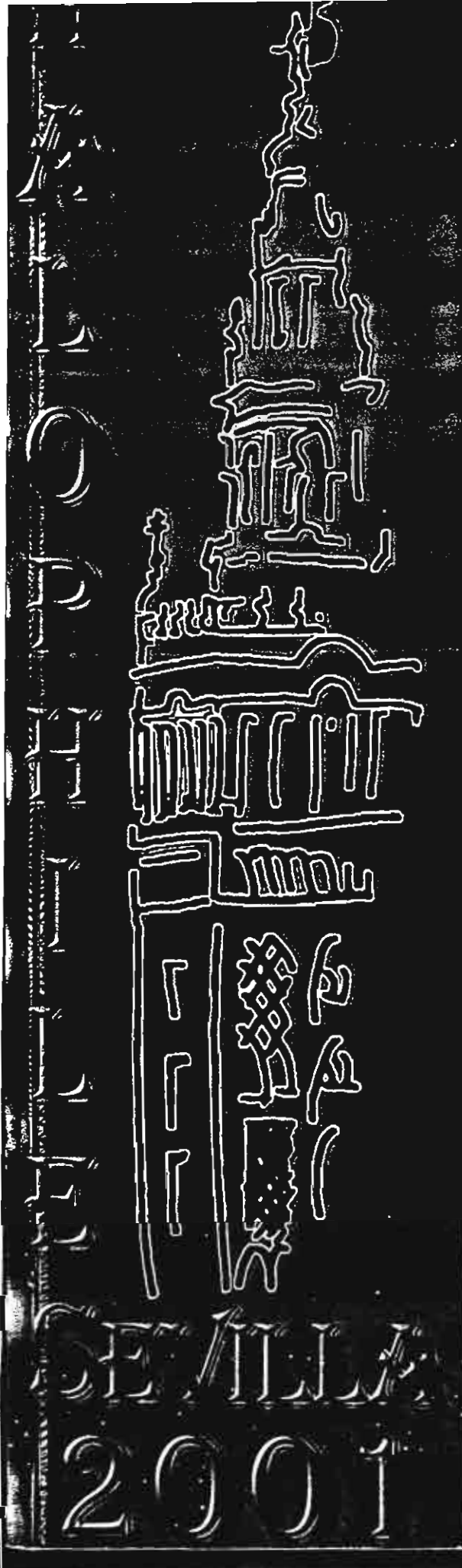
Isolation of thermophilic actinomycetes from samples of compost, bird dung and related nesting material involved pre-treatment of the samples by drying them at 45°C for 7 days, followed by dilution plating onto a mixture of Czapek-Yeast-Casamino acid agar and Starch Casein agar (CYC+SC). Antifungal antibiotics and sodium azide (2 µg/ml⁴) were introduced as selective agents. A total of 46 isolates belonging to *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* and other actinomycetes were isolated, with 4-8 types of isolates per sample at 10²-10⁶cfu.g⁻¹.

Halophiles 2001

*International
Conference on
Halophilic
Microorganisms*

23-27 September 2001 - Sevilla, Spain

*Programme
& Abstracts*



Isolation of Actinomycetes from Hipersaline Environments in the South of Mexico

Ramírez, N.¹; Castro, K.¹; González, A.¹; Márquez M.C.²; Sandoval, H.¹ and Ventosa, A.²

¹Dpto. de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F. 04960 (Mexico)

²Dpto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla (Spain)

Actinomycetes are Gram positive, filamentous and branched bacteria. These microorganisms are cosmopolitan although they prevail in tropical and subtropical areas and its importance, in connection with public health resides in that they cause infections and dermal lesions known as micetoma (1). However some genera have great biotechnological importance, mainly for their high production of antibiotics, as it is the case of the genus *Streptomyces* (1). Although these microorganisms have been found in different types of habitats, it is until recent years that some strains of actinomycetes from hypersaline environments have been isolated, mainly located in Spain, China and Iraq among others (2,3). The microorganisms able to live in an environment with certain concentration of salt (halotolerant) or those that require a certain concentration of salt to growth (halophilic), possess important characteristics that allow them to adapt to these extreme habitats (4), reason for which they are being used in innovative biotechnological processes. This paper reports the isolation of halotolerant and halophilic actinomycetes that have been found in hypersaline environments located in the South of Mexico. We carried out samplings of water, soil and sediment in saline coastal lagoons (salt pan) of the Oaxaca State. These lagoons present salinity ranging from 18 to 36 ‰, and they are located in the coordinates 15°57'10" to 15°57'50" N and 95°33'30" to 95°34'38" W, where a subhumid warm climate prevails with rainy season in summer and dry winter. The average annual precipitation is 817.7 mm. The environment temperature oscillates between 42°C (maximum) and 12.6°C (minimum). The depth varies between 0.40 m and 0.60 m in rainy seasons. Three different selective media were used for the actinomycetes isolation, supplemented with a solution of salts at 10 ‰ and 25 ‰ and incubating at 37°C. The selection of strains was based on the colonial and microscopic morphology (Gram), taking as main approach the presence of Gram positive and branched mycelium, characteristic of the actinomycetes (1). After 28-35 days of incubation, the media supplemented with solution of salts at 10 ‰, showed actinomycetes colonies (60 to 770 cfu ml⁻¹). We will present preliminary results concerning the characterization that will permit us to determine the taxonomic position of these new isolates.

(1) Sandoval, H. *et al.* (1996) Identificación y Diagnóstico de Actinomicetos Patógenos. Universidad A. Metropolitana, México

(2) Ventosa, A. *et al.* (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 504-544

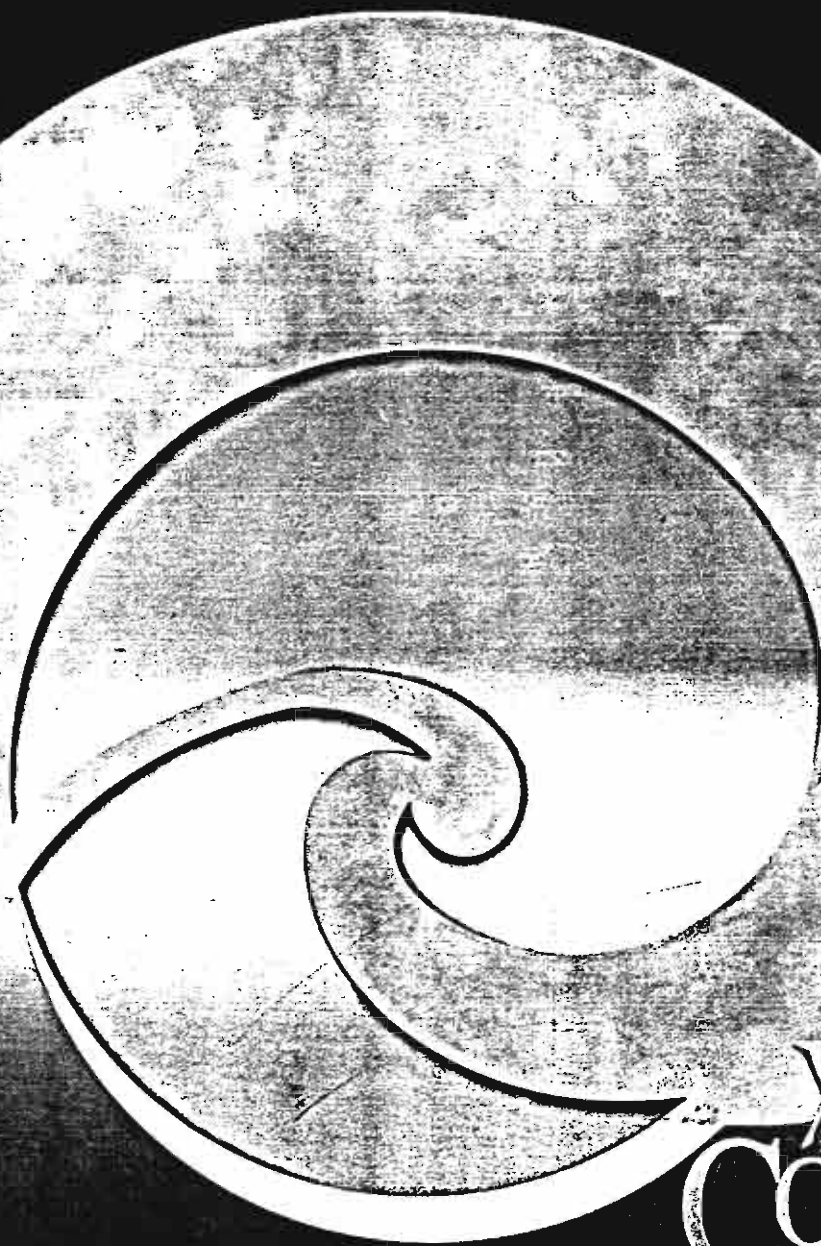
(3) Xiao, L.C. *et al.* (2001) *Streptominospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Vocardiopsaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 357-363

(4) Márquez, M.C. *et al.* (1987) A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J. Gen. Microbiol.* 133, 45-56

REVISTA
MEXICANA
DE CIENCIAS

FARMACÉUTICAS

Vol. 32 No. Especial Octubre 2001



**RESÚMENES DE
TRABAJOS LIBRES**

**XXXIV
CONGRESO
NACIONAL
DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS
2001**

afm

*Desarrollando Nuevas
Competencias...*

ros el extracto etanólico de *A. hederacea* (1.44 cm) y *G. coccinea* (1.40 cm). Para *E. coli* solo el extracto etanólico de *A. hederacea* mostró actividad (0.79 cm). De acuerdo con el valor de la concentración mínima bactericida, el mejor tratamiento para *P. aeruginosa* fue el extracto etanólico de *A. hederacea* (46.88 mg/mL), y para *S. aureus*, el mejor tratamiento fue el extracto etanólico de *H. chrysopsisidis* (18.75 mg/mL). La CMB del único extracto con actividad antibacterial para *E. coli* es mayor a 125 mg/mL, concentración que se estableció como límite para este estudio.

Conclusiones: El estudio fitoquímico preliminar de las mejores especies vegetales reveló la presencia de carbohidratos, flavonoides y terpenos en *A. hederacea* y *H. chrysopsisidis*, además de saponinas en éste último.

Con base en el estudio microbiológico, se concluye que el mejor tratamiento para *P. aeruginosa* fue el extracto etanólico de *A. hederacea* con una CMB de 46.88 mg/mL, y para *S. aureus*, el extracto etanólico de *H. chrysopsisidis* con una CMB de 18.75 mg/mL. El único extracto activo sobre *E. coli* fue el extracto etanólico de *A. hederacea* cuya CMB es superior a 125 mg/mL.

Aislamiento de actinomicetos de importancia farmacológica a partir de hábitats hipersalinos

Ramírez D. N.¹, Castro A. K.¹, González R. A.¹, Márquez M. C.², Sandoval T. H.¹, Ventosa U. A.²

¹Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

La industria farmacéutica desde siempre ha empleado organismos vivos para la obtención de nuevos productos, tales como proteínas, vacunas y antibióticos entre otros, tal es el caso de los actinomicetos, cuya importancia biotecnológica radica fundamentalmente en su elevada producción de antibióticos. Asimismo, la industria farmacéutica se encuentra ante el reto de introducir en su campo nuevos productos biológicos que puedan ser utilizados bajo condiciones extremas, obteniéndolos a partir de microorganismos que viven en hábitats extraños y se caracterizan por sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y altas concentraciones de salinidad. Los microorganismos halófilos y halotolerantes, son clasificados de acuerdo a sus requerimientos de sal para su crecimiento de la siguiente manera: halófilos moderados (1 – 15%), halófilos extremos (16 – 30%), halotolerantes moderados (0 – 18%), halotolerantes extremos (0 – 30%). En las áreas de interés particular de los halófilos está la producción de solutos compatibles, los cuales son compuestos orgánicos de bajo peso molecular responsables de la ayuda para excluir sal del citoplasma, así, gracias a los mecanismos de resistencia a condiciones adversas que poseen, han desarrollado enzimas con amplio potencial industrial y sustancias de interés para la industria farmacéutica. El presente trabajo da a conocer una colección de cepas de actinomicetos que han sido aisladas de ambientes hipersalinos en diferentes partes del mundo. Se realizaron muestras de agua, suelo y sedimento en distintas salinas de producción del sur de España, así como el Lago Salado de Utah y lagunas costeras que son utilizadas como salinas de producción del Estado de Oaxaca. Se utilizaron tres diferentes medios de cultivo selectivos para el crecimiento de actinomicetos, los medios fueron complementados con una solución de sales al 10% conteniendo 234 g/L de NaCl. La selección de cepas estuvo basada en la morfología colonial y microscópica (gram), tomando como criterio principal la presencia de micelio gram positivo microfonado, característico de los actinomicetos. Las cepas obtenidas fueron sembradas en los mismos medios de aislamiento variando la concentración de sal en el rango siguiente: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%. Finalmente se hicieron las siguientes variaciones de pH para determinar su crecimiento 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, y 12. De acuerdo al criterio de selección de cepas y sus requerimientos de sal se han obtenido 54 cepas de actinomicetos (48 halotolerantes y 6 halófilos), los cuales se han agrupado de la siguiente forma: halotolerante marinos (4), halotolerantes moderados (44), halófilos moderados (5) y halófilos extremos (1). Todas las cepas aisladas crecieron en un rango de pH que va de 6 – 11. Los rangos de pH y concentraciones de sal en los lugares de muestreo fueron: para los actinomicetos halotolerantes, pH = 6.9 – 8.4, % de sal = 5.42 – 18.83; para los actinomicetos halófilos, pH = 7.1 – 8.12, %sal = 8.71 – 11.7. El aislamiento y estudio de la biología de actinomicetos halófilos y halotolerantes, nos permite obtener nuevas fuentes que pueden contribuir en la industria farmacéutica con importantes aplicaciones biotecnológicas e industriales.

Aplicación de la determinación de ácidos grasos para la identificación de actinomicetos

Sánchez H. Karina, Rodríguez N. Verónica, González R. Aída, Salas M. Carlos, Sandoval T. Horacio

Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco

El análisis de las diferencias que se presentan en los microorganismos ha mostrado que organismos aislados de diferentes medios, tanto geográficos como fisicoquímicos, comparten muchas características comunes. Esto ha permitido a los microbiólogos agrupar a los microorganismos y al mismo tiempo ha facilitado su estudio y exploración. La clasificación es el ordenamiento de organismos en grupos (taxa) para producir un arreglo ordenado de cepas para el conocimiento de sus propiedades y así poder predecir las propiedades de otros miembros del grupo. La clasificación es esencial para el desarrollo de la microbiología y para explotar la diversidad microbiológica. La identificación que es el procedimiento para determinar si un organismo desconocido pertenece a un grupo previo definido justifica la existencia de una clasificación. Sin embargo, las clasificaciones no siempre están disponibles para aislados de muchos hábitats naturales y esto hace necesario diseñar metodologías las cuales permitan un rápido agrupamiento de un gran número de aislados de acuerdo a sus características compartidas.

Tal trabajo necesita la introducción de procedimientos de rápida clasificación para la evaluación de dichos aislados. En las células bacterianas intactas, los ácidos grasos se presentan como constituyentes de moléculas más complejas tales como fosfolípidos, glicolípidos y lípidos. La metanolisis ácida se ha usado ampliamente para el análisis de ácidos grasos de bacterias gram positiva; mediante su análisis y cuantificación, con fines de identificación y taxonomía en cromatografía de gases.

En términos generales no hay técnicas sencillas y baratas que nos permitan identificar microorganismos a nivel de cepa o variedad ya que las diferencias que hay que detectar son tan sutiles que requieren ya sea de anticuerpos monoclonales o de equipo tan sofisticado como el de Pirólisis y Espectro de masas (pym). Sin embargo esa diferenciación de cepas sigue siendo una necesidad tanto desde el punto de vista epidemiológico como del control ambiental para plantas farmacéuticas, hospitales y, en general, lugares donde se requiere un ambiente limpio o estéril.

Con este objetivo se diseñó una estrategia basada en la determinación de cromatografía de gases, de los ésteres metílicos de los ácidos grasos constituyentes de los microorganismos, y su interpretación mediante un tratamiento estadístico de análisis multivariado aplicado a procedimientos convencionales de taxonomía numérica.

Se utilizaron 23 cepas de actinomicetos aisladas de diferentes fuentes y que representaban una variedad razonable de ambientes, desde salas de hospital hasta ambientes desérticos.

La biomasa de los microorganismos se obtuvo en medio líquido de Bennet, después de lavarlo con agua destilada se procedió a efectuar la metanolisis ácida de los ácidos grasos mediante la técnica de Minnikin.

El análisis cromatográfico se realizó en una columna capilar de 35 m y con una fase estacionaria ligeramente polar. De los FAMES encontrados se utilizaron los siguientes para efectuar el análisis de componente principal: c14:0, c15:0, c15:2, c16:0, c16:1, c16r, c17:0, c17:2 y c18:0 ya que estos son comunes a todas las cepas analizadas.

El dendrograma obtenido nos muestra cinco clusters: el número 1 compuesto fundamentalmente por actinomicetos aislados de procesos patológicos superficiales (piel y mucosas). El cluster 2 se compone de cepas de *Streptomyces sp* aisladas en hemocultivos. El cluster 3 agrupa cepas aisladas de medio ambiente y el cluster 4 diferencia cepas de *Nocardia*, aisladas en México. El cluster 5 incluye una cepa de referencia atómica.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer esta técnica como una ayuda en la identificación y seguimiento de microorganismos, a nivel de cepa o biovariedad, con las ventajas de ser sencillo y relativamente económico.



THE WORLD OF MICROBES

Paris, 27th July to 1st August 2002
Le Palais des Congrès de Paris

hosted by

Société Française de Microbiologie

Joint Meeting
of the three divisions of
International Union of Microbiological Societies



**Xth International Congress of
Bacteriology and Applied Microbiology**

ABSTRACTS

<http://www.iums-paris-2002.com>

TOTALLY LABELLED ELECTROSCOPY.

Microorganisms, RUSSIA

Technology of totally D- and/or 13C15N-labelled *B. subtilis* is offered. To obtain the biomass, that have been grown on standard media were used. The biomass yield at usage of 10% of totally deuterated biologically active conditions of extremely high deuterium D₂O $\delta = 8544.11$ isotope exchange. A complexing of bacteriorhodopsin accumulation in intermediate sensitivity of totally labelled

CELLULOSUS CEREBUS STRAIN

Journal Materials Science, Davutsha University

Genus *Bacillus*. They grew in a medium anaerobic, but not when aliphatic alcohols (toluene, Toluene accumulation in its cells adapted to toluene, the amount of toluene (ure) and *o*-vanadate (ATPase inhibitor) as source. These results suggest the presence of

solvent

EXTRACELLULAR ENZYMES BY CHARACTERIZATION OF A STRAIN 34H.

Degradation of organic matter (OM) via the Not much is known, however, regarding red activity rates of three classes of EE (to EE, Cl), using fluorescently-tagged July of 1998. Relationships between the pidase activity dominated throughout the declined. Evidence for differential EE tive EE through the characterization of a new strain 34H. A purification protocol, resulted in capture of 25% of the original at a relatively low thermal optimum for its such as ammonium sulfate. Ongoing in between enzyme activity and structural expression and use of cell-free cold-active

B-578. ISOLATION AND STUDY OF EXTREMOPHILIC MICROORGANISMS FROM SOILS WITH THERMAL AND GEO-CHEMICAL ANOMALIES.

H. Panosyan¹, A. Gasparyan³, P. Tozalakyan², Y. Popov¹, ¹Dep. of Microbiology and Biotechnology, Yerevan State University, Yerevan, Armenia. ²GEORISK Scientific Research Company, Yerevan, Armenia. ³State Microbial Depository Center, National Academy of Sciences, RA, Abovian, Armenia

Isolation and identification of extremophilic microorganisms from the soils with thermal and geo-chemical anomalies of some regions of Armenia have been carried out. The aerobic spore-forming bacteria, especially their extremophilic forms, as perspective producers of different enzymatic activities have been studied. The morpho-physiological and biochemical properties of several strains of thermophiles, alkalophiles, halophiles and thermohalophiles have been studied. The different proteases, amylases, cellulases, β-galactosidases, inulinases, pectinases, lipases were produced by the strain of extremophilic bacilli. The high cyclodextrin-glucantransferase (CGT-ase) activity has been revealed among thermophilic, halophilic, mesohalophilic and alkalophilic strains synthesizing α--, β--, γ-cyclodextrins (CDS). The different CGT-ases with strong transfer activity and wide substrate specificity at pH 6.0-9.5 and at 45 - 65 degrees were characterized. The β-galactosidases catalyzing both hydrolysis of lactose and transgalactosylation reaction as well as inulinases catalyzing hydrolysis of inulin and transferring reactions among the extremophilic forms of bacilli have been studied. The synthesis of different branched CDS and various oligosaccharides by using the transfer reactions of CGT-ases, β-galactosidases and inulinases is discussed.

B-579. UNUSUAL CRYSTAL FORMATION FOUND IN HALOPHILIC ACTINOMYCETES

H. Sandoval¹, J.A. Serrano², N. Ramirez⁴, A. Ventosa³, ¹Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. ²Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España. ³Dept. de Sistemas Biológicos, Universidad A Michoacana-Académica, Mexico DF, Mexico

Actinomycetes are Gram positive, filamentous and branched bacteria. These microorganisms are cosmopolitan although they prevail in tropical and subtropical areas. Some of them cause infections and dermal lesions in man and animals. However some genera have great biotechnological importance, mainly for their high production of antibiotics. Although these microorganisms have been found in different types of habitats, it is until recent years that actinomycetes from hypersaline environments have been isolated, mainly located in Spain, China, Iraq and Mexico among others. The microorganisms able to live in an environment with certain concentration of salt (halotolerant or halophilic), possess unique biochemical characteristics that allow them to adapt to these extreme habitats, reason for which they are being used in innovative biotechnological processes. This paper reports the presence of very unusual crystal formations found in cultures of halophilic actinomycetes that have been isolated from hypersaline environments located in Spain and in the South of Mexico.

Actinomycete cultures, in solid media, were prepared for Scanning Electron Microscopy and observed in conventional manner. We have found large crystal formations attached to the external layer of the cell wall of microorganisms. Such crystals are not soluble in the buffers solutions used for preparation of microscopic samples. Interestingly these crystals are rich in sodium and organic carbon but not in chloride.

It is known that halophilic Archeobacteria produce compatible solutes (ectoins) in order to protect themselves from deleterious action of NaCl but in the case of halophilic Actinomycetes there are no reports of a similar mechanism. Probably this crystal formation is the way to manage the NaCl used by Actinomycetes.

B-580. CHARACTERIZATION OF THE PROTEASE CP1 PRODUCED BY THE MODERATE HALOPHILE PSEUDOALTEROMONAS SP. STRAIN CP76

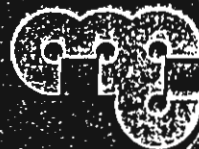
A. Ventosa¹, C. Sanchez-Porrui, E. Mellado¹, C. Bertoldo², G. Antranikian², A. Ventosa¹, ¹Dept. de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, ²Institut Technische Mikrobiologie, Technische Universität München, Germany

A total of 310 moderately halophilic bacteria were isolated from hypersaline environments in order to select for halophiles that produce extracellular proteases. From this screening, 26 isolates showed proteolytic activity and were characterized as members of the genera *Selenomonas* (16 strains), *Bacillus* (4 strains), *Salmococcus* (2 strains) or members of the γ -Proteobacteria (4 strains). Strain CP76, tentatively identified as *Pseudalteromonas* sp., was selected as the best producer of an extracellular protease designated CP1. Maximal protease production was detected at the end of the exponential growth phase. This CP1 protease showed optimal activity at 55°C, pH 8.5 and high tolerance to a wide range of NaCl concentrations (0 to 4M NaCl). The most interesting features of this enzyme are its moderate thermoactivity, its activity in a range of pH values (6-10) and specially, its salt tolerance (optimal activity at 7.5% total salts). The purified protease has a molecular mass of 38 kDa and its N-terminal amino acid sequence shows similarity to metalloproteases previously described. The protease activity was strongly inhibited by EDTA, PMSE and Petaloc but not by E-64, bestatin, chymostatin or leupeptin. In conclusion, *Pseudalteromonas* sp. strain CP76 produces an extracellular metalloprotease moderately thermotolerant and stable at high salt concentrations.

ISME MEXICO 2004



ASOCIACIÓN MEXICANA
DE MICROBIOLOGÍA



INTERNATIONAL SOCIETY FOR
MICROBIAL ECOLOGY-ISME
www.microbes.org

10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
MICROBIAL ECOLOGY ISME-10
MICROBIAL PLANET:
SUB-SURFACE TO SPACE
CANCUN, MEXICO | AUGUST 22 - 27, 2004

BOOK OF ABSTRACTS

www.kenes.com/isme

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF HALOPHILIC ACTINOMYCETES FROM MEXICO

J. H. Sandoval Trujillo¹, M.D.C. Marquez Marcos¹,
D. Ruiz Arabal¹, H. Ramirez Saad¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Neohimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, Mexico, Mexico; ²University of Seville, Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and Parasitology, Seville, Spain
³Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Valencia, Spain
E-mail: hurasa@cuevill.uam.mx

Actinomycetes have been found in many different habitats, but only recently they were isolated from hypersaline environments. Microorganisms able to grow in high salt concentrations are called halophiles, they possess particular biochemical and metabolic features that are of special interest for biotechnological processes such as production of enzymes and compatible solutes. We report the creation of a collection of actinomycetes isolated from highly saline environments in Mexico. Isolates were characterized based on morphological, biochemical and molecular features, and clustered by numerical taxonomy techniques, yielding a first approach to the biodiversity of hitherto unknown Mexican halophilic actinomycetes. Samples were taken from different habitats, ranging from brackish inland water to high-salt coastal lagoons. Isolation was performed on MH medium with 10% salt concentration. Initial screening based on morphological features yielded a total of 64 actinomycete strains, 7 of them regarded as extreme halophiles with an optimal growth at 15% salt concentration, while the other 57 strains were considered moderate halophiles growing at 10% salt. All isolates showed the 23S rDNA insertion, characteristic of high G+C gram positive bacteria (HGC). Numerical taxonomy analysis was based on 99 features. The resulting dendrogram clustered all isolates in 5 well defined groups. Further numerical analysis including other actinomycetes was based on 39 features and showed that most of our strains clustered together, separated from previously described HGC halophiles and reference strains. These results suggest that members of our strain collection may form a different lineage within the HGC bacteria, comprising new species and probably new genus.

PO

CHARACTERIZATION OF MICROBIAL ISOLATES FROM THE SALT PLAINS MICROBIAL OBSERVATORY

M.A. Schneegurt¹, T.M. Caton², A.L. Grey², J.A. Buchheim¹,
M.A. Buchheim¹

¹Department of Biological Science, University of Tulsa, Tulsa OK, USA
²Department of Biological Sciences, Wichita State University, Wichita KS, USA

E-mail: mark.schneegurt@wichita.edu

The Salt Plains Microbial Observatory is characterizing the microbial community at the Great Salt Plains of northern Oklahoma. The salt plains are an unvegetated region of mud flats and sandy areas where Permian brine flows to the surface, saturating the soil with sodium chloride, and under dry conditions, leaving a crust of white salt. Rainfall events often lead to flooding and dramatic decreases in salinities. Microbes that inhabit salt plains soils must be able to tolerate extreme hypersaline conditions and possess strategies to cope with extremely rapid variations in surface salinities. More than 100 aerobic heterotrophic bacterial isolates, encompassing 46 phylotypes, have been obtained from salt plains soils by enrichment culture. These have been characterized phenotypically and phylogenetically. The most often observed isolates were *Halomonas* and *Bacillus* species. About a dozen halophilic archaeal isolates also have been obtained and characterized. The salt plains bacteria generally exhibit wide ranges of salt tolerance, with only a few requiring more than 1% salinity for growth. Several isolates, in addition to exhibiting wide salt tolerances, also exhibit wide pH and temperature tolerances. It is not clear how such wide tolerances are supported or how halophilic organisms survive apparently large changes in salinities. The current report addresses these issues. Physiological adaptations of the microbes of the Great Salt Plains are important for the development and maintenance of the soil community structure. This work was supported by National Science Foundation MCB-0131659 and MCB-0132083 and the Kansas Biomedical Research Infrastructure Network (KBRIN).

PO

MICROBIAL MONITORING OF A PLANT BIOMASS PRODUCTION SYSTEM ON THE INTERNATIONAL SPACE STATION

M.S. Roberts¹, C.M. Frazier¹, J. Melendez², R.C. Morrow¹, G.V. ...
¹Space Life Sciences Lab, Dynamae Corporation, Kennedy Space Center, FL; ²Space Life Sciences Lab, Biometric Corporation, Kennedy Space Center, FL; ³Orbitec Corporation, Madison WI, USA
E-mail: michael.roberts-1@ksc.nasa.gov

Experiments were recently conducted by NASA to study the effects of prolonged exposure to microgravity on the growth of wheat in space. We report the results of T-RFLP community profiling of the microbial communities associated with the plants and the plant growth system (PESTO, Photosynthesis Experiment and System Testing and Operation) was flown in a controlled-environment plant-growth chamber, the Production System (BPS), to the International Space Station on STS-111 and returned on STS-111 after 73 days on orbit. A matched ground-based BPS experiment was conducted at KSC on a two-week delay to match the on-orbit timelines and control parameters in Earth-normal gravity. (*Triticum aestivum* cv *Apogee*), cultivated from surface-sterilized seeds was placed in root modules pre-launch and grown for three separate harvests. After harvest on-orbit, root modules were exchanged and re-sterilized with sterile water to imbibe dry seeds for planting. Periodic gas, root and tissue samples were obtained during plant cultivation and harvest on-orbit and at KSC. Upon landing of the BPS, growth chamber and containment bags, root modules, and plant surfaces were swabbed and liquid samples were obtained from BPS nutrient delivery and wastewater control systems, root modules, and wastewater bags. T-RFLP community-dependent measures of richness were slightly higher for the space experiment versus ground-control plant growth environments. Biodiversity differed for each sample type (wastewater bags > root modules > nutrient solution > surfaces) in a rank order different from that of the ground control community (root modules > surfaces > wastewater bags > nutrient solution).

PO

CHARACTERIZATION OF PSYCHROBACTER STRAINS ISOLATED FROM PUERTO RICAN ENVIRONMENTAL SAMPLES

L.D.C. Sepulveda-Torres¹, H.L. Ayala-Del-Rio², S.H. Alvarez¹,
M. Maldonado¹, Y. Baez¹, M. Gonzalez¹, J.M. Tiedje¹

¹Department of Science and Technology, Universidad Metropolitana, Juan PR, USA

²Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing MI, USA

E-mail: mm_sepulveda@suagm.edu

Low temperature and low water availability predominate in our study system. Before understanding how organisms emerge from or adapt to extraterrestrial environments, we must first comprehend how terrestrial organisms respond to "extraterrestrial-like" environments at the genetic and the evolutionary levels. We use the Siberian permafrost as a model extraterrestrial environment because the organisms that inhabit permafrost have been constantly frozen for millions of years with significant quantities of available water. Members of the genus *Psychrobacter*, a psychrotolerant, Gram negative, aerobic bacteria have been isolated from Siberian and Antarctic permafrost as well as deep-sea hydrothermal environments. We are interested in isolating and characterizing *Psychrobacter* strains from tropical environments that have not been exposed to subzero temperatures, in order to determine if the adaptations seen in permafrost *Psychrobacter* are specific to cold ecosystems. The bacteria isolated from the permafrost have been exposed to extreme low temperatures for millions of years, it is expected that the traits that have been selected for in the permafrost habitat will not be as frequent in isolates from constantly warm environments. To test this hypothesis, we plan to compare various physiological traits between the bacteria isolated in the permafrost and the nearest relatives isolated from tropical environments. Using the strategies described by Vishnivetskaya et al. (2000) and Bowman et al. (1996), we successfully isolated *Psychrobacter* strains from several locations in Puerto Rico. The current presentation provides a detailed characterization of the Puerto Rican isolates using traditional and molecular typing methods.

HALOPHILES 2004

4 - 9 September 2004 - Ljubljana, SLOVENIA

International Congress on Halophilic Microorganisms

Programme & Abstracts



Antibiotic Susceptibility Test for Taxonomic Characterization of Halophilic Actinomycetes

Ramírez N.¹; Díaz A.¹, Sandoval H.¹, Ramírez H.C.¹, and Ventosa A.²

¹ Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco
Colzada del Hueso 1100, Colonia. Villa Quietud, 04960, México D. F.

² Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
Sevilla, España.

The actinomycetes conform a group of Gram positive bacteria characterized by branched filaments; these microorganisms present a great biotechnological potential. The halophilic actinomycetes at the moment conform a small group of microorganisms with a great biotechnological potential and industrial applications. The study of Biology of halophilic actinomycetes, including their isolation, identification and characterization has showed the diversity of these microorganisms in several parts of the world. In the searching of these halophilic actinomycetes is necessary the application of techniques allowing to differentiate small groups of microorganisms and at the same time these techniques should be quick and easy. For example, the determination of the sensitivity of the halophilic actinomycetes to different antibiotics.

The sensitivity of 37 halophilic actinomycetes was determined versus 20 antibiotics with the objective to use the results like a taxonomical tool to differentiate groups from halophilic actinomycetes. Petri dishes were inoculated with 150 µl of strains in media for halophilic bacteria complemented with saline solution at 10 %; the correspondent sensidisc of 20 antibiotics was applied (Oxoid y BioRad); the incubation was at 37°C for 10 days; after that we proceeded to measured the observed inhibition halo. The halo of inhibition had a minimum size of 1 cm diameter; under this diameter the microorganisms was considered resistant.

With the collected data a numerical analysis was made calculating the Coefficients of Simple Matching (S_{SM}) as well as the Coefficient of Jaccard (S_J); the similarity matrix was obtained and the correspondent dendrogram was constructed, which showed the existence of 4 groups at 72 % of similarity; Group A: 2 strains; sensible to: carbencillin, piperacillin, cephalothin and cephotaxime; resistant to: erythromycin, polymyxin-B, amikacin and ampicillin. Group B: 5 strains; sensible to: ampicillin, cephalothin, cephotaxime, erythromycin, carbencillin, ceftazidime and piperacillin; resistant to: amikacin, streptomycin and trimethaprim sulfamethoxazole. Group C: 15 strains; sensible to: carbencillin, erythromycin, piperacillin and polimixin-B; resistant to: amikacin, cephotaxime, ampicillin, ceftazidime and streptomycin. Group D: 14 strains; sensible to: carbencillin; resistant to: cephalothin, cephotaxime, ampicillin, ceftazidime, streptomycin, piperacillin and polimixin-B. The obtained results were compared with the established groups from a filogenetic analysis made previously in a set of 60 halophilic actinomycetes. The comparison established an important congruence with one group formed from the filogenetic analysis. This let us to conclude that the test of susceptibility to antibiotics could be an important taxonomic tool for halophilic actinomycetes.

Phylogeny of Halophile Actinomycetes from Mexico, Based on 16S rDNA Sequence Analysis

Ramírez N.¹, Ventosa A.², Ramírez-Saad H.¹, and Sandaval H.¹

¹ Departamento de Sistemas Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, Calz. Del Hueso 1100, Villa Quietud. 04960, México, D.F. (MÉXICO).

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Formación, Universidad de Sevilla, Sevilla, (ESPAÑA).

The first truly halophile actinomycete reported was *Actinopolyspora halophila*, isolated in Canada in 1975. Since then, some reports have been made from different geographic regions, regarding isolation of this group of halophiles. These isolates have been assigned to six genera within the Actinomycetales. The recently postulated genera *Actinopolyspora* and *Streptimonospora* contain only halophile species, pointing to different physiological and metabolic features of this group of microorganisms. Currently, there is increasing interest to unveil the diversity within the halophile actinomycetes, mainly from those areas where no previous reports have been made.

In the Mexican territory there are several saline to hypersaline environments, ranging from closed coastal lagoons to inland saltern ponds. Here we report the creation and characterization of a collection of halophile actinomycetes isolated from saltern marshes located in the Pacific (western) coast of Mexico. The first group of samples was taken from several neighboring saltern marshes in the southern state of Oaxaca, while the second group of samples came from similar environments but in the state of Sonora, located more than 2000 km north of the first sampling site.

Isolation was performed on MH medium with 10% salt concentration. Initial screening based on morphological features yielded a total of 64 actinomycetes strains, 7 of them regarded as moderate halophiles with an optimal growth at 15% salt concentration, while the other 57 strains were considered also moderate halophiles growing at 10% salt. Biochemical characterization considered 99 features obtained for all isolates. Numerical taxonomy analysis of these data produced a dendrogram clustering all isolates in 5 well defined groups, which was also reflecting the geographic origin of the isolates. Further numerical analysis included other actinomycetes and was based on 39 features, showing that most of our strains clustered together, separated from previously described High G+C halophiles and reference strains.

Nearly full length 16S rDNA sequences were obtained for 10 members of the collection, representing all 5 clusters. Fasta comparison pointed that all isolates obtained from Oaxaca, which were scattered in 4 clusters, probably belong to the genus *Saccharamonospora*, being the closest species *S. caesia* and *S. asparaginophila* with 97 and 98% similarity. The fifth original cluster contained only strains from Sonora samples. The 2 sequenced members of this cluster pointed to *Actinopolyspora mortivallis* as their closest relative, showing a lower similarity of 94 and 95%.

Altogether, our results suggest that members of our strain collection may form a different lineage within the HGC bacteria, probably comprising a new species.

Isolation of Halophilic Filamentous Fungi from Saltern ponds in Mexico

Sandoval H.¹ and Ramírez N.¹

¹ Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco
Calzada del Hueso 1100, Colonia. Villa Quietud, 04960, México D. F.

At the present time is increasing the interest to know the diversity of halophilic microorganisms because its capacity to produce metabolites with important applications in Biotechnology and other industrial fields. Mexico, due to its geographical situation, climate, and geology presents a great variety of ecologic conditions.

It was carried out a monitoring in different geographical areas of Mexico with hypersaline environments, as salted soils, coastal saline lagoons and saltern ponds in desertic areas, with the objective of knowing the diversity of halophilic microorganisms. The samples were inoculated in different cultivation media for isolation of bacterio and fungi. In the specific case of the isolation of fungi the Sabouroud's medium was used supplemented with NaCl to 10%.

As a result of the realized samplings the isolation of 30 strains of filamentous fungi was achieved, after the isolation the fungi were inoculated in Sabouroud's medium with different concentrations of NaCl (0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30%), the incubation was carried out at 28°C during 7 days. 4 strains presented a good growth in 3 and 15% (but not at 0%) of salinity, being considered moderated halophiles; the 26 remaining strains were characterized as halotolerants. It was carried out a study of macroscopic morphology, analyzing size of the colony, texture, pigmentation etc. The microscopic morphology allowed identifying 3 different genres: *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cunninghamella*.

Also it was investigated the capacity of these four strains to produce antibiotics, by means of an *in vitro* assay. It was carried out with strains of: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The four halophilic fungi were cultivated in liquid Sabouraud's medium, added with NaCl to 7%, and incubated 28 °C for 10 days, and then the biomass was separated by centrifugation, 100 µL of supernatant were applied in wells of 5 mm in diameter previously formed in the plates inoculated with the testing microorganisms, which were incubated during 24 hours to 37°C.

The inhibition areas of the bacterial growth were measured, only one of the four strains of halophilic fungi, identified as *Penicillium*, showed good inhibition halos in *S. aureus* and *M. luteus*.

As long as we know it is probable the first report of isolation of halophilic filamentous fungi in Mexico.

REVISTA
MEXICANA
DE CIENCIAS

FARMACÉUTICAS

Volumen 35 • Número Especial • Octubre 2004



XXXVII
CONGRESO
NACIONAL
DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS
Acapulco, Guerrero
2 0 0 4

RESÚMENES DE TRABAJOS LIBRES

Cartel 071

Producción de penicilina con células Inmovilizadas de *Penicillium chrysogenum*

Enzo Abarca Samuel, Bautista Ramírez María Esther, Gómez y Gómez Yolanda

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, IPN

Objetivo: Evaluar el potencial de aplicación a nivel industrial de sistemas de células inmovilizadas para la producción de metabolitos como los antibióticos que son de interés comercial, y en particular la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum* en cultivo sumergido.

Materiales y método: Después de la reactivación de la cepa y de realizar las resiembras necesarias, se llevaron a cabo las pruebas para identificación y confirmación del microorganismo. Igualmente se montaron las técnicas de cuantificación de biomasa por peso seco, azúcares por el método de fenol-sulfúrico y producción de antibiótico por el método de difusión en agar utilizando como microorganismo blanco una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC6538P. La inmovilización se realizó por el método de atrapamiento en gel con alginato de sodio y k-carragenina, probando las concentraciones de 2 y 3% y proporciones de biomasa de 2, 3, 4, 5 y 10%; mezclando y dejando madurar las partículas en soluciones de CaCl al 2% y KCl 0.5 M respectivamente durante 16-18 horas. La incubación para la producción se llevó a cabo en un medio a base de sacarosa, a un pH de 5-7, a una temperatura de 28 °C y una agitación moderada a 125 rpm.

Resultados y conclusiones: Las pruebas realizadas permitieron corroborar la autenticidad de la cepa y en el ensayo microbiológico para determinar la potencia se tuvo alta linealidad. Se determinó que una concentración del soporte de 2% era adecuada, aunque para el caso de k-carragenina la de 3% también lo era, y de ambos soportes el alginato es más recomendable por facilidad de manejo. Para la biomasa también se encontró que una concentración de 2% era adecuada. La cosecha de biomasa para la inmovilización se determinó realizar a los tres días que es cuando se inicia la producción de antibiótico y se continuaron incubando durante seis días más.

Al comparar la producción en los dos soportes y en células libres se encuentra que en éste último la producción se cae al quinto día. En cambio en los sistemas inmovilizados permanece durante más tiempo una vez alcanzado el máximo. La concentración de penicilina alcanzó 5.7 U/mL en el cultivo con células libres, en alginato de 7.1 U/mL y en k-carragenina de 6.5 U/mL lo que representa un 25% y 15% de mayor producción respectivamente.

Se concluye que un sistema de producción de estos metabolitos es recomendable ya que además de que una vez que se comprobó un mayor rendimiento, el proceso en sí ofrece una mayor productividad y mayor facilidad en la separación de los compuestos para su posterior purificación.

Cartel 081

Cultivo *in vitro* de la planta medicinal *Boussingaultia baselloides* para la obtención de sapogeninas triterpenoides

Germán Faz María Celia, González Godínez Diana María, Rico Rodríguez Lilia

ENCB, IPN

Objetivo: Implementar el cultivo *in vitro* de *Boussingaultia baselloides* y obtener respuesta de organogénesis y calogénesis. Seleccionar el medio de cultivo con mayor eficiencia en el crecimiento de callo para la obtención de sapogeninas triterpenoides.

Materiales y método: Material biológico: se trabajó con tallos y hoja de *Boussingaultia baselloides*. Método: de desinfección las

tallos y hojas de lavaron con una solución jabonosa, posteriormente se sumergieron durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 30% v/v y se realizaron tres lavados con agua estéril. Medios de cultivo y siembra en un factorial de reguladores de crecimiento: se prepararon diferentes tratamientos con auxinas (ANA, ALA, IBA) y/o citocininas (KIN, BA) y un testigo, en todos los casos se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog), sólido con un pH de 5.8, se esterilizaron en autoclave a 15 lb./pg² por 15 minutos. Se sembraron tres inóculos dentro de cada recipiente con cinco replicaciones para cada tratamiento, se incubaron a 25 ± 2 °C a 16 h luz/ 8 h oscuridad e intensidad luminosa de 25 μmol m² s⁻¹. Lo anterior se repitió tres veces, para demostrar reproducibilidad.

Extracción de sapogeninas triterpenoides e identificación: se realizaron extracciones con etanol, benceno e hidrólisis para obtener las sapogeninas triterpenoides del callo. Se identificaron por medio de cromatografía capa fina y reacciones de Liebermann-Buchard.

Resultados: Las evaluaciones se realizaron cada semana durante cuatro meses. En todos los tratamientos se obtuvo respuesta de crecimiento de meristemo lateral, crecimiento de raíz y de callo. Los tratamientos con mayor eficiencia son: ANA/KIN y ANA. La oxidación se presentó en un mínimo de inóculos, y a pesar de esto hubo crecimiento de meristemo lateral. La contaminación fue casi nula, lo que infiere una autoprotección. Se identificaron las sapogeninas triterpenoides en la cromatografía de capa fina, comparada con estándares de sapogeninas triterpenoides del tubérculo de *Boussingaultia baselloides*. Las reacciones de Liebermann-Buchard fueron positivas para sapogeninas triterpenoides.

Conclusiones: El cultivo *in vitro* de *Boussingaultia baselloides* no se contamina. En todos los tratamientos se obtuvo respuesta de organogénesis y calogénesis. Los tratamientos ANA/KIN y ANA presentan una mayor eficiencia tanto en el crecimiento de raíz como de callo. Las sapogeninas triterpenoides se encuentran presentes en el callo del cultivo *in vitro*. Estos metabolitos son de interés farmacéutico por las propiedades antiinflamatorias y antibacterianas que presenta.

Cartel 121

Bacterias halófilas, fuente de recursos con un elevado potencial biotecnológico e industrial

Ramírez Durán Ninfá, Díaz Martínez Alejandro, Sandoval y Trujillo Ángel Horacio

DSBC, UAM-Xochimilco

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, debido a que no sólo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. A continuación se describen algunas de las más interesantes aplicaciones de estos microorganismos.

Solutos compatibles: Las bacterias halófilas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles, y que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad. También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática (biosensores, PCR, etcétera) y en la industria farmacéutica y cosmética. Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como la lactato deshidrogenasa y la tripectinasa. Así, en diversos estudios en los que

comparó el efecto protector sobre estas enzimas de distintos solutos compatibles (glicina betaina, trehalosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares), se puso de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores al calor y los procesos de congelación y descongelación.

Biodegradación de residuos: Las bacterias halófilas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos. Constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas. Esto sucede por ejemplo en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas.

Enzimas: Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad. La mayoría de las enzimas halófilas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado a la fecha provienen de bacterias halófilas moderadas. Así se han descrito varias hidrolasas de interés industrial de tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y 5'-nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas.

Alimentos fermentados: Las bacterias halófilas también tienen diversas aplicaciones en el campo de la alimentación. Así en la elaboración de la salsa de soya intervienen determinadas especies del género *Terragenococcus*. Los granos de trigo y soya se resuspenden en agua con NaCl al 19% y se deja durante nueve meses en oscuridad. *T. halopilula* se emplea como indicador de la fermentación pudiendo alcanzar una densidad de 108 UFC/mL en la salsa de soya, que contiene una concentración aproximadamente 3M de NaCl.

Polímeros: Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolífera. Gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así su tensión superficial. Las bolsas de petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros. Se ha demostrado la existencia de bacterias halófilas capaces de crecer en las bolsas subterráneas de crudo y producir biopolímeros surfactantes resistentes a las condiciones ambientales de hipersalinidad.

Otros usos potenciales: Además de los usos citados anteriormente, existe un amplio grado de posibles aplicaciones que aun están siendo objeto de estudio: (i) en la eliminación de fosfatos de ambientes hipersalinos; (ii) en el procesamiento de residuos hipersalinos provenientes de la industria del aceite de oliva o de los procesos de curtido de pieles; (iii) utilización industrial de los biosurfactantes producidos por algunas bacterias halófilas moderadas; (iv) producción de enzimas de interés en biología molecular, antibióticos, o carotenoides de interés para la industria alimentaria; (v) en la recuperación de los suelos áridos o semiáridos, caracterizados por condiciones de estrés osmótico (por salinidad, desecación o frío) mediante la obtención de plantas transgénicas capaces de tolerar altas concentraciones de sal gracias a los genes implicados en la osmotolerancia de las bacterias halófilas.

***Nocardia cyriacigeorgica*: primer caso reportado en México**

Sánchez Saucedo Nora Lidia, Ríos Ramírez Ricardo, Sandoval y Trujillo Ángel Horacio

DSBC, UAM-Xochimilco

Se identificó *Nocardia cyriacigeorgica* a partir de una biopsia de pulmón, de un paciente de dos años de edad, con seis ingresos previos por neumonía en el Hospital Infantil de México, "Federico Gómez", hasta donde sabemos, este es el primer caso reportado en México. A nivel internacional, hay sólo dos reportes de aislamientos en pacientes inmunocomprometidos y fue propuesta como nueva especie en el año 2001, por Yassin, et. al, aislada de secreciones bronquiales de un paciente con bronquitis crónica. *Nocardia cyriacigeorgica*, es grampositivo, ramificado, de crecimiento abundante a las 24 horas, presenta en agar BHI, colonias blancas, pulverulentas, rugosas y de bordes irregulares, las bioquímicas convencionales de identificación de actinomicetos patógenos, hidrólisis de caseína, xantina, hipoxantina y descomposición de tirosina fueron negativas, curiosamente, esta cepa no es ácido resistente tanto por la técnica de Zihel-Neelsen como la de Kinyoun. En el análisis quimiotaixonómico, mostró que tiene meso-DAF en su pared celular, presenta ácidos micólicos y ácido tuberculoesteárico, se determinó la utilización de algunos sustratos por medio de las Galerias de identificación API-20E, y solamente utiliza, gelatina, lisina, ornitina, citrato arginina, orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido, y descompone urea. Es una cepa altamente resistente a los antibióticos, pues solamente fue sensible a amikacina y minociclina, con una sensibilidad intermedia para ciprofloxacina y cefalotina, es resistente a polimixina, rifampicina piperacilina, carbencilina bacitracina, vancomicina, cefotaxima, ampicilina y eritromicina. Para la identificación final, se procedió a realizar la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr, dando como resultado *N. cyriacigeorgica* con 98% de similitud. El género *Nocardia*, cuenta con 17 especies validadas en la DSM, pero existen muchas más sin validar, las nuevas técnicas de biología molecular han permitido la descripción de cepas, que con las pruebas bioquímicas convencionales y/o quimiotaixonómicas, no es posible identificar, como sucedió con este primer caso reportado en México de *N. cyriacigeorgica* que bien pudiera considerarse una *Nocardia* atípica.

La heterogeneidad existente en el género *Nocardia*, no hace fácil su identificación, es necesaria, pues, una amplia revisión de las nuevas especies, incluso las que aún no han sido validadas para tener la certeza de cual es la especie de *Nocardia* se está caracterizando, las bioquímicas convencionales dejan fuera a muchas especies nuevas, que requieren el uso de técnicas de biología molecular. El avance de los diversos padecimientos que cursan con algún grado de inmunosupresión, permiten el surgimiento de especies, que posiblemente, antes no era posible identificar, confundiendo con otras ya conocidas, cuyos patrones bioquímicos son muy parecidos. Desde el punto de vista epidemiológico es necesaria ya una verdadera cooperación internacional, para evitar el avance, lento, pero constante, de infecciones oportunistas, permitiendo un diagnóstico rápido y eficiente que pueda estar al alcance de cualquier laboratorio de identificación a nivel clínico.