

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Informe de Servicio Social
por Investigación

Aislamiento y caracterización de bacterias heterótrofas halotolerantes, provenientes de dos estanques en las Salineras Chiquitas (Zapotitlán Salinas, Puebla)

Presenta:

Miriam Pulido Flores

(Matrícula: 2183069821)

Asesoras

Dra. María Teresa Núñez Cardona

(Número económico 14473)

Departamento del Hombre y su Ambiente
Laboratorio de Plancton y Bioenergética

Dra. Patricia Castilla Hernández

(Número económico 30606)

Departamento del Hombre y su Ambiente
Laboratorio de Biotecnología Ambiental

México, Ciudad de México

mayo 18 de 2026

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, por darme la oportunidad de cumplir mi gran sueño, de ser Bióloga, en donde he crecido académicamente y personalmente, siempre abierta al tiempo, a mi tiempo

Agradezco a mi madre María del Carmen Flores y a mis hermanas María Guadalupe y Carol Alondra Pulido por haberme apoyado y escuchado de mis experiencias y lo que aprendí en laboratorio y en el viaje de campo. A mi compañero de vida, Daniel González, por haberme apoyado en todo el trayecto de la licenciatura en biología y a nuestro hijo Mael que siempre ha sido el impulso para que me esfuerce a continuar y desear contribuir en mejorar un mundo donde él pueda crecer y ser feliz.

Agradezco a mi profesora y asesora la Doctora María Teresa Núñez Cardona por haberme enseñado las técnicas de laboratorio que me permitieron hacer mi proyecto de investigación; así como enseñarme a muestrear en campo y darme su tiempo para instruirme en la redacción de mi trabajo. Además de fomentarme y apoyarme para realizar más actividades académicas para mejorar como profesionista.

Agradezco a mi asesora la Doctora Patricia Castilla Hernández por su apoyo académico, tiempo desarrollar y concluir este trabajo de investigación.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, en cada uno de ellos aprendí algo y además de que me ayudaron a llevar a cabo mis actividades experimentales. Deseo que tengan éxito como futuros biólogas y biólogos.

Agradezco a los productores de las Salineras Chiquitas, especialmente al Sr. Juan Diego Hernández Cortés, por su apoyo para la colecta de las muestras de agua y compartir sus conocimientos sobre la producción de sal y la biodiversidad de la reserva de la Biosfera Cuicatlan-Zapotitlan. También agradezco a los pobladores del municipio Zapotitlán Salinas por su hospitalidad, especialmente a la Sra. Josefina Pacheco Palacios y al Sr. Pedro Mendoza Navarro, de El Calvario (Zapotitlan Salinas). Espero que este trabajo ayude a visualizar la importancia que tiene preservar, cuidar, visitar y estudiar este importante lugar, donde residen muchas especies endémicas, así como su importancia histórica y económica para los habitantes de esta reserva.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS	7
4. METODOLOGÍA	
4.1 Área de estudio	7
4.2 Colecta y procesamiento de las muestras	9
4.3 Aislamiento de colonias bacterianas y obtención de cultivos puros	9
4.4 Caracterización fenotípica de los cultivos puros	9
4.5 Producción de compuestos bioactivos	10
4.6 Producción de antibacterianos	11
5. ACTIVIDADES REALIZADAS	12
6. METAS ALCANZADAS	12
7. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	13
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
9. VISTO BUENO DE LAS ASESORAS	20

1. RESUMEN

Microorganismos como las bacterias, pueden crecer en diversos hábitats, incluso en lugares inimaginables por sus condiciones físicas y químicas extremas tales como la concentración alta de sales, a las que habitan en estos ambientes se les conoce como bacterias halófilas; también hay halotolerantes, capaces de crecer a concentraciones de sal altas, pero esta no es esencial para su crecimiento. En la región de las Salineras Chiquitas en Zapotitlán, los pobladores producen sal a partir de aguas provenientes de pozos, sitios donde habitan bacterias halófilas y halotolerantes. En el presente estudio se colectaron muestras de agua provenientes de dos estanques; en estas se cuantificaron las UFC/mL, empleando tres medios de cultivo: agar nutritivo, TCBS y MacConkey. En el estanque etiquetado como S1D, en agar nutritivo las UFC/mL fueron 3.6×10^3 y en el S2A fueron 3.3×10^3 UFC/mL; en agar TCBS hubo crecimiento positivo en el estanque S2A (20 UFC/mL) y en el agar MacConkey no hubo crecimiento bacteriano. Se hicieron aislamientos de colonias a partir de los cultivos en agar nutritivo (de los dos sitios de muestreo) y se obtuvieron en total 38 cultivos puros de bacterias halotolerantes, de las cuales: 89% fueron bacilos Gram positivos, 8% cocos Gram positivos y 3% cocos Gram negativo. Estos cultivos fueron caracterizados mediante la aplicación de pruebas bioquímicas convencionales; se observó que catabolizaron principalmente a la fructosa (89%), glucosa (79%) y dextrosa (79%). El 41% redujo nitratos y 20% a los nitritos con producción de gas nitrógeno. Todos los cultivos produjeron gelatinasa, 47% amilasa, 74% ADNasa, 68% lipasa y 3% ureasa. Se aislaron dos cultivos bacterianos con la capacidad de producir antibacterianos (SAA1 y SAA2); el cultivo SAA1 inhibió el crecimiento de seis cepas de colección (*Brevundimonas diminuta*, *Bacillus vietnamensis*, *Bacillus aryabhattai*, *Exiguobacterium indicum*, *Bacillus paramycoides* y *Kocuria indica*) y el cultivo SAA2 inhibió cinco (*Brevundimonas diminuta*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhattai*, *Exiguobacterium indicum* y *Bacillus cereus*). Se aislaron bacterias halotolerantes las cuales coinciden sus características fenotípicas con ciertos géneros como: *Bacillus*, *Salinicoccus*, *Halomonas* y *Vibrio*; con la capacidad de producir enzimas extracelulares y antimicrobianos, que podrían resultar importantes para diversas actividades biotecnológicas.

Palabras clave: aislamiento, halotolerantes, heterótrofas, salineras, antimicrobianos.

2. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Costa y Cerletti (2021) los organismos halófilos se clasifican como: 1) leves (concentración de NaCl entre 2 a 5%), 2) moderados (de 5 a 20% NaCl) y 3) extremos (de 20 a 30% NaCl) y los denominados halófilos que requieren de NaCl para su crecimiento óptimo, los organismos halotolerantes toleran ciertas concentraciones, pero no es esencial para su desarrollo (Costa y Cerletti, 2021).

Las bacterias halotolerantes presentan estrategias para evitar la pérdida excesiva de agua debida a la saturación de NaCl, por lo que gracias a las adaptaciones que han adquirido durante su proceso de evolución, pueden sobrevivir en ambientes extremos. Dentro de las adaptaciones celulares que presentan, está la producción de osmoprotectores, que consiste en aumentar la actividad del citoplasma osmótico con la síntesis y acumulación de solutos compatibles, para ajustarse al ambiente que les rodea o bien, alcanzar el estado de equilibrio al aumentar las concentraciones de sal para que coincida la de su citoplasma con las concentraciones de su entorno (Costa y Cerletti, 2021; Santhaseelan et al., 2022). Otra estrategia consiste en la producción de moléculas como por ejemplo osmolitos, que se posicionan fuera de la célula, con la finalidad de proteger la proteína celular de la desnaturalización (Santhaseelan et al., 2022).

En los últimos años, se ha estudiado a las bacterias halotolerantes que habitan ambientes salinos, para ser utilizadas en diferentes procesos biotecnológicos y en la producción de fármacos (Ej. antibióticos); además han resultado ideales para una serie de aplicaciones industriales por su capacidad de tolerar altas o bajas temperaturas, pH ácidos o alcalinos y alta salinidad, proporcionando un menor costo de producción, además de la disminución en la utilización de energía y fácil recuperación de los productos que requieren condiciones extremas (Costa y Cerletti, 2021); así mismo, estas bacterias participan en los ciclos biogeoquímicos, la formación y disolución de carbonatos, la inmovilización de fosfatos y la producción de factores de crecimiento y nutrientes (Thompson y Gilmor, 2023); se han identificado bacterias halófilas y halotolerantes para obtener compuestos bioactivos dentro de los cuales están metabolitos con actividad antibacteriana (Conde-Martínez et al., 2017).

Este tipo de bacterias también han sido utilizadas en la acuicultura para prevenir enfermedades en estos procesos productivos, además de mejorar la calidad del agua; se han realizado estudios para determinar su papel en la nitrificación y desnitrificación heterótrofa, proporcionando un recurso microbiano alternativo, eficaz y seguro para el tratamiento de eliminación de nitrógeno del agua y desechos de la acuicultura marina; su uso en la biorremediación para el control de la calidad del agua en los sistemas de cultivo de camarón, es otro ejemplo de su aplicación en procesos productivos (Huang et al., 2017). Entre las bacterias, halófilas se han encontrado miembros de los Phyla Cyanobacteria, α -Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes y Bacteroidetes (Thompson y Gilmor, 2023).

En las Salineras las Chiquitas, desde la segunda mitad del siglo XVI hasta la actualidad la sal ha sido un recurso muy importante para los pobladores del Valle de Tehuacán (Puebla), para obtener este mineral se utiliza agua de un manantial inmerso en un estrato geológico. El origen de este recurso se debe a que, en el pasado, parte del Valle de Tehuacán, fue cubierto por agua de mar, en los periodos Cretácico y Jurásico (Serrano et al. 2018; Williams, 2021).

Se han realizado muy pocos estudios acerca de los microorganismos halófilos y halotolerantes en el Valle de Tehuacán, sin embargo, recientemente Cortés-Camargo et al. (2021) aislaron bacterias, pertenecientes al género *Bacillus*, productoras de biosurfactantes en estanques de agua salada de la reserva de Tehuacán.

El género *Bacillus* fue descrito por Cohn (1872) como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor, las cuales les permiten habitar en diversos ecosistemas acuáticos, terrestres y en condiciones extremas, ya que las endosporas (ovales o cilíndricas) funcionan como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés. Las especies del género *Bacillus* pertenecen al Dominio Bacteria; Phylum Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae; sus características generales son el crecimiento aerobio, anaerobio facultativo o estricto, son Gram positivas, con morfología bacilar, movilidad flagelar; su talla es variable (0.5 a 10 μm); su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (crecimiento óptimo entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica está asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Villarreal-Delgado et al., 2018). El género *Bacillus* posee una gran cantidad de especies productoras de antimicrobianos (Thompson y Gilmore, 2023), y han mostrado contar con actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos, logrando que estos no se establezcan ni se desarrollen, para ello cuentan con la producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas; también inducen la resistencia sistémica de las plantas (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Dentro de los géneros bacterianos que cuentan con especies halotolerantes están *Salinicoccus* y *Halomona*. El género *Salinicoccus* (familia Staphylococcaceae), son cocos Gram positivos, aerobios, inmóviles y no forman esporas (Talwar et al., 2020; Dutta et al., 2023). Producen compuestos con varias aplicaciones biotecnológicas como es la producción de enzimas extracelulares, útiles, por ejemplo, en procesos de biorremediación, desarrollo de colorantes, biocombustibles y en la industria farmacéutica (Dutta et al., 2023).

El género *Halomonas*, descrito en 1980, pertenece a la familia Halomonadaceae, Orden Oceanospirillales, Clase Gamma-Proteobacteria (Wang y Shao, 2021). Las bacterias halotolerantes pertenecientes del género *Halomonas* son Gram negativas, heterótrofas de crecimiento rápido; son aerobias o anaerobias facultativas y no esporulan. Este género puede habitar ambientes salinos (suelo y agua) gracias a su capacidad de producir solutos compatibles (ectoína, glicina betaína e hidroxiectoína), biopolímeros (exopolisacáridos y

polihidroxicanoato) y biosurfactantes; degradar compuestos aromáticos y de reducir los nitratos (Wang y Shao, 2021; Pérez et al., 2023).

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* se han identificado como especies marinas, las cuales pueden producir metabolitos con potencial antibacteriano y citotóxico (al ser aislados en cultivos mixtos), aunque aún no se comprende por qué motivo no hay tal actividad biológica al ser cultivados individualmente (Conde-Martínez et al., 2017).

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aislar, caracterizar y determinar la producción de compuestos bioactivos por bacterias heterótrofas halotolerantes provenientes del agua en dos estanques de las Salineras Chiquitas (Zapotitlán Salinas, Puebla)

Objetivos específicos

- Cuantificar bacterias heterótrofas halotolerantes que habitan en los estanques de la Salineras Chiquitas
- Caracterizar fenotípicamente a las bacterias heterótrofas halotolerantes, aisladas de los estanques de la Salineras Chiquitas
- Determinar la capacidad de cultivos bacterianos aislados de las Salineras Chiquitas para producir antibacterianos y enzimas extracelulares

4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

En la figura 1 se señala la localización de Zapotitlán Salinas. En esta región, de la Sierra Madre del Sur, dentro de la cuenca del río Tehuacán se conecta con el río Zapotitlán o río Salado, el cual posee altas concentraciones de sales en sus aguas. El suelo está compuesto por concentraciones de carbonato de calcio con mínimas capas de humus (Serrano et al., 2018). Las Salineras Chiquitas son nombradas Paraje salinero, donde producen la sal gracias a un clima seco con escasez de agua, con lluvias irregulares y torrenciales solo en verano, además de temperatura y vientos que ayudan a la evaporación de la sal. El paraje se localiza a un lado de pozos con agua, este material primario es esencial para la producción de sal; en la figura 2 se señala la localización de las Salineras Chiquitas (Castellón, 2016).

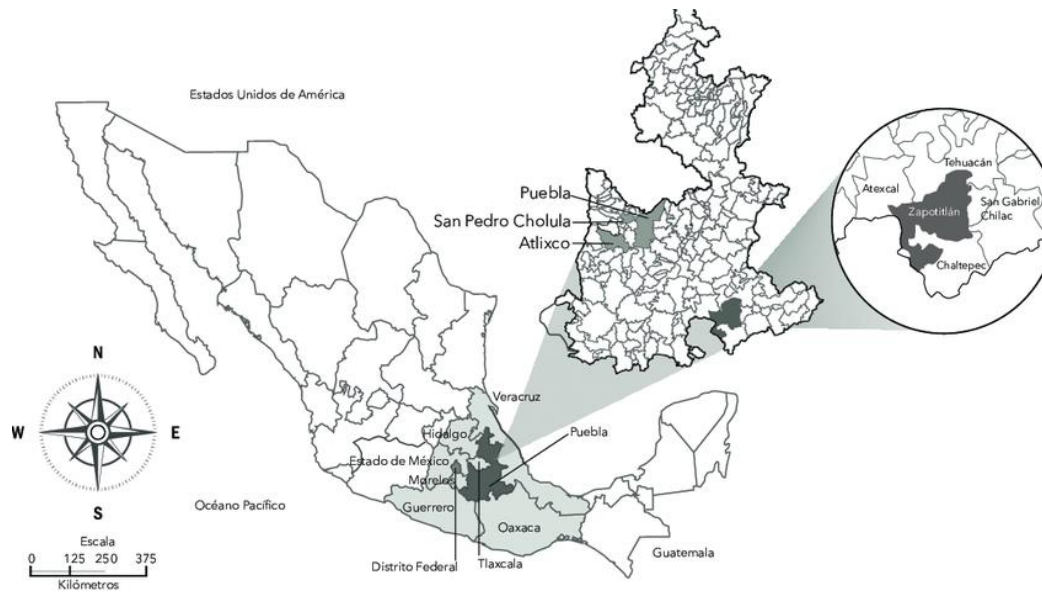
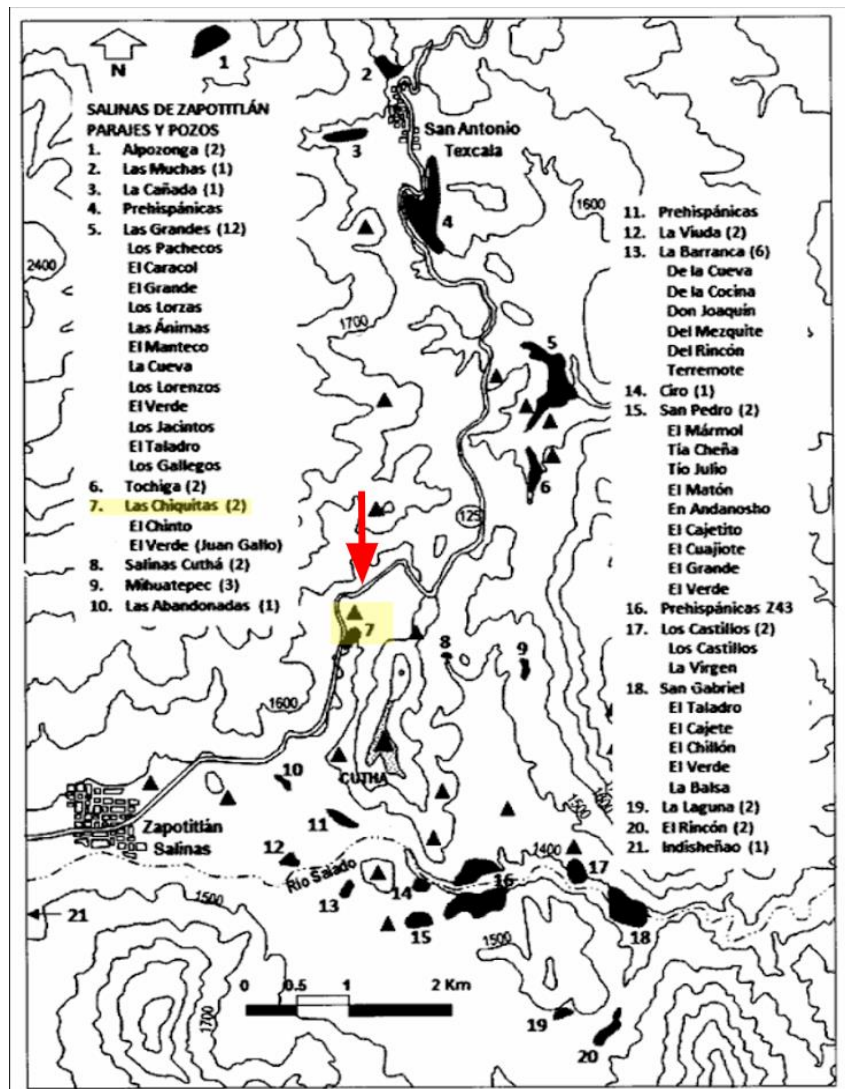


Figura 1. Ubicación de la zona de las Salineras Chiquitas, Zapotitlán Salinas, Tehuacán (Serrano et al., 2018).



4.2 Colecta y procesamiento de las muestras

Se colectaron muestras de agua de dos estanques de las Salineras Chiquitas (figura 3), para ello se utilizaron frascos estériles de plástico de 100 ml de capacidad. *In situ*, se procesaron las muestras, se realizaron diluciones seriadas con solución salina al 0.08% (NaCl) y con 0.1 ml de estas fueron inoculadas cajas Petri conteniendo agar nutritivo (medio de cultivo general) y dos medios de cultivo selectivos: Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), específico para género de *Vibrio* y agar MacConkey (específico para la familia Enterobacteriaceae). Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente durante 24-48 horas; finalmente se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada uno de estos.



Figura 3. Ubicación de los puntos de muestreo: estanques S1D y S2A.

4.3 Aislamiento de colonias bacterianas y obtención de cultivos puros

A partir de las colonias crecidas en agar nutritivo, se realizaron aislamientos de colonias al azar, estas fueron resembradas en viales conteniendo agar nutritivo, después de 24 h de incubación, los cultivos fueron conservados a 5 °C, se aplicó la técnica de siembra y resiembra para obtener cultivos puros, esto último se verificó mediante observaciones al microscopio óptico, previa tinción de Gram. Para conservar los cultivos puros, estos fueron resembrados en viales con agar nutritivo y conservados a 5 °C.

4.4 Caracterización fenotípica de los cultivos puros

Para la caracterización de los cultivos puros se hicieron registros de la morfología celular, la presencia de esporas y su respuesta a la tinción de Gram; se determinó la capacidad de catabolizar carbohidratos y al citrato como fuentes de carbono y energía, además de su metabolismo respiratorio, y su capacidad de producir compuestos bioactivos como son las enzimas extracelulares.

Para la caracterización morfológica se aplicó la tinción de Gram y se hicieron registros de sus formas celulares y de su respuesta a esta tinción. Para esto último se utilizó un kit comercial y se utilizaron cultivos incubados a 28 °C durante 24 h.

Para determinar el catabolismo de los cultivos bacterianos, se utilizaron los sustratos: manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa, sacarosa y maltosa (5 g/L), en base rojo fenol (15 g/L) y agua destilada, se incubaron durante 24 h a 28 °C, el cambio de color en el medio de cultivo de naranja a amarillo o de naranja a rojo, indicó la utilización de los sustratos por los cultivos bacterianos.

También se utilizó Citrato de Simmons para determinar la utilización de este sustrato como única fuente de carbono y energía. Se utilizó la fórmula comercial que considera 22 g citrato de Simmons compuesto por: amonio dihidrogenofosfato (1 g/L), di-potasiohidrógeno fosfato (1 g/L), cloruro de sodio (5 g/L), citrato de sodio (2 g/L), sulfato de magnesio (0.2 g/L), azul de bromotimol (0.08 g/L) y agar-agar (12 g/L) en agua destilada. En este medio inclinado en pico de flauta se inocularon e incubaron durante 24 h a 28 °C, se registró la presencia de un cambio de color de verde a azul, lo que indicó una respuesta positiva, esto confirmó que el cultivo utilizó al sustrato.

Se determinó la capacidad de los cultivos para reducir nitratos y nitritos, para ello se utilizó un medio líquido compuesto por caldo nutritivo (8 g/L), nitrato de potasio (1 g/L) en 1000 mL de agua destilada; se colocó una campana de Durham, en los tubos, para determinar la producción de gas. Los cultivos, se incubaron durante 24 horas a 28 °C, pasado este tiempo, se les agregaron 10 gotas de los reactivos A y B de Griess (ácido alfa-naftilamina 1N y ácido sulfanílico 1N). Cuando los cultivos reducen los nitratos hay un cambio de color en el cultivo de amarillo transparente a rojo, si no había cambio en el medio se agregó Zinc (Zn) y al presentar un vire a rojo la reducción de nitritos y nitratos fue negativa; el no mostrar cambio de color indicó que hay reducción de nitratos y nitritos, además, si la campana de Durham en el tubo subió demostró producción de gas nitrógeno.

4.5 Producción de enzimas extracelulares

Para determinar la capacidad de los cultivos bacterianos para producir compuestos bioactivos, se utilizaron medios específicos para la producción de ureasa, amilasa, ADNasa, lipasa y gelatinasa y de antibacterianos. Con excepción de la ureasa, para determinar la capacidad de los cultivos de producir enzimas extracelulares, se utilizaron cultivos líquidos en caldo nutritivo (1 hora de incubación a 28 °C) y se inocularon con un asa de vidrio con un disco de 1.0 cm de diámetro, en uno de sus extremos; se inocularon diez cultivos puros por caja Petri conteniendo los medios específicos para cada una de las enzimas ensayadas y se describen en los párrafos siguientes:

Ureasa: agar bacteriológico (15.0 g/L), urea (29.0 g/L) con agua destilada. Se agregó en tubos de ensaye en pico de flauta, se inocularon e incubaron, después de 24 h se consideró que había producción de esta enzima cuando se observó en el medio de cultivo cambio de color de amarillo pálido a rosa.

Amilasa: caldo nutritivo (8.0 g/L), agar bacteriológico (15.0 g/L), almidón soluble (1.5 g), cloruro de sodio (5.0 g/L) con agua destilada. Para determinar la producción de la enzima amilasa se agregó lugol en los cultivos inoculados durante 24 h a 28 °C, la presencia de un halo transparente alrededor del inóculo indicó producción de amilasa.

Gelatinasa: caldo nutritivo (8.0 g/L), agar bacteriológico (15.0 g/L), gelatina bacteriológica (4.0 g/L) con agua destilada. Se inocularon los cultivos sobre el agar, después de 24 h a 28 °C de incubación al cultivo se le colocó cloruro mercúrico, la presencia de un halo transparente alrededor del inóculo, denotó la capacidad de producir gelatinasa.

Lipasa: caldo nutritivo (8.0 g/L), agar bacteriológico (15.0 g/L), Tween 80 (10.0 ml/L) y agua destilada. Se determinó la producción de la enzima por la presencia de cristales alrededor del inóculo, después de incubar durante 24 h a 28 °C.

ADNasa: ADNasa comercial (BD 42.0 g/L) compuesto por: Tripteína (20.0 g/L), cloruro de sodio (5.0 g/L), ácido desoxirribonucleico (2.0 g/L) y agar (15.0 g/L). Después de 24 horas a 28 °C de incubación, se colocó ácido clorhídrico (1N) al cultivo (inóculo), la presencia de un halo transparente alrededor del inóculo indicó la producción de ADNasa.

4.6 Producción de antibacterianos

Para determinar la producción de antimicrobianos por los cultivos bacterianos puros se utilizaron cajas Petri con agar Müller-Hinton (Dibico) que contiene: agar (17.0 g/L), almidón (15.0 g/L), extracto de carne de res (2.0 g/L) y peptona de caseína (17.5 g/L). Fueron estriadas, individualmente, cepas de colección (*Brevundimonas diminuta*, *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus nitratreducens*, *Bacillus paramycoides*, *Stenotrophomonas* sp., *Exiguobacterium indicum* y *Exiguobacterium profundum*); seguido se colocaron discos de papel filtro estériles (0.5 cm de diámetro), impregnados con cultivos líquidos de bacterias aisladas de las Salineras Chiquitas (productores de antimicrobianos); se incubaron durante 16 a 18 h a 28 °C; se hicieron registros del halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del inóculo lo cual, indicó que los cultivos aislados tienen la capacidad de producir antibacterianos (Núñez-Cardona, 2024, comunicación personal). Se realizaron registros de las medidas de los halos de inhibición en cm.

5. ACTIVIDADES REALIZADAS

Se llevó a cabo la consulta de publicaciones especializadas en revistas científicas, libros, tesis para la elaboración del proyecto.

Se preparó el material para el trabajo de campo que incluyó la preparación de medios de cultivo, tanto selectivo (TCBS y MacConkey) y no selectivo (agar nutritivo).

Se colectó agua de dos estanques provenientes de las Salineras Chiquitas, en frascos estériles de plástico, con capacidad de 10 ml.

Se procesaron las muestras de agua mediante diluciones seriadas en solución salina (NaCl) al 0.08% y con 0.1 ml de estas se sembraron en cajas Petri conteniendo agar nutritivo (medio no selectivo); también se procesaron las muestras, sin diluir, en los medios TCBS y MacConkey.

Se llevó a cabo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) y se aislaron los cultivos, provenientes de agar nutritivo, en viales con agar nutritivo, para conservarlos a 5 °C.

A partir de las colonias crecidas en agar nutritivo, se hicieron aislamientos al azar y fueron colocados en viales con agar nutritivo (inclinado), se les aplicó la tinción de Gram y se realizaron observaciones al microscopio óptico para determinar su pureza.

A los cultivos mixtos resultantes se les aplicó la técnica de siembra y resiembra hasta contar con cultivos puros. Todos los cultivos puros fueron conservados en viales con agar nutritivo, a 5 °C, para su caracterización posterior.

Los cultivos fueron caracterizados fenotípicamente considerando su capacidad de catabolizar: glucosa, fructosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, dextrosa, maltosa; así como citrato de Simmons.

Se prepararon medios de cultivo para la producción de compuestos bioactivos como enzimas extracelulares (amilasa, lipasa, gelatinasa, ADNasa y ureasa).

Se preparó medio agar Müller-Hinton en cajas Petri para el ensayo de producción de antibacterianos, solo se utilizaron dos cultivos puros provenientes de muestras de agua de dos estanques de las Salineras Chiquitas, después de 16 a 18 h se midieron y registraron los halos de inhibición de crecimiento de cepas de colección.

6. METAS ALCANZADAS

Se realizó el muestreo, se procesaron y se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC); en el medio agar nutritivo, en TCBS y agar MacConkey.

Se caracterizaron fenotípicamente a 38 cultivos bacterianos halotolerantes heterótrofos mediante su capacidad de catabolizar sustratos como glucosa, fructosa y dextrosa, lactosa, maltos, sacarosa, sorbitol, manitol y citrato. Así mismo se determinó el metabolismo

respiratorio aerobio y anaerobio facultativo y la capacidad de reducir los nitratos y nitritos, así como, liberar gas nitrógeno.

Se determinó la capacidad de producir enzimas extracelulares como amilasa, ADNasa, lipasa, ureasa y gelatinasa. También se determinó la capacidad de producir antimicrobianos en dos cultivos bacterianos puros seleccionados.

7. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la tabla 1 se presentan las unidades formadoras de colonias (UFC/ mL) en los medios de cultivo: agar nutritivo y TCBS; no se cuantificaron UFC/ mL en agar MacConkey ya que no hubo crecimiento bacteriano. En el estanque S1D, solo se cuantificaron, en agar nutritivo, 3.6×10^3 UFC/mL en el estanque S1D. En el estanque S2A se cuantificaron 3.3×10^3 UFC/mL en agar nutritivo y 20 UFC/ mL en agar TCBS. Conde-Martínez et al. (2017) aislaron una bacteria proveniente de muestras de salmuera y sedimento en estanques salinos, en La Guajira, Colombia; tal colonia fue identificada como *Vibrio* sp. A1SM3–36-8, la cual es moderadamente halotolerante.

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en MacConkey, TCBS y agar nutritivo inoculados con agua provenientes de dos estanques de las Salineras Chiquitas.

Estanque	Medios de cultivo		
	Agar nutritivo	TCBS	MacConkey
S1D	3.6×10^3 UFC/mL	0	0
S2A	3.3×10^3 UFC/mL	20 UFC/mL	0

Se obtuvieron 22 cultivos bacterianos en el estanque etiquetado como S1D; mientras que en el estanque S2A se aislaron 16 cultivos. La forma celular bacteriana predominante en los dos estanques fue la bacilar con respuesta positiva a la tinción de Gram, para el estanque S1D el 14% de los cultivos fueron cocos con respuesta a tinción de Gram positivo y un 5% coco Gram negativo. El 45% de los aislados bacterianos del estanque S1D produce endosporas, con el 88% los del estanque S2A.

Bhatt y Singh (2022) y Bautista (2024) aislaron bacterias Gram positivas de ambientes salinos y señalaron que bacterias con estas características logran habitar tales ambientes gracias a su capacidad de esporular, lo que les permite adaptarse tanto a ambientes salinos como no salinos. Lo anterior coincide con lo registrado en el presente trabajo, pues se observó que entre el 45 y 88% de los aislados presentan la capacidad de producir endosporas que les facilita sobrevivir en ambientes adversos y regresan a su forma inicial cuando las condiciones les son favorables.

En la figura 4 se presenta el porcentaje (%) de cultivos con capacidad de catabolizar los sustratos ensayados. Los aislados de ambos estanques catabolizan principalmente a la glucosa (el 94% de los cultivos del sitio S2A utilizan este sustrato y 68% las del estanque S1D), fructosa (100% de los cultivos del estanque S2A y el 82% del estanque S1D) y dextrosa (todos los cultivos del sitio S2A y el 64% en el sitio S1D). El 81% de los aislados del estanque S2A emplearon sacarosa. Cabe señalar que los demás sustratos fueron catabolizados en porcentajes menores al 60%.

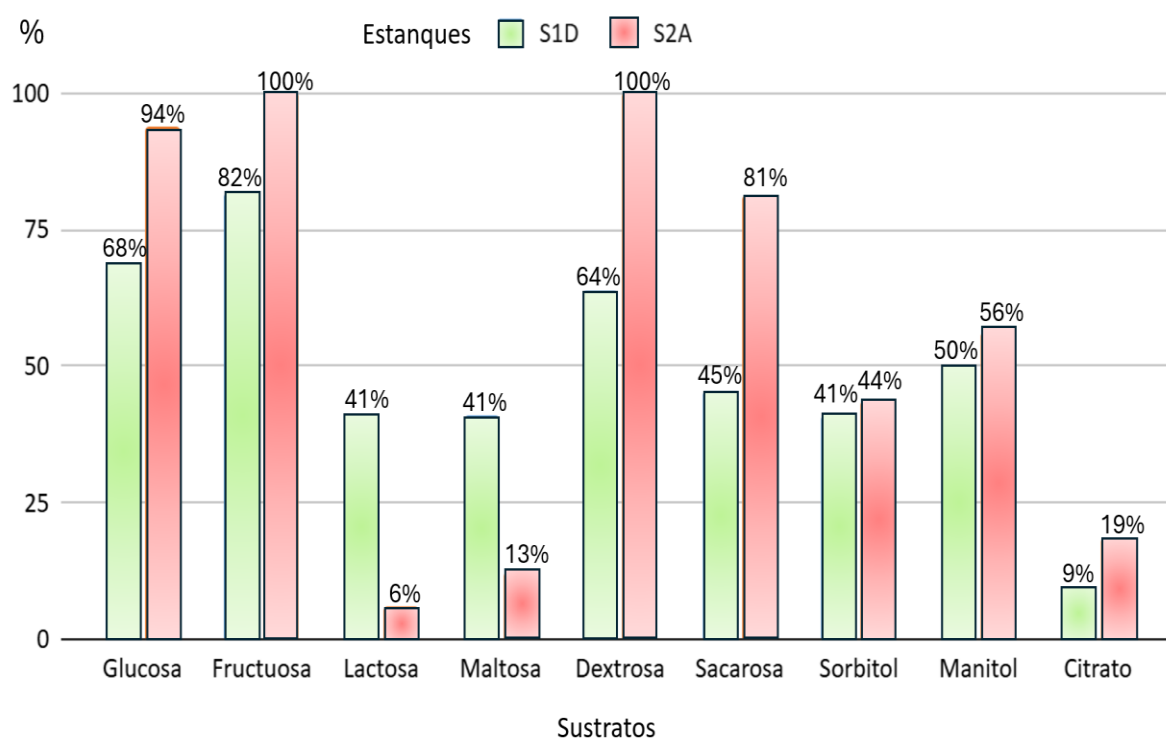


Figura 4. Número de cultivos (%) que catabolizaron los sustratos ensayados

En la figura 5 se presenta el porcentaje (%) de cultivos con la capacidad de reducir los nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) y liberar gas nitrógeno (N). El sitio S1D registró más aislados bacterianos (50%) capaces de reducir los NO_3^- ; mientras que el sitio S2A el 31% de los cultivos reducen a los NO_2^- y liberaron nitrógeno. Pérez et al. (2023) reportaron que dos de las bacterias halotolerantes, identificadas del género *Halomonas*, con capacidad nitrificante, eliminan amonio, el cual podría ayudar para el tratamiento de aguas residuales. También en el trabajo de Wang y Shao (2021) aislaron seis nuevas especies del género *Halomonas* con la capacidad de eliminar nitrógeno y sulfuro.

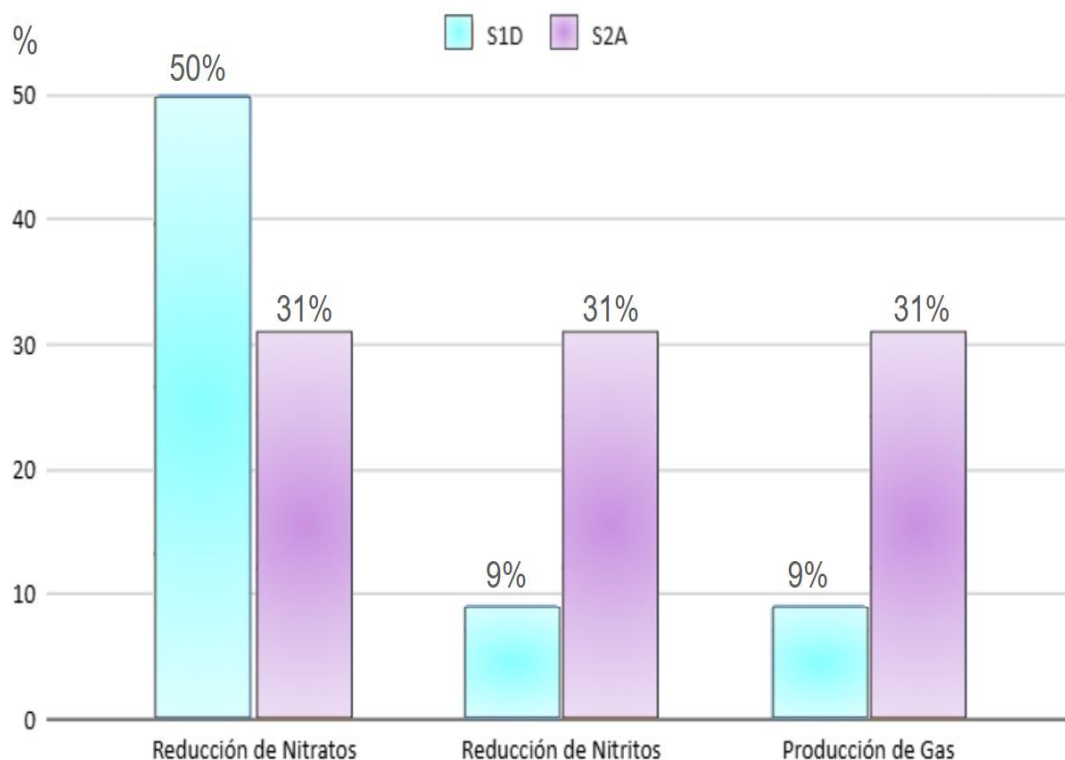


Figura 5. Número (%) de cultivos bacterianos, de los estanques S1D y S2A, con capacidad de reducir nitratos, nitritos y de producir gas nitrógeno.

En la figura 6 se presenta el porcentaje (%) de cultivos, por sitio de muestreo, con capacidad de producir enzimas extracelulares (gelatinasa, amilasa, ADNasa, lipasa o ureasa). Todos los aislados bacterianos de ambos sitios de muestreo produjeron gelatinasa. La mayoría de los cultivos del sitio S2A produjeron ADNasa y lipasa. En cuanto al sitio S1D los cultivos bacterianos produjeron todas las enzimas ensayadas pero el número de estos fue menor.

Pérez et al. (2023) aislaron bacterias pertenecientes del género *Halomonas*, a las que describieron fenotípicamente encontrando que algunos de los aislados producen ureasa; por otro lado Wang y Shao (2021) aislaron bacterias productoras de gelatinasa y ADNasa.

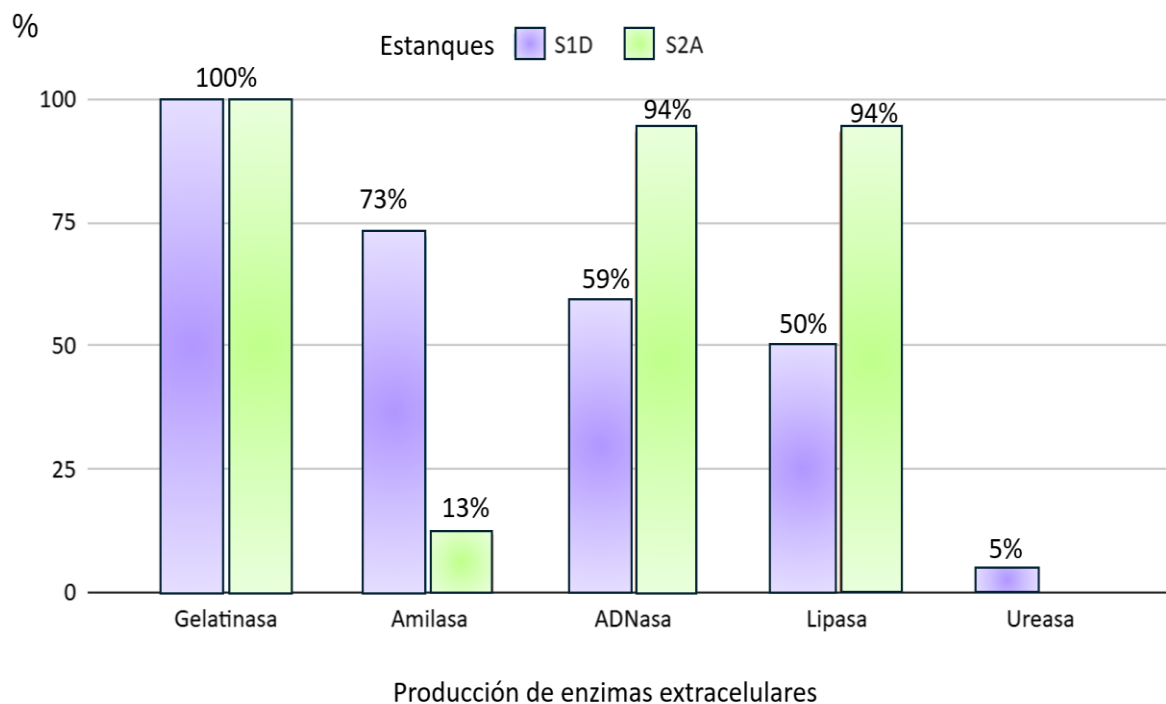


Figura 6. Porcentaje de cultivos bacterianos, de cada estanque, con capacidad de producir enzimas extracelulares: gelatinasa, amilasa, ADNasa, lipasa o ureasa.

En la tabla 2 se presentan los registros (promedio de tres ensayos) del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de cepas de colección por los aislados bacterianos.

El cultivo bacteriano SAA1 (de forma bacilar Gram positivo, productor de endoesporas), inhibió el crecimiento de las especies ensayadas *Brevundimonas diminuta*, *Bacillus vietnamensis*, *B. aryabhattai*, *Exiguobacterium indicum*, *B. paramycoides* y *Kocuria indica*. En cuanto al aislado bacteriano SAA2 también es un bacilo Gram positivo, productor de endoesporas; inhibió el crecimiento de *Brevundimonas diminuta*, *B. megaterium*, *B. aryabhattai*, *Exiguobacterium indicum* y *B. cereus*.

Azpiazu-Muniozguren et al. (2025) aislaron 20 cultivos de muestras de agua, identificados como bacterias halófilas y halotolerantes, los cuales tuvieron actividad antibacteriana contra al menos una de las cepas que ensayaron; ocho de estos cultivos tuvieron la capacidad de producir antimicrobianos en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En cuanto al trabajo de Perumal et al. (2024) aislaron una especie del género *Halomonas* halotolerantes capaz de producir antimicrobianos contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Tabla 2. Diámetro de los halos de inhibición (cm) formados por la exposición de cepas de colección a aislados bacterianos, provenientes de las Salineras Chiquitas

Cepas de colección	SAA1	SAA2
<i>Brevundimonas diminuta</i>	0.6	0.6
<i>Bacillus vietnamensis</i>	1.0	0
<i>Bacillus megaterium</i>	0	0.5
<i>Bacillus aryabhattai</i>	1.3	0.5
<i>Exiguobacterium indicum</i>	0.5	0.3
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0.7
<i>Bacillus nitratreducens</i>	0	0
<i>Bacillus paramycoides</i>	0.7	0
<i>Exiguobacterium profundum</i>	0	0
<i>Kocuria indica</i>	1.5	0

Con base en los resultados, se puede resaltar, que en las dos muestras de agua no se observó la presencia de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae pero en una muestra sí se presentaron colonias características del género *Vibrio*, un género habitual en ambientes marinos.

La mayoría de los aislados bacterianos fueron bacilos Gram positivos, los cuales presentan esporas que les permiten sobrevivir en ambientes extremos, tal como lo son las Salineras Chiquitas de donde fueron aisladas las bacterias, en el presente trabajo y que mostraron capacidad de catabolizar alguno de los sustratos ensayados, sinton fructosa, glucosa y dextrosa los más catabolizados; menos de la mitad de los cultivos bacterianos fueron capaces de a los nitratos y nitritos.

Los cultivos bacterianos aislados de los estanques de las salineras Chiquitas exhibieron capacidad de producir enzimas extracelulares y todos estos son capaces de producir gelatinasa; se aislaron dos cultivos con habilidad de producir antimicrobianos capaces de inhibir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azpiazu-Muniozguren M, Valgañon-Pérez E, García-Martínez M, Rodríguez-Paniagua A, Poppy CH, Justicia C, Martín J, de la Cruz MM, Reyes F, Laorden L, Martínez-Malaxetxebarria I, Martínez-Ballesteros I. 2025. Isolation of halophilic and halotolerant bacterial strains, screening for bioactive compounds and characterization of metabolites produced by *Pseudalteromonas* sp. ASV78. *Environmental Microbiology Reports* 17(70159): 1-13.
- Bautista JR. 2024. *Potencial antimicrobiano de cepas del género Bacillus spp. contra bacterias patógenas* [tesis]. Puebla de Zaragoza (PUE): Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 74 p.
- Bhatt HB, Singh SP. 2022. Diversity of cultivable bacteria in a saline Desert of Little Rann of Kutch, India: A Phylogenetic Perspective. *Frontiers in Marine Science* 9, 769043.
- Castellón HBR. 2016. Cuando la sal era una joya: antropología y tecnología de la sal durante el posclásico en Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Antropología e Historia. 296 p.
- Cohn F. 1872. Untersuchungen Über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1(2): 127-224.
- Conde-Martínez N, Acosta-González A, Díaz LE, Tello E. 2017. Use of a mixed culture strategy to isolate halophilic bacteria with antibacterial and cytotoxic activity from the Manaure solar saltern in Colombia. *BioMed Central* 17 (230): 1-12.
- Cortés-Camargo S, Acuña-Avila PE, Arrieta-Báez D, Montañez-Barragán B, Morato AI, Sanz-Martín JL, Barragán-Huerta BE. 2021. Biosurfactant production by *Bacillus tequilensis* ZSB10: structural characterization, physicochemical, and antifungal properties. *Journal of Surfactants and Detergents* 24(5): 773-782.
- Costa M, Cerletti M. 2021. Halófilos: la vida en la sal. *Instituto de Investigaciones Biológicas* 30(176): 38-43.
- Dutta B, Halder U, Chitikineni A, Varshney RK, Bandopadhyay R. 2023. Delving into the lifestyle of Sundarban Wetland resident, biofilm producing, halotolerant *Salinicoccus roseus*: a comparative genomics-based intervention. *BioMed Central Genomics* 24 (681): 1-15.
- González-Espinoza JE, Lemos-Espinal JA, Manríquez-Morán NL, Woolrich-Piña G. 2017. Reproductive cycle of the oviparous lizard *Sceloporus jalapae*, from Zapotitlán Salinas, Puebla, Mexico. *Acta Zoológica* 100: 36-42.
- Huang F, Pan LLN, Tang X. 2017. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 124(5): 564-571.

- Mejía-Sánchez D, Aranda-Ocampo S, Nava-Díaz C, Teliz-Ortiz D, Livera-Muñoz M, De la Torre-Almaráz R, Ramírez-Alarcón S. 2019. *Pectobacterium carotovorum* subsp. brasiliense causes soft rot and death of *Neobuxbaumia tetetzo* in Zapotitlán Salinas Valley, Puebla, México. *Plant Disease* 103 (3): 398-403.
- Pérez TS, Rojas SM, Prado CG, Zavaleta-Verde D. 2023. Diversidad de especies nativas *Halomonas* con capacidad nitrificante aisladas de criaderos de *Litopenaeus vannamei*. *Manglar* 20 (4): 415-420.
- Perumal K, Seenuvasan J, Nandhagopal M, Manivannan N. 2024. Antimicrobial properties of secondary metabolites produced by *Halomonas* sp.: A halophilic bacterium. *Cureus* 16(9): 1-13.
- Santhaseelan H, Dinakaran VT, Dahms HU, Ahamed JM, Murugaiah SG, Krishnan M, Hwang JS, Rathinam AJ. 2022. Recent antimicrobial responses of halophilic microbes in clinical pathogens. *Microorganisms* 10 (417): 1-19.
- Serrano BRC, Rodríguez MG, Palmas CYD. 2018. Relaciones intra e intergénero en un proyecto de turismo rural. El caso de la Ruta de la Sal Prehispánica en Zapotitlán Salinas, Puebla, México. En: Thomé OH, Renard HMC, Palmas CYD. *Turismo y género una mirada desde Iberoamérica*. Estado de México (MEX): Universidad Autónoma del Estado de México. p 111-143.
- Talwar C, Kumar SA, Choksket S, Korpole S, Lal R, Krishan NR. 2020. *Salinicoccus cyprini* sp. nov., aislado del intestino de la carpa espejo, *Cyprinus carpio* var. *specularis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70: 4111-4118.
- Thompson TP, Gilmore BF. 2023. Exploring halophilic environments as a source of new antibiotics. *Critical Reviews in Microbiology* 50(3): 341-370.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.
- Wang L, Shao Z. 2021. Aerobic denitrification and heterotrophic sulfur oxidation in the genus *Halomonas* revealed by six novel species characterizations and genome-based analysis. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-22.
- Williams E. 2021. Salt-making in mesoamerica: production sites and tool assemblages. *Ancient Mesoamerica* 34 (1): 1-23.

9. VISTO BUENO DE LAS ASESORAS



Dra. María Teresa Núñez Cardona

No. Económico 14473

Departamento del Hombre y su Ambiente,
Laboratorio de Plancton y Bioenergética



Dra. Patricia Castilla Hernández

No. Económico 30606

Departamento del Hombre y su Ambiente,
Laboratorio de Biotecnología Ambiental