

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE SAL
PROVENIENTE DE LA LAGUNA DE CUYUTLÁN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO**

P R E S E N T A:

HECTOR ULISES MANDRAKEZ FLORES

CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: MARTHA GILES GÓMEZ

VOCAL: Profesora: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SECRETARIO: Profesora: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

1er. SUPLENTE: Profesor: EDGAR AXEL DONJUAN GUERRERO

2° SUPLENTE: Profesor: JAVIER AXOSCO MARIN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 312, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

SE RECONOCE EL FINANCIAMIENTO DE ESTE PROYECTO A PAIP FQ CON LA CLAVE 5000-9102.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SUPERVISOR TÉCNICO:

M EN C. CINDY ADRIANA ESTRADA HERNANDEZ

SUSTENTANTE:

HECTOR ULISES MANDRAKEZ FLORES

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

SE AGRADECE AL PROFESOR Q.F.B ALEJANDRO CAMACHO CRUZ POR LA DONACIÓN DE LAS TIRAS PARA LA PRUEBA DE OXIDASA.

SE AGRADECE AL DR. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ POR LOS CONSEJOS BRINDADOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.

Índice de contenido

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
2.1. Sal.....	2
2.2. Queso	3
2.3. Queso Cotija	4
2.4. Determinantes en el crecimiento de los microorganismos.....	7
2.4.1. pH.....	8
2.4.2. Disponibilidad de oxígeno	9
2.4.3. Presión osmótica.....	10
2.4.3.1. Osmófilos.....	10
2.4.3.2. Xerófilos.....	10
2.4.3.3. Halófilos	10
2.5. Mecanismos de resistencia a altas concentraciones de sal	11
2.6. Ecosistemas salinos	13
3. Antecedentes	14
3.1. Métodos dependientes de cultivo	14
3.2. Métodos independientes de cultivo	15
3.2.1. PCR.....	15
3.2.2. ARDRA.....	16
3.3. Bacterias halófilas presentes en alimentos.....	16
3.4. Microbiota del queso Cotija.....	17
3.5. Potencial biotecnológico de microorganismos halófilos	19
4. Justificación	21
5. Hipótesis.....	21
6. Objetivos	21
7. Metodología.....	22
7.1. Diagrama de flujo	22
7.2. Enriquecimiento	23
7.3. Aislamiento	24
7.4. Prueba de catalasa y oxidasa	25
7.5. Extracción de DNA genómico	26
7.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
7.7. Análisis de restricción del gen 16S (ARDRA).....	28
7.8. Secuenciación	29

7.9. Análisis de secuencias	30
7.10. Evaluación de capacidades enzimáticas	30
8. Resultados y discusión	31
8.1. Enriquecimiento	31
8.2. Aislamiento	33
8.3. Evaluación de capacidades enzimáticas	40
8.3.1. Actividad proteasa	40
8.3.2. Actividad esterasa	42
8.3.3. Actividad lipasa	43
8.4. Extracción de ADN	45
8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
8.6. Análisis de restricción del gen 16S (ARDRA)	49
8.7. Identificación	50
9. Conclusiones	63
10. Perspectivas	64
11. Bibliografía	65
12. Anexos	78

1. Resumen

La sal común, mayoritariamente cloruro de sodio (NaCl), es utilizada como ingrediente en la preparación y conservación de alimentos.

El queso Cotija, es un producto lácteo madurado, artesanal mexicano. Contiene un 5% de sal de grano, la cual es extraída de la laguna de Cuyutlán en el estado de Colima y se obtiene de manera artesanal. La maduración, es un proceso fermentativo, y se lleva a cabo mediante la microbiota nativa presente en el producto, la cual fue descrita previamente, en donde la mayoría de los microorganismos son *Firmicutes*.

Se ha reportado la presencia de bacterias halófilas en distintos alimentos; tanto salados como fermentados. En dichos trabajos se menciona que éstas pueden modificar las características sensoriales de los alimentos. Sin embargo, los microorganismos se ven afectados por las condiciones físicas y químicas de su entorno, tales como: temperatura, presión osmótica, pH, disponibilidad de agua y requerimiento de oxígeno. Estos factores son considerados como determinantes de su crecimiento.

En este trabajo se utilizó un método con enfoque polifásico el cual permitió identificar bacterias halófilas presentes en la sal en grano de Cuyutlán, Colima. Se utilizaron los medios RCMAS y GYECS a pH:8, 9 y 10, utilizando concentraciones de sal al 3 y 7% (p/v). Así mismo, se realizaron cultivos en aerobiosis como en anaerobiosis. Se amplificó el gen ribosomal 16S mediante PCR, el cual se utilizó para observar diferencias mediante análisis de restricción (ARDRA) y posterior secuenciación de los amplicones obtenidos. Se lograron aislar ciento seis colonias totales. De los cuales se identificaron a los géneros: *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Oceanobacillus*, *Paraliobacillus* y *Virgibacillus*.

Así mismo, algunos aislamientos contaron con actividad proteasa, esterasa y lipasa. Algunas de éstas fueron máximas a un pH básico.

Por lo que, el aislamiento e identificación de estas cepas representa un interés biotecnológico.

2. Introducción

2.1. Sal

La sal común es una sustancia blanca, cristalina, de sabor propio, muy soluble en agua y está constituida fundamentalmente por cloruro de sodio (NaCl), es utilizada a menudo como ingrediente en la preparación y conservación de alimentos. Desde la antigüedad la sal ha sido indispensable para la humanidad, ha estado presente en la economía de diversas culturas dado que es un objeto de gran valor en el intercambio comercial (AMISAC, 2017; Ramírez, 2015).

Abunda en las aguas del mar, la cual contiene un aproximado de 3.5% (p/v). Se halla también en masas sólidas en el seno de la tierra como lo son minas y depósitos de un mineral denominado halita. También se encuentra disuelta en lagunas y manantiales; algunos de estos lagos suelen tener mayor concentración de sal, que el agua de mar gracias a que son considerados geográficamente como cuenca endorreica terminal, por lo que el contenido de agua es evaporado aumentando la salinidad de estos, variando entre el 30 y 36 % (p/v). Como se observa en la **Tabla 1**, la constitución de la sal varía de acuerdo a la fuente de donde se obtiene y tiene otros minerales presentes (Ishikawa *et al.*, 2003; Larsen, 1986; Madigan *et al.*, 2015; Mwirichia *et al.*, 2010).

Tabla 1. Composición iónica de algunos ambientes de alta salinidad (Madigan *et al.*, 2015).

Ion	concentración g/L			
	Gran lago salado	Mar muerto	Típico lago sódico	Agua de mar
Na ⁺	105	40.1	142	10.6
K ⁺	6.7	7.7	2.3	0.38
Mg ²⁺	11	44	< 0.1	1.27
Ca ²⁺	0.3	17.2	< 0.1	0.4
Cl ⁻	181	225	155	18.9
Br ⁻	0.2	5.3	-----	0.065
SO ₄ ²⁻	27	0.5	23	2.65
HCO ₃ ⁻ o CO ₃ ²⁻	0.7	0.2	67	0.14
pH	7.7	6.1	11	8.1

Dada la forma en que se obtiene, existen diferentes formas de clasificarla, denominadas: sal evaporada al alto vacío, sal de roca y sal solar (AMISAC, 2017; Avilés, 2014).

La sal evaporada al alto vacío es producida en plantas específicamente diseñada para este fin. La planta consta esencialmente de evaporadores e intercambiadores de calor, por lo que también se le conoce como refinería. Una de las ventajas de este proceso de producción, es que se puede obtener sal muy cristalina, blanca y de alta pureza (99.5%) (AMISAC, 2017).

El método de producción de sal por evaporación solar consiste en obtener agua de mar o salmuera natural para evaporarla a través de la acción combinada de energía solar y eólica. Cuando la salmuera alcanza su punto de saturación da inicio la cristalización de la sal. En este procedimiento existen variantes como la cristalización fraccionada, cristalización con salmueras no depuradas y salinas de tipo artesanal (AMISAC, 2017).

La sal tiene más de catorce mil aplicaciones y usos en diferentes campos. Uno de sus usos más comunes es en la industria alimentaria, ya que la adición de sal es fundamental para dar sabor. También es utilizada como conservador, ya que disminuye considerablemente la actividad acuosa (a_w), por lo que inhibe el crecimiento de microorganismos. Así mismo, en productos lácteos controla la fermentación y mejora el color, textura y sabor de productos como quesos, margarinas, mantequillas o cremas (AMISAC, 2017; Ramírez, 2015).

2.2. Queso

La definición admitida internacionalmente del queso es la siguiente: producto fresco o madurado obtenido por coagulación, enzimática o química, de la caseína y subsecuente separación del suero de la leche, de cualquier mamífero. En su elaboración se llevan a cabo varios procesos denominados: coagulación, moldeado, prensado, salado y maduración (Cenzano, 1992).

En la coagulación ocurren fenómenos fisicoquímicos por la adición de enzimas proteolíticas y/o por la presencia de ácido láctico en el medio, lo que forma agregados supramoleculares que se denominan cuajada. La cuajada se desuera, se pasa a moldes donde se le da forma y se colocan en una prensa donde se elimina más suero. En la etapa de salado es donde se sala el queso: por inmersión en baños de salmuera o por salado directo con sal sólida aplicada a la corteza o mezclada con la cuajada. Por último, en la maduración ocurre un conjunto de transformaciones físicas y bioquímicas de los componentes de la cuajada por la acción de enzimas microbianas,

en esta etapa es donde el queso adquiere su textura y sabor final (Cenzano, 1992; Gómez, 2010).

2.3. Queso Cotija

El Cotija, es un queso artesanal mexicano, madurado, de pasta no cocida, de forma cilíndrica, de consistencia semidura, seca, quebradizo, amarillento cuando está madurado, éste posee un sabor fuerte (Figura 1). El auténtico queso Cotija se caracteriza por tener una $a_w < 0.91$, un valor de pH bajo (~ 5.1) y un potencial redox alrededor de 116- 40 mV (Escobar, 2012). La fermentación se lleva a cabo mediante la microbiota nativa presente tanto en las materias primas como en los utensilios con los que está en contacto (Álvarez *et al.*, 2005; Gómez, 2010).



Figura 1. Queso Cotija (http://www.mexicocampoadentro.org/quesos_cotija.php)

Está elaborado a partir de leche bronca de vaca (no pasteurizada), su manufacturación se realiza en la temporada de lluvia (junio a octubre). En la Figura 2 se describe la secuencia del proceso.

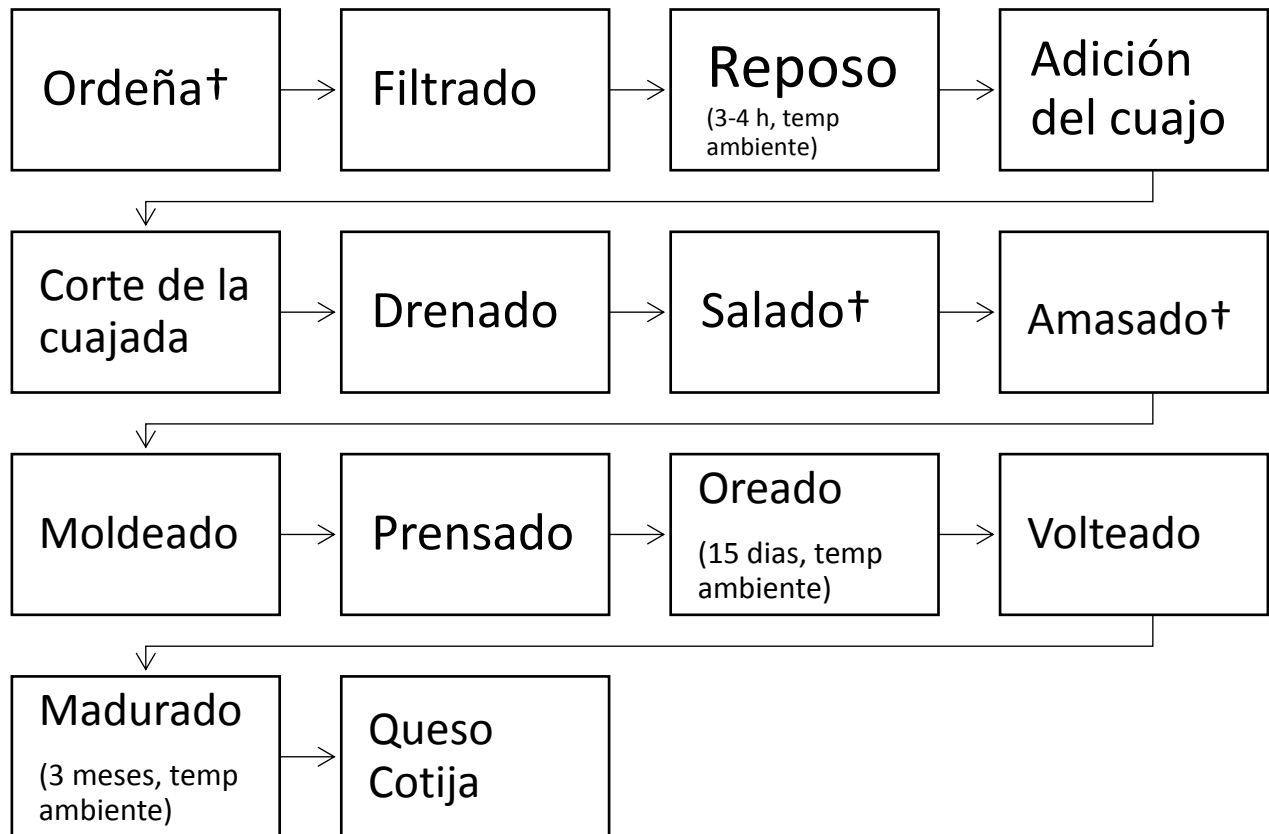


Figura 2. Proceso general de manufacturación del queso Cotija. † Paso donde se incorporan microorganismos, no intencionalmente. (Álvarez, et al., 2005).

El queso, se produce en la sierra de Jalmich, que se encuentra en la frontera de los estados de Jalisco y Michoacán, esta región se caracteriza por tener una vegetación de bosque caducifóleo, el cual permite al ganado pastar libremente, lo que resulta en la producción de leche de alta calidad. Esta región particular comprende una superficie de 2400 km² y una altitud de 700 y 1700 m sobre el nivel del mar. Su topografía tiene una influencia clara en la temperatura, 20-25°C (Figura 3) (Avilés, 2014; México campo adentro 2017 (b)). En el año 2005, la asociación regional de productores de queso Cotija publicaron las “Reglas de Uso” con el fin de apoyar a los productores dado que el producto se encuentra en vías de obtener la Denominación de Origen (Álvarez et al., 2005; Avilés 2014).

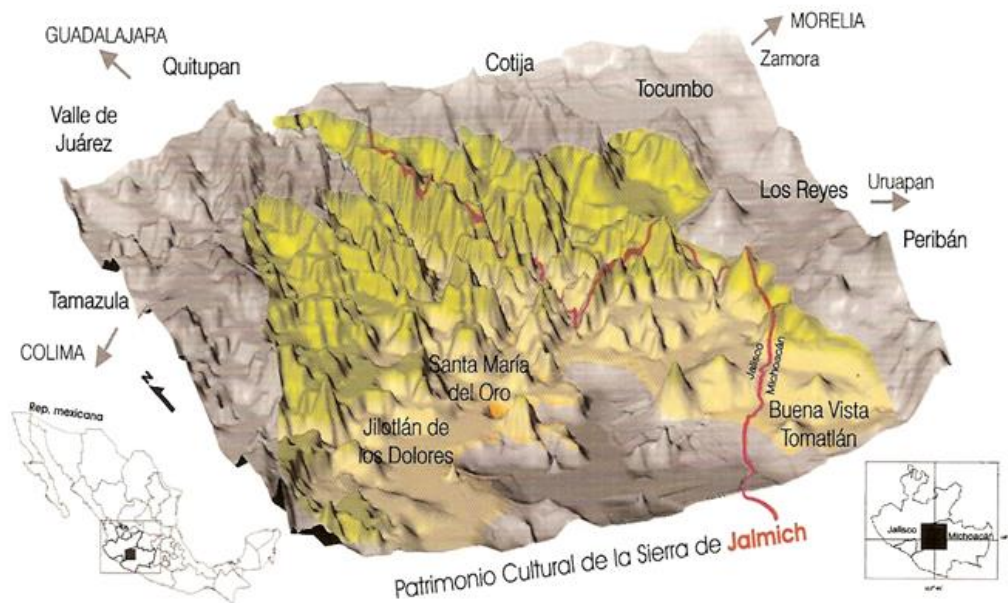


Figura 3. Ubicación geográfica aproximada de la sierra de JALMICH (Álvarez *et al.*, 2005).

En estudios previos se ha reportado que el queso Cotija contiene un 5% de sal en base seca. Dicha sal de grano es extraída de la laguna de Cuyutlán en el estado de Colima, la cual es obtenida de manera artesanal (Figura 4) (Álvarez *et al.*, 2005; Avilés, 2014; García, 2006).

La extracción de esta sal es considerada como artesanal debido a la utilización de equipo manual, además de que el proceso es llevado a través de evaporación solar. El proceso consiste en hacer pequeños bordos manuales, con el mismo material del suelo de la laguna creando pequeños estanques. Es ahí donde se extrae la sal por desecación solar (Figura 4 B). Para su recolección, se utilizan instrumentos como palas, cepillos y carretillas para su transportación. Ésta producción es considerada como temporal ya que se realiza durante la época de secas, de enero a mayo, termina en junio cuando caen las primeras lluvias de la temporada. La laguna de Cuyutlán se encuentra localizada cerca de la costa del Pacífico (Figura 5) y se reporta que contiene alrededor del 36% (p/v) de sal (Avilés, 2014; México campo adentro 2017 (b)).



Figura 4. A) Sal utilizada para el proceso de salazón del queso Cotija (Sociedad cooperativa de salineros de colima). B) Proceso de extracción artesanal.

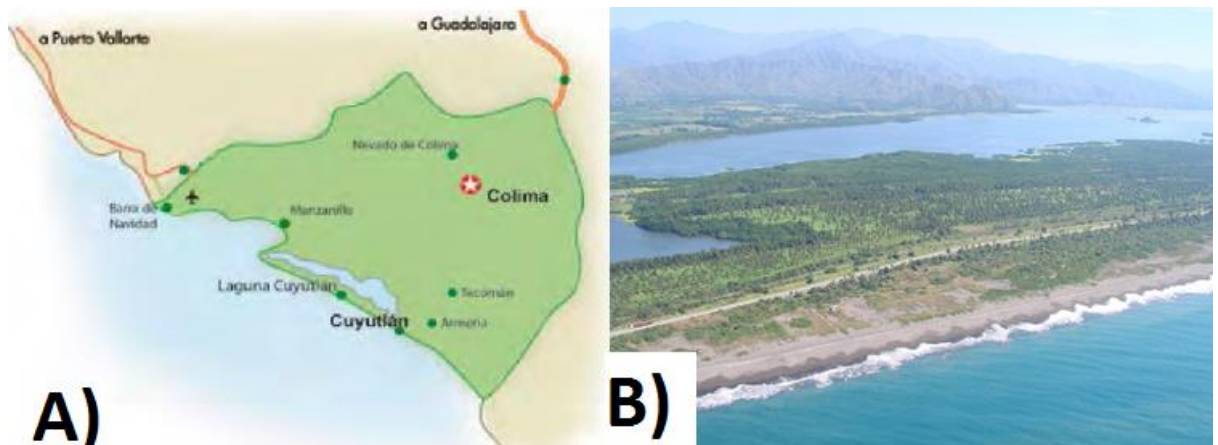


Figura 5. A) Localización aproximada de la laguna de Cuyutlán (Avilès, 2014) B) Fotografía de la laguna de Cuyutlán (<https://manzanillonews.mx/2017/07>)

2.4. Determinantes en el crecimiento de los microorganismos

Los microorganismos se ven afectados por las condiciones físicas y químicas de su entorno, tales como la temperatura, presión osmótica, pH, disponibilidad de agua y requerimiento de oxígeno. Estos factores son considerados como determinantes de su crecimiento (Madigan *et al.*, 2015).

2.4.1. pH

Cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento y normalmente tiene un valor de pH óptimo bien definido (Figura 6). La mayoría crece en un margen de pH de 2-3 unidades.

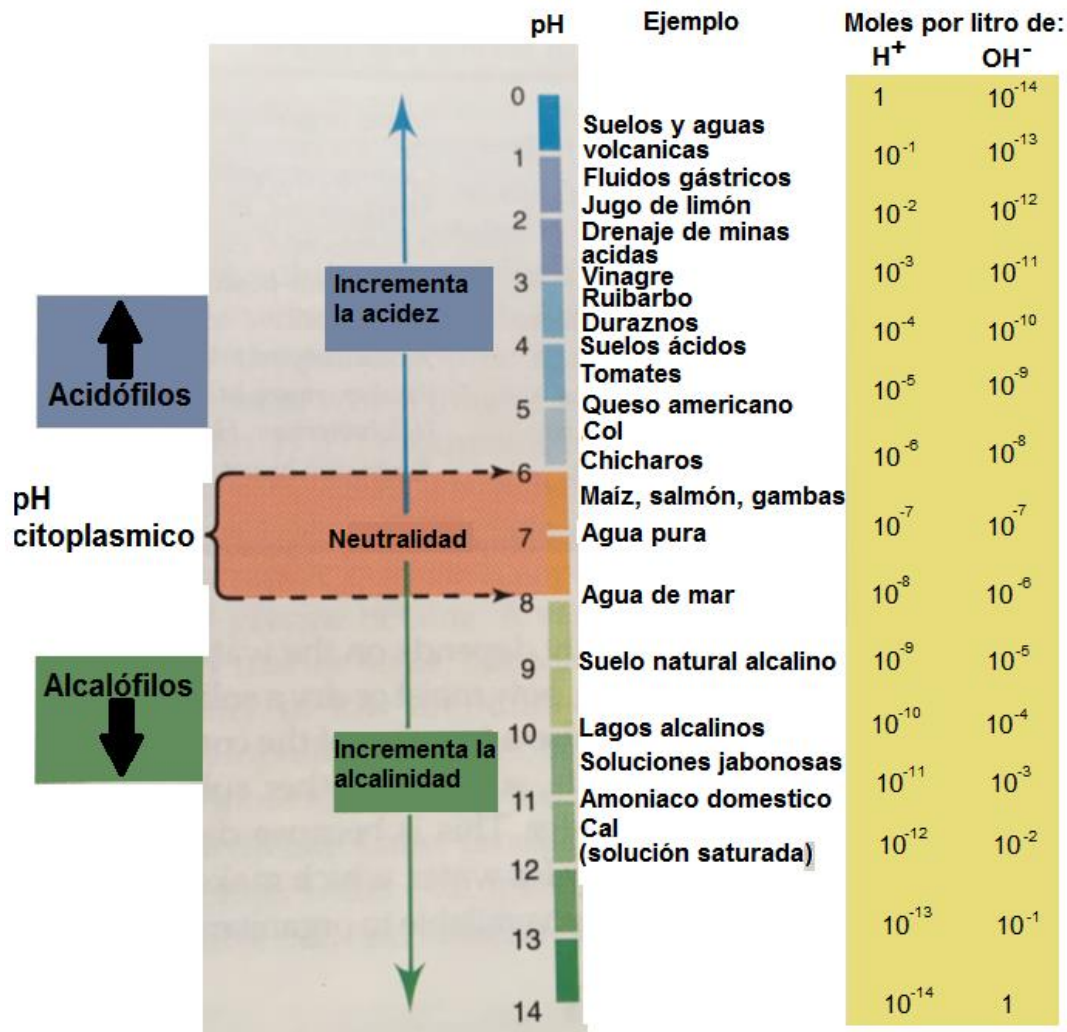


Figura 6. Ejemplos donde varía el pH. (Madigan *et al.*, 2015)

La mayoría de los ambientes naturales tienen un valor de pH entre 5 y 9 y los organismos con pH óptimos en ese rango son los más comunes.

Sin embargo, existen algunas especies que son capaces de crecer en valores de pH por debajo de 2 o por encima de 10. Los organismos que crecen mejor a un pH bajo constituyen un tipo extremófilos llamados **acidófilos**.

Mientras que otros extremófilos presentan un pH óptimo de crecimiento muy elevado como lo es pH 10; a estos se les denomina **alcalófilos**. Esos microorganismos se encuentran por lo general en hábitats muy básicos como lo son

lagos sódicos y suelos muy carbonatados. Los alcalófilos más estudiados son especies del género *Bacillus*. Algunos microorganismos alcalófilos extremos son también halófilos.

Algunos de éstos tienen aplicaciones industriales dado que llegan a producir enzimas hidrolíticas como lo son proteasas y lipasas, que funcionan bien a pH alcalino y se usan como aditivos de los detergentes domésticos (Madigan *et al.*, 2015).

2.4.2. Disponibilidad de oxígeno

Los microorganismos son muy variados en cuanto a la necesidad o tolerancia del oxígeno. Se pueden dividir en varios grupos dependiendo del efecto del oxígeno (Figura 7).

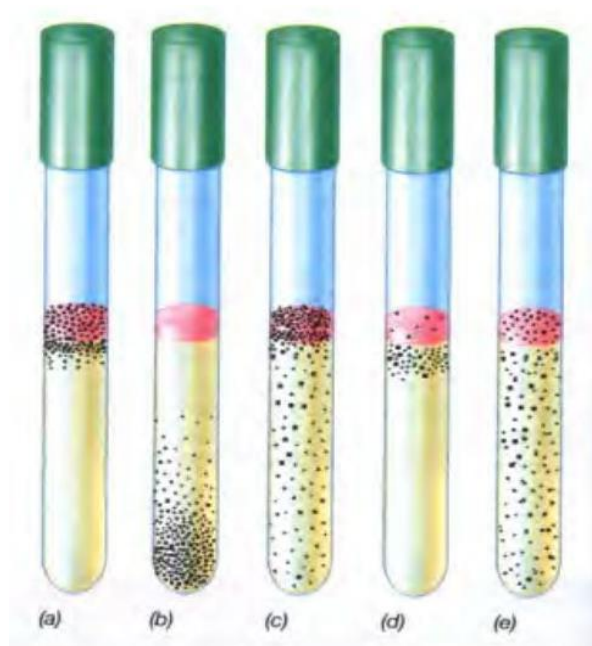


Figura 7. Crecimiento de acuerdo con el requerimiento de oxígeno: a) aerobio, b) anaerobio, c) aerobio facultativo, d) microaerófilo, e) anaerobio aerotolerante. (Madigan *et al.*, 2015)

Los **aerobios** son especies capaces de crecer en concentraciones de oxígeno normales (el 21% del aire es O₂) y muchos incluso pueden tolerar concentraciones más elevadas de oxígeno (oxígeno hiperbárico).

Los **aerobios facultativos**, pueden desarrollarse en condiciones nutritivas y de cultivo apropiadas, tanto en condiciones: aeróbicas como anaeróbicas.

Los **microaerófilos** por el contrario son aerobios que pueden utilizar el O₂ sólo cuando está presente a niveles más bajos que en el aire, normalmente a causa de su limitada capacidad para respirar o porque contienen alguna molécula sensible al oxígeno, como por ejemplo alguna enzima lábil al oxígeno.

Algunos microorganismos no pueden respirar O₂, tales organismos se denominan **anaerobios**. Existen dos clases de anaerobios: la **anaerobiosis aerotolerante**, son aquellos que toleran el oxígeno y crecen en su presencia, aunque no puedan usarlo y los **anaerobios estrictos** que son inhibidos o incluso mueren en presencia de oxígeno, esto puede deberse a que son incapaces de eliminar algunos productos tóxicos que se originan por el metabolismo del oxígeno (Madigan *et al.*, 2015).

2.4.3. Presión osmótica

Los efectos osmóticos son de interés en hábitats con alta concentración de sales y solutos, dichos microorganismos soportan altas presiones osmóticas y comprenden tres grupos principales denominados como osmófilos, xerófilos y halófilos (Madigan *et al.*, 2015).

2.4.3.1. Osmófilos

Son aquellos que tienen la capacidad de desarrollarse en medios con altas concentraciones de solutos. Se pueden encontrar tanto levaduras como bacterias.

2.4.3.2. Xerófilos

Estos microorganismos pueden crecer con una baja disponibilidad de agua, lo cual se traduce ambientes secos. Los valores de a_w son menores a 0.85. Dentro de esta clasificación se encuentran principalmente hongos, levaduras y algunas bacterias.

La actividad acuosa, a_w , representa la humedad disponible en el medio. Dado que la concentración de solutos aumenta en el medio, el valor de a_w disminuirá. La determinación de esta se realiza mediante el siguiente algoritmo: $a_w = p/p_0$ siendo p la presión de vapor en el medio y p_0 la presión de vapor del agua pura, a temperatura constante (Andino y Castillo, 2010).

2.4.3.3. Halófilos

Por su parte estos microorganismos no pueden crecer en ausencia de sal, a menudo requieren cantidades sustanciales de cloruro de sodio y este grupo está comprendido principalmente por bacterias (Andino y Castillo, 2010).

Dentro de los halófilos, existen diversos grupos de acuerdo con el requerimiento de sal, los cuales son no halófilos, halotolerantes, halófilos y halófilos extremos (Figura. 8).

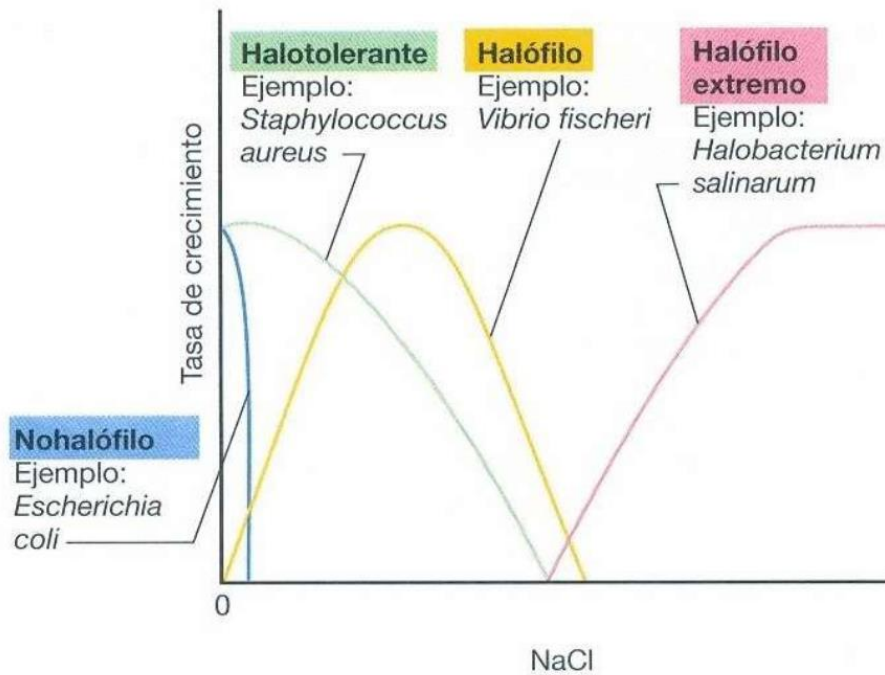


Figura 8. Efecto de la concentración de cloruro de sodio en el crecimiento de microorganismos de diferentes tolerancias o requerimientos de sales. (Madigan *et al.*, 2015)

2.5. Mecanismos de resistencia a altas concentraciones de sal

Los cambios en la presión osmótica por lo regular conllevan a la muerte celular. dado que la solución cuya concentración es menor pasa a través de la membrana de las bacterias hacia la solución con mayor concentración generando un gradiente para poder equilibrar la concentración tanto en el interior como en el exterior. a este fenómeno se le conoce como plasmólisis. En la Figura 9 se explica el fenómeno de la plasmólisis (Ramírez, 2015; Tortora *et al.*, 2007).

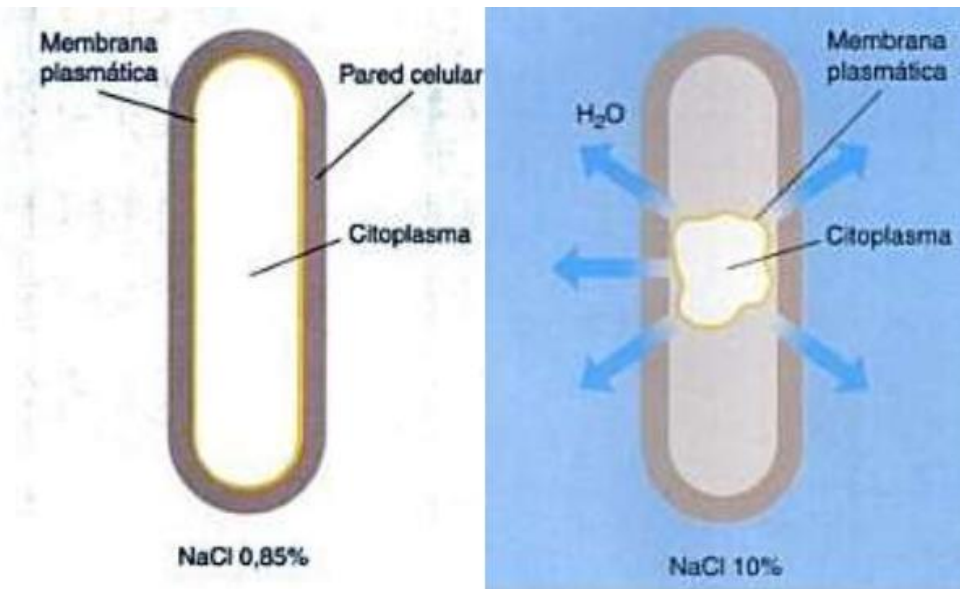


Figura 9. Explicación de la plasmólisis por el efecto de la concentración de solutos a la izquierda. Se representa al equilibrio tanto al interior como en el exterior de la célula. A la derecha se observa la compensación de la concentración del interior al exterior (Tortora *et al.*, 2007).

La membrana celular es la barrera que separa el citoplasma del exterior en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que ésta juega 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 situaciones 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 (Ramírez *et al.*, 2006).

La estrategia que desarrollan las bacterias halófilas se basa en la acumulación de compuestos en el citoplasma, para compensar la concentración del medio externo (Madigan 2015; Ramírez *et al.*, 2006). Se han descrito dos tipos de mecanismos por los cuáles dichos microbios logran adaptarse a condiciones de estrés osmótico. De manera general se basan en la acumulación de diversos compuestos tanto iónicos como no iónicos en el citoplasma para poder equilibrar la presión osmótica del medio externo, dando como resultado la adaptación de los componentes celulares.

El uso de los diferentes tipos de compuesto (iónicos o no iónicos) da origen a dos mecanismos conocidos como: *salt-in* y *salt-out*. El primero se define como la acumulación de iones inorgánicos como K^+ y Cl^- . Mientras que para el segundo se acumulan compuestos orgánicos que tengan bajo peso molecular también llamados

compuestos compatibles entre los cuales se tienen a los azúcares y a los aminoácidos. El tipo de mecanismo a utilizar depende del microorganismo.

El mecanismo *salt-in* es utilizado por bacterias halófilas tanto moderadas como obligadas. Mientras que el mecanismo *salt-out* lo pueden usar tanto bacterias halófilas como no halófilas (Ramírez *et al.*, 2006).

2.6. Ecosistemas salinos

Se han encontrado una gran diversidad microorganismos en ecosistemas cuya concentración de sal es alta. Estos no han sido estudiados plenamente dado que se han investigado pocos ecosistemas con estas características.

El agua marina contiene en promedio un 3.5% (p/v) de cloruro de sodio, así como pequeñas cantidades de otros minerales que podrían ser determinantes para el cultivo *in vitro* de los microorganismos que habitan ahí. Éstos requieren varias sales para su crecimiento, de las cuales la que está en mayor cantidad es el NaCl; sin embargo, hay evidencias de que uno de los aspectos críticos para su cultivo es la fuente de nitrógeno, que puede llegar a ser muy compleja y difícil de reproducir en el laboratorio (Ishikawa *et al.*, 2003).

Existen ecosistemas como el Mar Muerto, que se caracteriza por sus condiciones extremas, ya que presenta una salinidad aproximada de 34% así como un pH bajo y una composición iónica única, distinta del agua de mar. Mediante secuenciación de amplicones de alto rendimiento la microbiota fue descrita, con lo que se encontró que las arqueas son dominantes al tener un 52% de las secuencias, mientras que las bacterias constituyen el 45% de las secuencias. Los géneros bacterianos predominantes en el agua del Mar Muerto son los géneros *Acinetobacter* y *Bacillus*, los cuales representan un 45% y 35% de las secuencias para este dominio (Jacob *et al.*, 2017).

Mientras que en el lago Elmenteita en Kenia, se identificaron nuevos grupos bacterianos dado que se encontró una gran diversidad de microorganismos por métodos independientes de cultivo. Se utilizaron diferentes medios de enriquecimiento y aislamiento, dichos medios fueron preparados usando agua del lago esterilizada por filtración. El análisis filogenético reveló que los géneros *Halomonas* y *Bacillus* constituyen un 37% y 31% del total de aislamientos secuenciados, respectivamente. Otros grupos encontrados estaban relacionados con *Marinospirillum*, *Idiomarina*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Alkalimonas*, *Alkalibacterium*,

Amphibacillus, *Marinilactibacillus* y las actinobacterias *Nocardiopsis* y *Streptomyces* (Mwirichia *et al.*, 2010).

Se encontró una diversidad de bacterias haloalcalífilas en el suelo del desierto salino de Little Rann of Kutch, India. El análisis filogenético reveló que los aislamientos son bacterias Gram positivas pertenecientes al filum *Firmicutes*, que comprenden un contenido bajo de GC, los diferentes géneros identificados fueron: *Bacillus* 39%, *Staphylococcus* 30%, *Halobacillus* 13%, *Virgibacillus* 13% y *Oceanobacillus* 4%. Dichas bacterias tienen un gran potencial enzimático y biotecnológico ya que producen múltiples enzimas activas en alta salinidad y pH alcalino. La mayoría de las bacterias aisladas produjeron predominantemente hidrolasas como proteasas, celulasas y amilasas (Bhatt *et al.*, 2018).

Algunos de estos géneros bacterianos son capaces de permanecer latentes en ambientes hipersalinos durante periodos muy largos (Vreeland *et al.*, 2000).

3. Antecedentes

3.1. Métodos dependientes de cultivo

La identificación de microorganismos por métodos dependientes de cultivo se basa en su cultivo y aislamiento, cuya ventaja se debe a que los microorganismos están disponibles para ser estudiados más a fondo (Ryssel *et al.*, 2015).

Sin embargo, dichos métodos no son suficientes para estudiar todo tipo de ecosistemas, ya que más del 90% de los microorganismos en ambientes naturales no pueden ser cultivados, porque en no se conocen los nutrientes necesarios para su cultivo (Avilés, 2014).

Por ello se han descrito algunas limitaciones y desventajas del uso de las técnicas microbiológicas tradicionales como lo son:

- Los largos periodos de incubación y elaboración de medios de cultivo.
- El desconocimiento de las condiciones para su cultivo.
- Las coincidencias fenotípicas similares con cepas genotípicamente diferentes.
- Algunos microorganismos no pueden ser aislados porque dependen de la actividad de otros microorganismos para su crecimiento y algunos otros pueden perder su actividad para reproducirse.

3.2. Métodos independientes de cultivo

Estas técnicas ofrecen enfoques diferentes, ya que se basan en el análisis del ADN extraído directamente del entorno, sin los problemas asociados con el cultivo (Ryssel *et al.*, 2015).

Estos métodos han demostrado ser herramientas eficaces al requerir información sin conocimiento previo sobre la diversidad del ecosistema y dar la capacidad analizar numerosas muestras simultáneamente (Ryssel *et al.*, 2015).

3.2.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular la cual permite obtener múltiples copias de un fragmento de ADN. Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis en 1985. Se fundamenta en la utilización de una DNA polimerasa termorresistente, un molde de ADN, cebadores o primers, desoxirribonucleótidos y un buffer para amortiguar el pH y el magnesio se utiliza como cofactor de la enzima. Esta reacción se lleva a cabo en un instrumento conocido como termociclador el cual funciona mediante cambios de temperatura y consta de distintas etapas.

Existen tres etapas fundamentales dentro de un ciclo desnaturalización, alineamiento y extensión, además de la desnaturalización inicial y de una extensión final. Estos ciclos se repiten entre 20 y 30 veces (Voet, *et al.*, 2013). En la Figura 10, se esquematiza, como se llevan a cabo las etapas de un ciclo, durante una PCR.

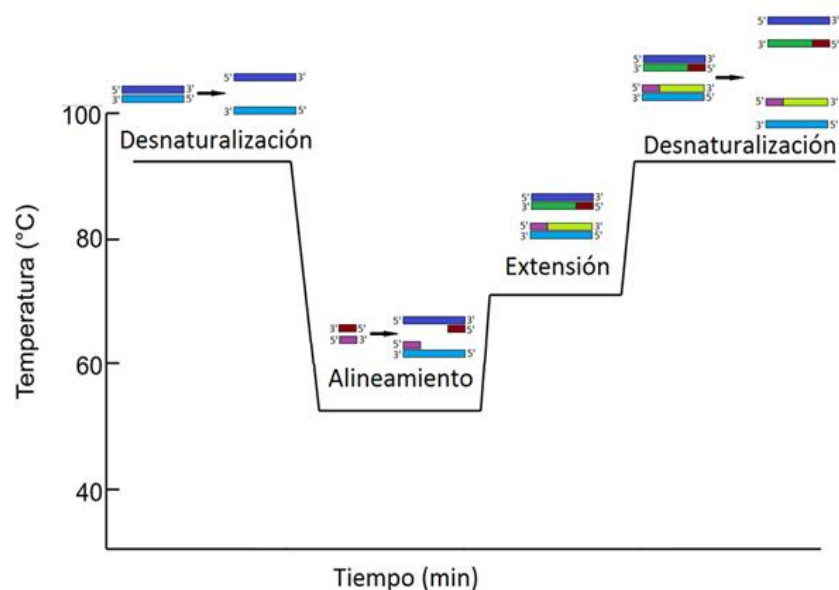


Figura 10. Representación de las etapas de un ciclo durante una PCR (Voet, *et al.*, 2013).

3.2.2. ARDRA

La mayoría de los métodos moleculares para la clasificación e identificación de microbios, se basan en la amplificación del ADN mediante la reacción de PCR. La amplificación de un fragmento de ADN específico tal como regiones variables del gen de ADNr, seguido de un análisis de restricción (ARDRA), son muy empleados para obtener información sobre la clasificación dentro del nivel de especie para determinado microorganismo.

El análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), es una técnica basada en amplificación del gen 16S ARNr en bacterias y 26S para eucariontes, por la reacción en cadena de una polimerasa (PCR), utilizando cebadores universales y la restricción del amplicón utilizando endonucleasas que generan múltiples fragmentos de restricción que se analizan con geles de agarosa.

En esta metodología se obtienen patrones de banda o "huellas digitales" de cada microorganismo. Se analizan utilizando diferentes tipos de software, las diferencias entre estos se deben de acuerdo con la presencia o ausencia de banda (García, 2006).

3.3. Bacterias halófilas presentes en alimentos

Diversos autores han reportado la presencia de bacterias halófilas en distintos alimentos; tanto salados como fermentados. En dichos trabajos se menciona que estas pueden modificar las características sensoriales de los alimentos. Se mencionan algunos ejemplos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Ejemplos de bacterias halófilas presentes en algunos alimentos fermentados y/o salados.

Alimento	Microorganismos	Referencia
Aceitunas verdes españolas	<i>Alkalibacterium</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Halolactibacillus</i> <i>Amphibacillus</i> , <i>Natronobacillus</i> , <i>Catenococcus</i> y <i>Streptohalobacillus</i>	Lucena-Padrós y Ruiz-Barba, 2015
Anchoas saladas	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Gildberg y Thongthai, 2001
Salsa de soya japonesa		Kobayashi <i>et al.</i> , 2004
Pescado salado	<i>Pseudomonas salinaria</i> , <i>Micrococcus</i> sp., <i>Pediococcus halophilus</i> y <i>Sarcina litoralis</i>	Grau <i>et al.</i> , 2003
Gouchujang, comida coreana fermentada	<i>Bacillus</i> sp, <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>	Jang <i>et al</i> , 2011
Jeotgal	<i>Halalkalicoccus jeotgali</i> , <i>Bacillus jeotgali</i> , <i>Lentibacillus jeotgali</i> , <i>Kokuria</i> sp., <i>Salimicrobium</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Halomonas alimentaria</i> y <i>Cobetia crustatorum</i>	Guan <i>et al.</i> , 2011; Jung <i>et al.</i> , 2010; Lee <i>et al.</i> , 2012(a); Oren 2010
Pepinillos curados	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Pediococcus cereviciae</i>	Fernández, 1991
Quesos europeos	<i>Marinilactibacillus</i> y <i>Alkalibacillus</i>	Ishikawa <i>et al.</i> , 2006; Ryssel <i>et al.</i> , 2015

Anteriormente se ha reportado la presencia de hongos filamentosos, en sal marina de tipo artesanal, procedentes de distintos lugares del mundo. Éstos tienen el potencial de causar el deterioro en alimentos salados. El factor más probable, es principalmente el proceso de elaboración y empaquetamiento (Biango-Daniells y Hodge., 2018).

3.4. Microbiota del queso Cotija

El proceso de maduración de este queso se lleva a cabo de 3 a 6 meses a temperatura ambiente, éste se ve influenciado por las condiciones ambientales ya que se produce de manera natural. Las características sensoriales, así como su seguridad son probablemente el resultado del equilibrio entre las poblaciones microbianas y su capacidad metabólica (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

Otro factor involucrado en la diversidad bacteriana del Cotija se debe a la disponibilidad de oxígeno, ya que esta define al potencial redox “Eh”, el cual es un parámetro fundamental para determinar el tipo de atmosfera (aerobiosis o anaerobiosis) presente en el queso, dado que este parámetro puede definir el tipo de microorganismos cuyo desarrollo se vería favorecido. Se reportó que el potencial redox en el interior corresponde a valores negativos. Esto indica que la atmosfera en la pieza es deficiente en oxígeno por lo que predomina un ambiente reductor esto se debe en primera instancia al consumo de este gas por parte de las bacterias aerobias, dando lugar a especies reductoras como producto de su metabolismo. Sin embargo, en quesos madurados se han obtenido valores más negativos, esto se debe a la pasta del queso que no es totalmente compacta, lo que indica la formación de “microcanales” que permiten el paso del oxígeno (Escobar, 2012).

Por otra parte, un estudio metagenómico realizado por el grupo de investigación, reveló la existencia de una extensa microbiota del queso Cotija. La mayoría de los microorganismos encontrados fueron *Firmicutes* (99.8%).

Los géneros dominantes se encontraban en una abundancia relativa superior al 10% teniendo a *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella paramesenteroides*, como especies más abundantes. Otros géneros, fueron considerados como la población subdominante siendo: *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Staphylococcus*. Los cuales representaban más del 1% y menos del 10% de abundancia cada uno, así como 78 especies no dominantes (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016).

En numerosos artículos se ha descrito a un grupo de bacterias halófilas que se le conoce como HALAB, (Halophilic and Alkalophilic Lactic Acid Bacteria Bacterias ácido lácticas halófilas y alcalófilas, por sus siglas en inglés) las cuales han destacado por encontrarse en algunos quesos de origen europeo (Ishikawa *et al.*, 2006; Ryssel *et al.*, 2015). Los géneros bacterianos que comprenden este grupo son: *Alkalibacillus*, *Tetragenococcus*, *Halolactibacillus* y *Marinilactibacillus*.

Dentro de dicho estudio se encontraron secuencias de ADN de *Marinilactibacillus* y *Alkalibacterium* como subdominantes dado que representan entre un 1 y 2% de abundancia respectivamente, ambas son de origen marino y pertenecientes al grupo HALAB, también fueron encontradas dentro de este mismo grupo a *Tetragenococcus halophilus* y *Halolactibacillus* las cuales son no dominantes. También se encontró la presencia de otras bacterias halófilas no dominantes, ni

asociadas previamente a los ambientes del queso como lo son: *Dehalobacter*, *Thermohalobacter*, *Halanaerobiales*, *Haloglycomyces*, *Thiohalomonas*, *Desulfohalobium* y *Halomonas* (Escobar-Zepeda *et al.*, 2016; Ishikawa *et al.*, 2006; Zúñiga, 2009).

El género *Marinilactibacillus* fue encontrado como dominante en el periodo de maduración del auténtico queso Cotija (3 meses aproximadamente) mediante técnicas independientes de cultivo. La dominancia fue notable después de la etapa de salado, lo cual sugiere que este género es procedente de la sal utilizada para este proceso (Zúñiga, 2009).

Del mismo modo se buscó identificar mediante técnicas independientes de cultivo, bacterias ácido-lácticas halófilas presentes en el queso Cotija y en la sal de grano utilizada para el proceso de salado. Los géneros identificados fueron *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Lactobacillus* (Gómez, 2010).

Utilizando métodos dependientes e independientes de cultivo, se comparó la diversidad bacteriana de la sal de grano utilizada en el proceso de salado del queso Cotija, respecto a una sal comercial. Siendo la sal de Cuyutlán la que presentó mayor abundancia respecto a la sal comercial. Los géneros representativos en ambas sales fueron *Virgibacillus* y *Bacillus*. Se enfatiza que el tipo de sal empleada en alimentos fermentados como lo es el Cotija influye en la microbiota del producto final (Avilés, 2014).

3.5. Potencial biotecnológico de microorganismos halófilos

Hasta el momento se han estudiado pocos usos comerciales para este tipo de microorganismos. las estrategias que estas bacterias han desarrollado para adaptarse a tales condiciones han sido el verdadero motivo que ha llamado la atención de la Industria para aplicaciones biotecnológicas como se muestra en la **Tabla 3.**

Tabla 3. Ejemplos de aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos (Avilés, 2014; Margesin y Schinner, 2001; Oren, 2010)

Aplicación industrial	Tipo de producto	Microorganismo	Observaciones
Producción de Ectoina	metabolito primario	<i>Ectothiorhodospira halochloris</i> (Halófilo extremo)	Protege enzimas y ácidos nucleicos contra la alta salinidad, desnaturalización térmica, la desecación y la congelación
		<i>Halomonas elongata</i> (halotolerante)	Contrarresta los efectos del envejecimiento de la piel inducida y acelerada por la luz UV
Amilasa	enzima	<i>Haloarcula</i> sp. (Halófilo extremo)	Funciona de manera óptima con una concentración de 4.3 M de sal a 50°C y es estable en benceno, tolueno y cloroformo.
Isomerasa	enzima	<i>Halobacterium halobium</i> (Halófilo extremo)	Se activa en un amplio intervalo de temperatura y concentraciones de sal y no requiere de magnesio ni ATP para su actividad
Biopolímero, poli-β-hidroxialcanoato (PHA)	metabolito secundario	<i>Haloferax mediterranei</i> (halófilo moderado)	Polímero que se utiliza para la producción de plásticos biodegradables con propiedades parecidas al polipropileno
		<i>Halomonas boliviensis</i> (halotolerante)	
Biosurfactante (Lichenisi, Lipopeptido)	metabolito secundario	<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2 (halotolerante)	Mejora la remediación de agua y suelos contaminados de petróleo mediante la disminución de la tensión superficial y aumentando la solubilidad.
Glicerol	metabolito primario	<i>Dunaliella</i> sp. (halófilo moderado)	Aplicación en diferentes industrias como: alimenticia y farmacéutica etc.
β-caroteno	metabolito secundario		Antioxidante y colorante alimentario

4. Justificación

La laguna de Cuyutlán representa un hábitat con una alta salinidad, la cual es mayor a un ambiente marino. Se han identificado bacterias halófilas y alcalófilas en queso cuya materia prima es sal de Cuyutlán.

Resulta de interés aislar e identificar bacterias de la sal de Cuyutlán por sus posibles aplicaciones biotecnológicas, particularmente en la producción de enzimas capaces de actuar en condiciones extremas de [NaCl] y pH.

5. Hipótesis

Dado el bajo contenido de nutrientes y a_w que presenta la sal de Cuyutlán, ésta no podría presentar microorganismos metabólicamente activos, por lo que las bacterias presentes cuando se encuentren en condiciones adecuadas de pH, concentración de NaCl, O₂ disponible y en un medio acuoso, podrán ser cultivadas.

6. Objetivos

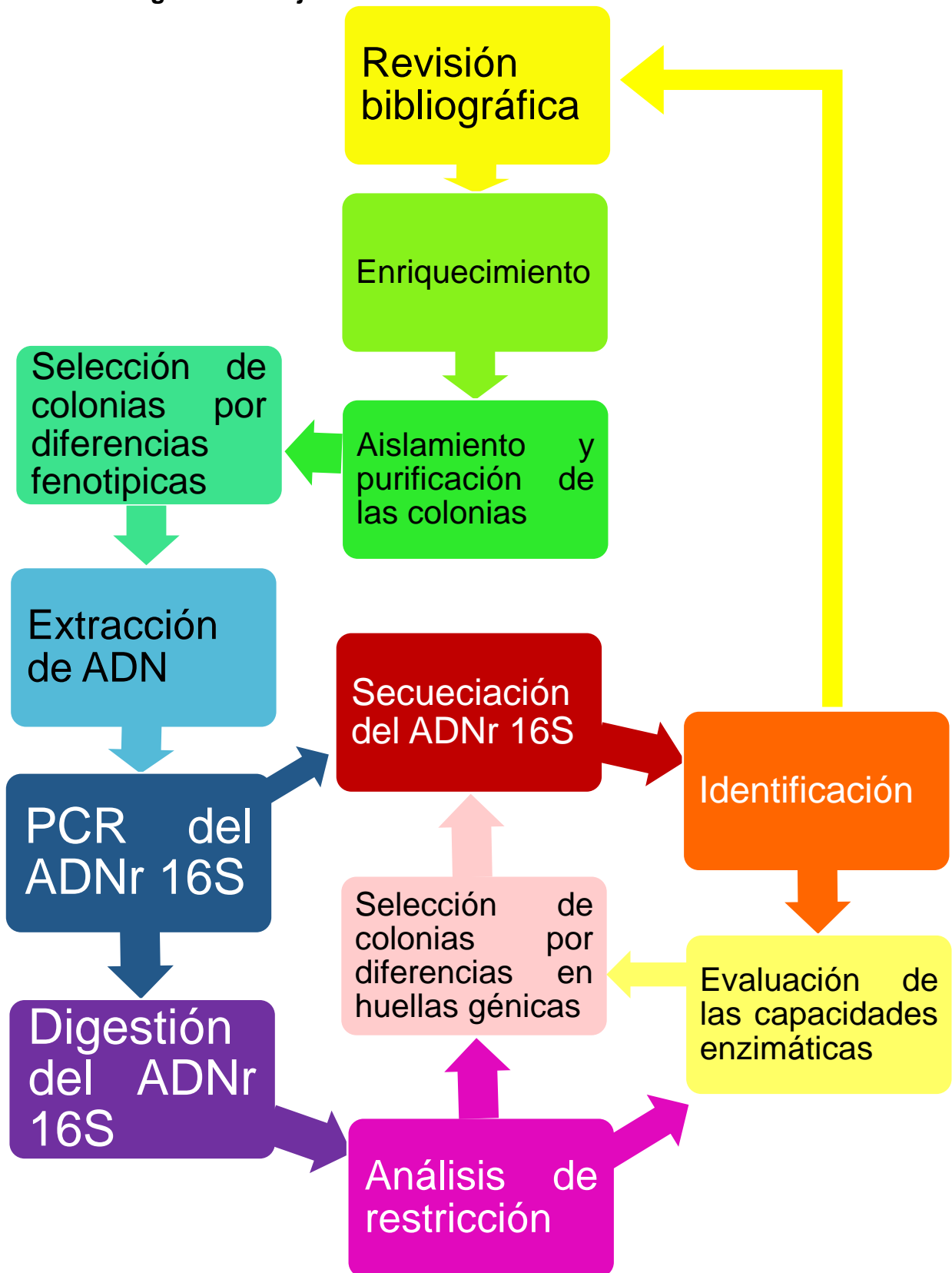
Objetivo General

Aislar e identificar bacterias halófilas y alcalófilas, a partir de sal de grano procedente de Cuyutlán, Colima que representen interés biotecnológico.

Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones óptimas para el cultivo de las bacterias en la sal de grano de Cuyutlán, Colima.
- Aislar colonias a partir de un cultivo enriquecido.
- Mediante métodos moleculares identificar a las colonias aisladas.
- Determinar las características proteolíticas y lipolíticas de las cepas aisladas.

7. Metodología
7.1. Diagrama de flujo



7.2. Enriquecimiento

El enriquecimiento de las bacterias presentes en la sal de Cuyutlán se realizó en los medios: RCMAS y GYECS (Lucena-Padrós y Ruiz-Barba, 2015). En la **Tabla 4** se muestra su composición.

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo base utilizados.

MEDIO			
RCMAS		GYECS	
Composición	g/ 100 mL de agua	Composición	g/ 100 mL de agua
Peptona	1	Dextrosa	1
Extracto de carne	1	Extracto de levadura	0.5
Extracto de levadura	0.3	Clorhidrato de cisteína	0.1
Dextrosa	0.5	NH ₄ SO ₄	0.1
Almidón soluble	0.1	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.1 mM
Clorhidrato de cisteína	0.05	-----	-----
Acetato de sodio	0.3	-----	-----

Una vez seleccionados los medios se variaron los parámetros para el cultivo de microorganismos, tal como lo son el requerimiento de oxígeno, pH y concentración de sal.

El pH se estableció a: 8, 9 y 10, con soluciones amortiguadoras de carbonatos (NaHCO₃/Na₂CO₃). Se añadió el volumen necesario para obtener una concentración final de 100 mM (Lucena-Padrós y Ruiz-Barba, 2015). Se trabajó por duplicado con un control de esterilidad, se utilizaron tubos de 16x130 mm (3 tubos por condición) con 15 mL de medio cada uno. Se esterilizó en autoclave (121°C, 15 lb/in² durante 15 minutos). En las condiciones anaeróbicas los medios fueron suplementados con tioglicolato de sodio al 0.05% (p/v) y resazurina al 0.001%(v/v) como indicador de oxido reducción. Antes de utilizar los medios anaeróbicos, se favoreció un ambiente reductor hirviéndolos hasta que el indicador fuese incoloro. Los tubos fueron inoculados con sal de Cuyutlán para tener 3 y 7% (p/v) respectivamente (18 tubos en

total para cada una de las cuatro condiciones (Figura 11). A los medios anaeróbicos se les adicionó aceite mineral en la superficie y fueron colocados en jarra de anaerobiosis. Ambos medios se incubaron sin agitación a 37°C durante 48 horas.







Sal/pH	8	9	10
3%	 1 2 C	 1 2 C	 1 2 C
7%	 1 2 C	 1 2 C	 1 2 C

Figura 11. Representación de los parámetros físicos probados. 1 y 2 representan la condición probada con su duplicado, C representa el control de esterilidad.

7.3. Aislamiento

El aislamiento se realizó en los medios RCMAS Y GYECS (pH: 8, 9 y 10) adicionando 1.5% de agar, así como 3 y 7% (p/v) de sal. Se tomaron 150 µL de cada cultivo enriquecido (apartado 7.2) en cajas Petri realizando un extendido con varilla en L. Las cajas con medios anaeróbicos se colocaron en jarras de anaerobiosis antes de ser utilizadas. Se incubaron a 29°C durante 48 horas (Figura 12).

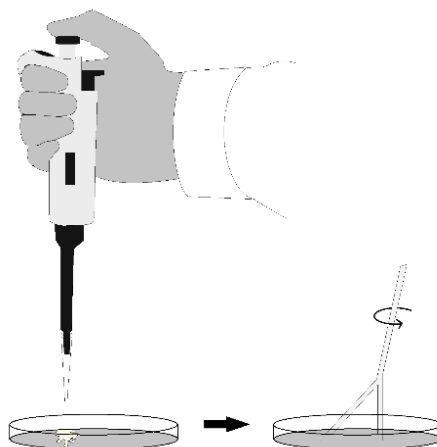


Figura 12. Esquemización del extendido en placa

De cada condición se seleccionaron 6 colonias cuyas características morfológicas y coloniales fueran distintas o, en su defecto, se tomó una asada del tapete extendido en la placa, y se realizó una estría para aislar colonias. Se incubó a 37°C durante 48 horas. Una vez teniendo colonias aisladas, se realizó una tinción de

Gram para observar la morfología microscópica y agrupación, como criterios de como pureza de los microorganismos aislados. Posteriormente, se sembraron en tubos con agar inclinado y se mantuvieron en refrigeración hasta una posterior resiembra.

Así mismo, aquellas colonias que presentaron características morfocoloniales y microscópicas notablemente distintas al resto, fueron seleccionadas para ser identificadas directamente. En este caso no se les realizó análisis de restricción, sino que los productos de PCR del ADNr 16S fueron enviados a secuenciar a MACROGENE-Corea™, para su identificación.

7.4. Prueba de catalasa y oxidasa

Dadas las condiciones de aislamiento, efectuar las pruebas de catalasa y oxidasa nos permiten detallar características metabólicas de los microorganismos aislados, ya que con esta información es posible clasificarlos.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno, por lo que es determinante para saber si una bacteria es capaz de desarrollarse en una atmosfera rica en oxígeno(aerobiosis) o en su ausencia(anaerobiosis).

Por otra parte, la prueba de oxidasa nos indica la presencia de la enzima citocromo C oxidasa, la cual está presente en microorganismos aerobios y facultativos, los cuales pueden presentar un metabolismo oxidativo, si dicho microorganismo carece de esta enzima, se presenta un metabolismo fermentativo u respiración anaerobia.

Para estas pruebas, se inocularon las colonias aisladas en agar LB, ya que este medio no contiene glucosa la cual alteraría los resultados. Se agregó una gota de una solución de peróxido de hidrogeno al 3% (v/v). Es positiva a catalasa si se observa formación de burbujas y negativa para aquellas que no las presenten. Previamente se realizó la prueba de oxidasa utilizando las tiras reactivas **Bactident® Oxidase** de Merck. En la Figura 13 se observa el cambio de coloración a una tonalidad azul, la prueba será positiva, si permanece incolora es negativa.

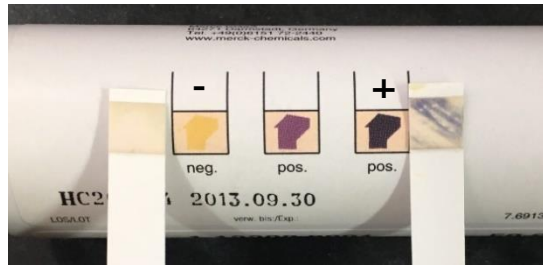


Figura 13. Ejemplo de la prueba de oxidasa, mostrando el resultado negativo (-), y el positivo (+).

7.5. Extracción de DNA genómico

Se inoculó una asada de cada cepa en tubos de ensayo de 16x200 con 25 mL de caldo (RCMAS o GYECS, aerobiosis o anaerobiosis, concentración de sal 3 y 7% (p/v), pH 8, 9, 10). Incubando durante 48 horas a 37 °C y sin agitación.

Dado que el cultivo contiene sedimento se procede a agitar con vórtex para homogenizar, debido a que las células pueden encontrarse en el fondo del tubo, después se dejan reposar los tubos durante 10 minutos para que se asiente la materia insoluble. Una vez formado el sedimento, el cultivo se transfirió a tubos Falcon por decantación.

Éste se centrifugó durante 15 minutos a 7871 x g para formar un paquete celular descartando el sobrenadante. Se realizaron dos lavados de 5 mL con solución salina isotónica estéril (0.85%). Y se utilizó el kit comercial Fast DNA de Genetic ID®, el que consiste en resuspender el paquete celular en 1 mL de buffer de lisis; al cual se le adicionó lisozima (10 mg/mL) y se incubó a 35°C durante 20 minutos a 400 rpm. Después se agregó proteinasa K, se incubó a 65 °C durante 30 minutos a 600 rpm. Se añadió 500 µL de cloroformo, se agitó por inversiones, se centrifugó a 10844 x g, durante 5 minutos, se separó la fase acuosa en tubos eppendorf de 2 mL, donde se añadió un 1 mL de buffer de unión, el cual se centrifugó a 10844 x g, durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a una columna de sílice para su purificación.

Se realizaron lavados con buffer de lavado y con etanol al 75% frío. Finalmente, se eluyó con buffer TE en tubos eppendorf de 1.5 mL, y se almacenaron a -20°C hasta su uso. El DNA fue cuantificado con el equipo Epoch de BioTeck y analizado por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio al 1%.

7.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se efectuó para la amplificar el gen ribosomal 16S, utilizando los cebadores fD1 y rD1, considerados como universales, dado que se usan para la mayoría de las eubacterias (Weisburg *et al.*, 1991). En la **Tabla 5** se muestran las secuencias de estos cebadores.

El ADNr 16S es usado a menudo para la construcción de filogenias debido a que es una región altamente conservada (Woese y Fox, 1977).

Tabla 5. Secuencias de los cebadores empleados (Weisburg *et al.*, 1991).

Primer	Secuencia
fD1	CCGAATCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

Para esta reacción se preparó la mezcla de acuerdo con las especificaciones del proveedor de la enzima utilizada (*Pfu* de Thermo Scientific) la proporción de los componentes se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Proporción de los componentes de la PCR (*Pfu* DNAPolymerase, Thermo Scientific, 2016).

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen(μ L)
Agua	-----	-----	completar hasta el volumen final
Buffer	10X	1X	5
Primer FW	100 mM	1 μ M	1
Primer RV	100 mM	1 μ M	1
dNTPs	100 mM	1 μ M	1
ADN molde	100 mM	3 ng/ μ L	5*
DNA polimerasa	2.5 U/ μ L	1 U	0.4
Volumen final	-----	-----	50

* el volumen necesario para tener una cantidad de 150 ng por reacción.

Se preparó en primer lugar una máster mix adicionando todos los componentes comenzando por el agua y terminando con la DNA polimerasa. Esta mezcla fue repartida en tubos eppendorf de 200 μ L; a las cuales se les adicio 5 μ L de ADN (aproximadamente 150 ng/reacción).

Posteriormente la reacción de PCR se efectuó en el termociclador Techgene de Techne. las condiciones de reacción se especifican en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de PCR (Weisburg *et al.*, 1991).

Etapa	temperatura	tiempo	ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	35 ciclos
Desnaturalización	95°C	2 min	
Alineamiento	42°C	0.5 min	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	10 min	
Conservación	4°C	∞	

Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio al 1%. Para cargar las muestras se agregaron 2 µL de buffer de carga (6X) por cada 5 µL del producto de PCR y se utilizó el marcador Gene Ruler 1 kbp de Thermo Scientific. Se corrió el gel a 80V en cámara horizontal marca Hoefer.

Los productos de PCR de las colonias que fueron seleccionadas para su identificación, fueron purificadas con el kit QIAEX II de Qiagen®. El protocolo se encuentra en el Anexo I.

7.7. Análisis de restricción del gen 16S (ARDRA)

Primeramente, se utilizó la herramienta simulación de restricción NEBcutter V2.0(disponible en <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (último acceso 8-10-18). La cual, fue utilizada en las secuencias de los microorganismos previamente identificados con el fin de predecir su patrón de bandeo.

Para el análisis de restricción, fueron seleccionadas dos endonucleasas de restricción. Los fragmentos de la hidrólisis del amplicón del ADNr 16S obtenidos de cada microorganismo permitió agrupar a los que presentasen un patrón similar entre ellos. En la Tabla 8 se muestran las diferentes enzimas utilizadas.

Tabla 8. Enzimas de restricción

Enzima	Secuencia de corte	Temperatura de corte
Hind III	A↓AGCTT	37°C
BamH I	G↓GATCC	37°C
EcoR I	G↓AATTC	37°C
Pst I	CTGCA↓G	37°C
Xho I	C↓TCGAG	37°C
Xba I	T↓CTAGA	37°C

En la tabla 9. Se describe la composición de la mezcla de reacción para cada digestión, con un volumen final de 20 µL.

Tabla 9. Componentes para la digestión.

Componente	Concentración	Volumen
Amplicón	-----	10 µL
Buffer	1X	2
Agua	-----	6
Enzima	1 U/µL	2

Las digestiones se realizaron a 37 °C durante 24 horas de acuerdo con la metodología reportada por García en el 2006.

Los fragmentos obtenidos de la digestión, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y corridos a 80V durante una hora, en cámara horizontal marca Hoefer. Las muestras fueron cargadas, adicionando 8 µL de ADN y 2 µL de buffer de carga (6X). Se utilizó el marcador de peso XIV de Roche.

7.8. Secuenciación

Tras el análisis ARDRA se seleccionaron aquellas colonias cuyo patrón de restricción fuese distinto de cada grupo. Del mismo modo fueron seleccionadas aquellas colonias que presentaban características fenotípicas notablemente distintas.

Previamente, los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAEX II de Qiagen®. El protocolo se encuentra en el Anexo I.

Los amplicones fueron secuenciadas por MACROGENE-Corea™.

7.9. Análisis de secuencias

Tras recibir los resultados de la secuenciación. Se obtuvieron diversas secuencias del gen ribosomal 16S (directo y reverso). Éstas se analizaron mediante el alineamiento en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del gen ribosomal 16S de la base de datos de la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2018), utilizando parámetros iniciales. Con esto se logró inferir el género y la especie. Sin embargo, fue necesario eliminar las regiones poco legibles de los electroferogramas, a esto se le conoce como curar la secuencia. Se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Una vez curadas estas secuencias fueron alineadas, para crear una secuencia consenso.

Después de haber creado la secuencia consenso, se realizó un alineamiento en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del gen ribosomal 16S de la base de datos de la NCBI. Se seleccionó la secuencia que tuviera la identidad, cobertura y longitud mayor, para realizar el análisis filogenético.

Así mismo, se compararon los resultados obtenidos con el BLAST vs RDB (Ribosomal Database) para asegurar que los resultados son consistentes.

La relación filogenética, se realizó con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Se infirió utilizando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol consenso obtenido fue inferido por un bootstrap con 1000 remuestreos y representa la relación entre las cepas analizadas. El valor que se muestra junto al nodo de donde se derivan las ramas del árbol corresponde el porcentaje en el que fueron asociadas las secuencias durante el análisis por bootstrap. Las distancias se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta (Tamura *et al.*, 2004). El análisis involucró secuencias de nucleótidos tanto secuencia problema como referencias tomadas del NCBI.

7.10. Evaluación de capacidades enzimáticas

Con el fin de detectar la capacidad enzimática de los microorganismos aislados, estos fueron inoculados en agar leche descremada, con el fin de detectar la hidrólisis de la caseína y comprobar la producción de proteasas (Bravo, 2017; Hernández, 2007) y en agar tributirina y agar aceite de oliva para observar la actividad esterasa y lipasa (García, 2006).

Se consideran como positivos a cada prueba cuando existen halos alrededor de una colonia, el tamaño del halo puede variar dependiendo de la cantidad de la enzima producida. Estos medios fueron preparados de acuerdo con la metodología del Anexo II. Se trabajó por duplicado utilizando *Kocuria rizophila* como control positivo, ya que esta bacteria presenta actividad proteasa, lipasa y esterasa. Se incubó durante 72 horas a 37°C, para observar la formación de los halos.

Así mismo, se utilizó agar RCMAS con el fin de cubrir las necesidades nutricionales de los microorganismos. Se suplementó con leche descremada, tributirina y aceite de oliva para evaluar la capacidad enzimática.

8. Resultados y discusión

8.1. Enriquecimiento

En la Figura 14 se observa que al adicionar la sal en el medio estéril ocurrió una precipitación. Esto se debe principalmente a la presencia del carbonato y a la sal cuya composición es compleja ya que tiene otros minerales los cuales pueden precipitar como lo son calcio y magnesio. Sin embargo, dentro de la precipitación se observaron dos fases solidas distintas una floculenta y otra más compacta.

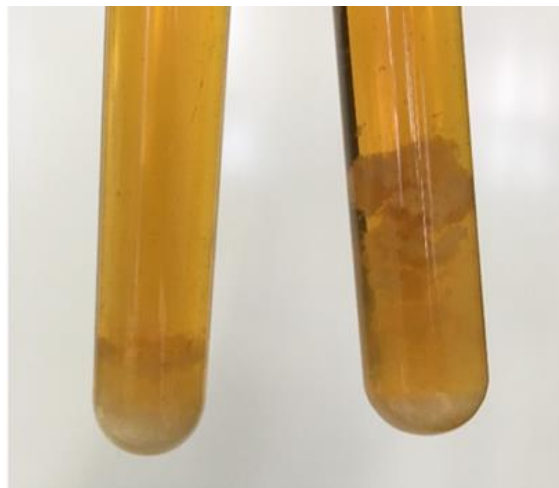


Figura 14. Formación de dos fases al añadir sal al medio. (Izquierda) La fase del fondo es sal no solubilizada. (Derecha mientras que la de la parte superior presenta forma floculenta, e insoluble

Tras 24 horas de incubación no había turbidez significativa. Sin embargo, transcurridas 48 horas de incubación, hubo turbidez mayormente en el centro de los tubos, lo que sugiere que dichos microorganismos sean anaerobios facultativos (Madigan *et al.*, 2015). Así mismo se observó, la aparición de burbujas en algunos tubos, esto se debió posiblemente a la formación de dióxido de carbono, producto del

metabolismo de los azúcares presentes en el medio. En la Figura 15 es posible observar estos fenómenos.

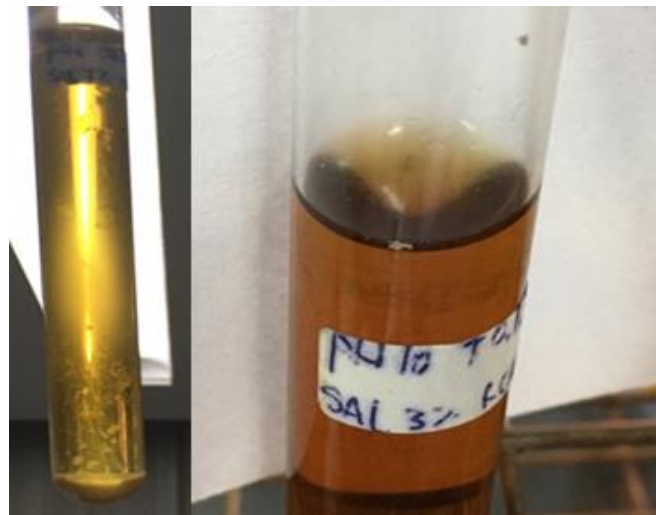


Figura 15. Crecimiento a las 48 horas de incubación a 37°C. Izquierda crecimiento al centro del tubo. Derecha formación de burbujas.

Cada tubo fue plaqueado y después de incubar a 37 °C durante 48 horas. Se observó la aparición de colonias distintas, en su forma, textura y coloración; algunas de las placas presentaron olor. Así mismo se obtuvieron tapetes de crecimiento microbiano (Figura 16).

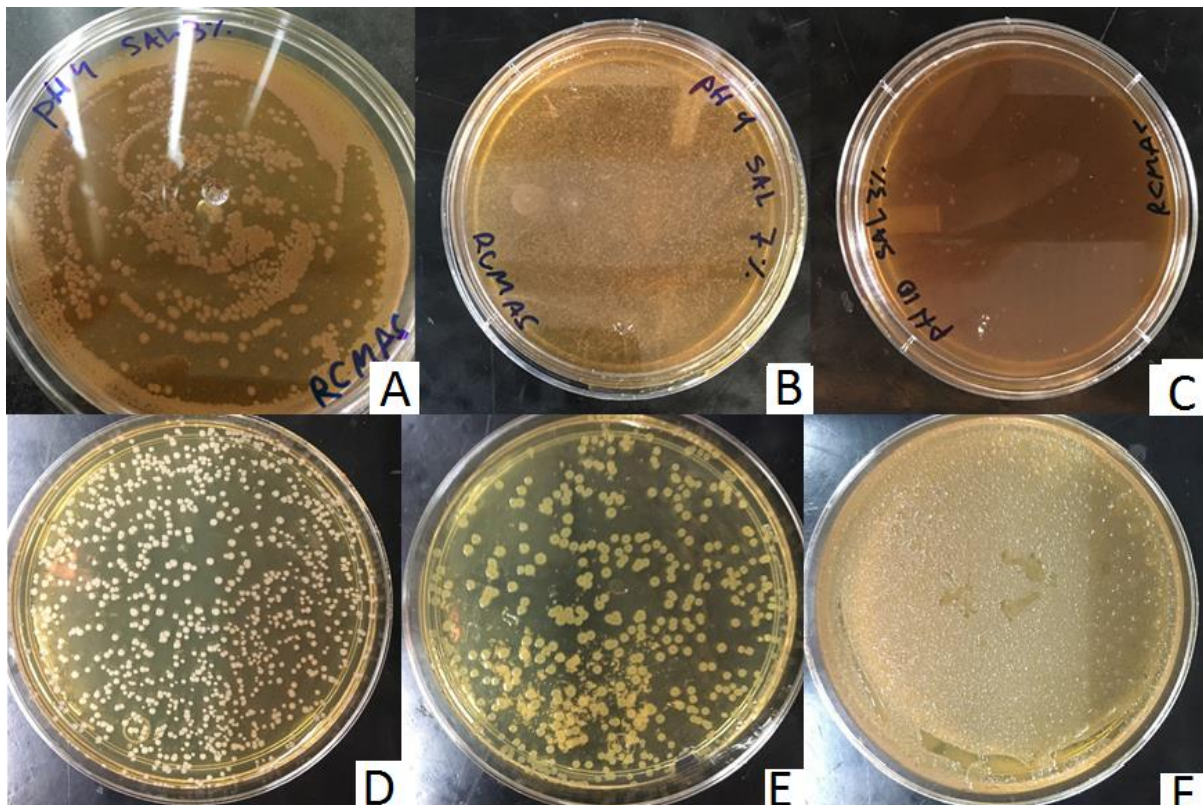


Figura 16. Diferencias morfológicas (forma, elevación, color y textura).

Se obtuvieron mayor número de colonias aisladas en el medio RCMAS que en el GYECS en condiciones aeróbicas, dado que el medio RCMAS contiene además del extracto de levadura, peptona y extracto de carne lo cual indica que una fuente de nitrógeno más rica tiene un efecto positivo en el desarrollo de las bacterias. Sin embargo, en condiciones anaerobias no hubo diferencia significativa entre estos dos.

Se han reportado resultados similares con ambos medios selectivos (Lucena-Padrós y Ruiz-Barba, 2015); sin embargo, algunas colonias sólo fueron aisladas en el medio GYECS, lo que sugiere que este medio podría ser más apropiado para cultivar la microbiota halófila/alcalófila presente en la sal de grano de Cuyutlán.

8.2. Aislamiento

Se aislaron colonias en cajas con agar correspondiente a cada condición de aislamiento (medio, pH, concentración de sal y disponibilidad de oxígeno) con el fin de obtener un cultivo axénico, para comprobarlo se realizó una tinción de Gram de cada colonia aislada (apartado 7.3). De este modo se lograron aislar ciento seis colonias en total.

A cada colonia se le asignó un código de seis caracteres, el cual contiene la información sobre las condiciones en las que fueron aisladas: medio (R, para RCMAS y G, para GYECS), disponibilidad de oxígeno (O, para aerobiosis y N, para anaerobiosis), número de caja (1 al 8), concentración de sal (3 y 7% (p/v)), pH (8, 9 y 1, para pH 10) y número de colonia (1 al 6). Así mismo las colonias que poseían características fenotípicas similares fueron agrupadas, de acuerdo a su morfología colonial (forma, color y textura) y en sus características microscópicas (Gram, agrupación y morfología celular). Otro criterio de selección utilizado fueron las pruebas de oxidasa y catalasa.

En las Tablas: 10, 11, 12 y 13 se describen estas características y en las Figuras 17, 18, 19 y 20, se muestran las fotografías de las tinciones de Gram de estas colonias.

Tabla 10. Agrupación de las distintas colonias aisladas en el medio RCMAS en aerobiosis. 37°C 48 horas.

Colonia(s)	Características morfológicas	Características microscópicas	Catalasa	Oxidasa
RO2383	Circular, de bordes enteros, elevación convexa, de textura membranosa-suave, blanca brillante	Bacilos cortos, Gram positivos	+	+
RO1792	Circular pequeña, de bordes enteros, elevación plana, de textura dura-seca, blanca	Bacilos largos, agrupados en cadena, Gram positivos	+	+
RO1782	Circular, de bordes enteros, elevación convexa, de textura butirosa, blanquecina	Bacilos cortos, de bordes rectos en cadena, Gram positivos	+	+
RO2781	Circular de tamaño pequeño, de bordes enteros, elevación convexa, de textura butirosa, blanca	Bacilos, de bordes rectos en cadena, Gram positivos	+	+
RO1391	Circular, de bordes enteros, elevación convexa, de textura viscosa, rosa pálido brillante	Bacilos pleomórficos, sin agrupación, presentan cuerpos de inclusión o esporas, Gram positivos	+	+
RO2391	Circular, de bordes enteros, elevada, de textura butirosa-suave, blanquecina-traslucida opaca	Bacilos en cadena y sin agrupación, Gram positivos	+	+
RO1312	Circular, de bordes enteros, elevación plana, de textura butirosa, translucida, opaca	Bacilos largos, Gram positivo	+	+
RO1311	Circular, de bordes enteros, elevación convexa, de textura butirosa, blanca opaca y rosada de los bordes	Bacilos, en cadena, Gram positivos	+	+

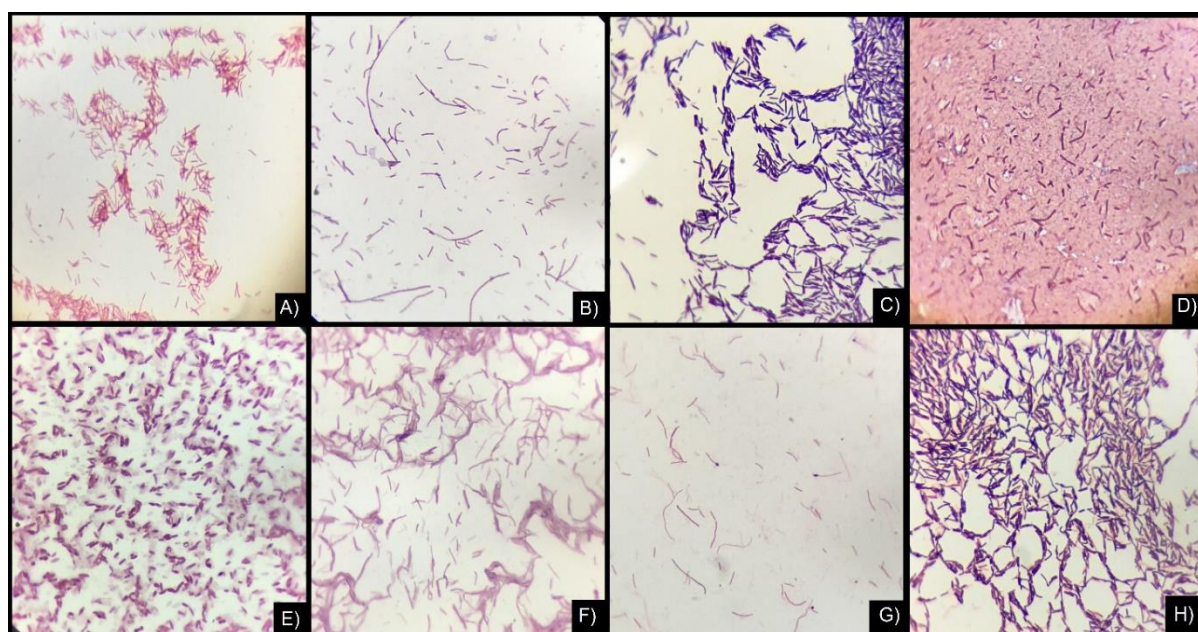


Figura 17. Tinción de Gram de las colonias aisladas en el medio RCMAS en aerobiosis: A) RO2383, B) RO1792, C) RO1782, D) RO2781, E) RO1391, F) RO2391, G) RO1312, H) RO1311.

Tabla 11. Agrupación de las distintas colonias aisladas en el medio GYECS en aerobiosis. 37°C 48 horas.

Colonia(s)	Características morfológicas	Características microscópicas	Catalasa	Oxidasa
GO3781	Circular de tamaño pequeño, de bordes enteros, elevación convexa, textura cremosa, blanquecina y presentan olor característico del queso	Bacilos cortos, rectos y de bordes redondeados agrupados en empalizada, Gram positivos	+	+
GO4784	Circular, de bordes ondulados, elevación convexa, textura cremosa, color amarillo	Bacilos, rectos y de bordes redondeados agrupados en empalizada, Gram positivos	+	+
GO3793	Circular, de bordes lobulados, elevación rugosa, de textura seca-viscosa, color blanco opaco	Bacilos cortos, de bordes redondeados agrupados en diplos o cadenas, alrededor de la célula se observa un halo, Gram positivos	+	-

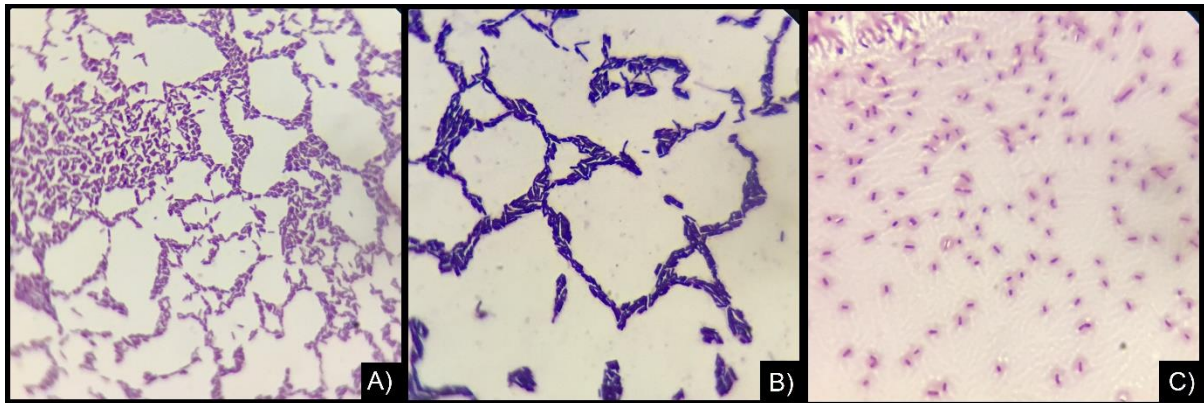


Figura 18. Tinción de Gram de las colonias aisladas en el medio GYECS en aerobiosis: A) GO3781, B) GO4784, C) GO3793.

Tabla 12. Agrupación de las distintas colonias aisladas en el medio RCMAS en anaerobiosis. 37°C 48 horas.

Colonia(s)	Características morfológicas	Características microscópicas	Catalasa	Oxidasa
RN5383 , RN5382	Circular, bordes enteros, elevación plana, textura viscosa, amarillenta	Bacilos, bordes redondos en cadena, Gram positivos	+	-
RN6382 , RN5312, RN6381	Circular, bordes enteros, elevación umbonada, textura viscosa, blanca-traslucida	Bacilos delgados, bordes rectos sin agrupación, Gram positivos	-	-
RN5781 , RN5782, RN5783, RN6782, RN6783, RN5391	Circular, bordes enteros, elevación convexa, textura viscosa, blanquecina	Bacilos, bordes redondos en cadena y en empalizada, Gram positivos	+	-
RN5392 , RN5393, RN5394	Puntiforme, de bordes irregulares, elevada, de textura viscosa-dura, blanquecina	Bacilos cortos, de bordes redondeados agrupados en diplos o cadenas, alrededor de la célula se observa un halo, Gram positivos	+	-
RN6391 , RN5711, RN6713	Circular, de bordes enteros, elevación convexa, de textura viscosa, blanquecina	Bacilos delgados, bordes rectos sin agrupación, Gram positivos	+	-
RN6393 , RN6394, RN6392	Circular pequeña, de bordes enteros, elevación convexa, de textura viscosa, blanquecina	Bacilos, bordes redondos en cadena, Gram negativos	+	-
RN5791 , RN5792, RN6792, RN6781, RN6311, RN6312, RN6312	Circular, bordes enteros, elevación umbonada, textura viscosa, blanquecina	Bacilos, bordes redondos en cadena y en empalizada, Gram positivos	+	-
RN5311 , RN5313	Circular, bordes enteros, elevación umbonada, textura viscosa, blanquecina	Bacilos, bordes redondos en cadena y en empalizada, Gram negativos	-	-
RN5712	Circular pequeña, bordes enteros, elevación convexa, textura viscosa, blanquecina brillante	Bacilos sin agrupación, Gram negativos	+	-

Las colonias con códigos en negritas se seleccionaron para secuenciar e identificar.

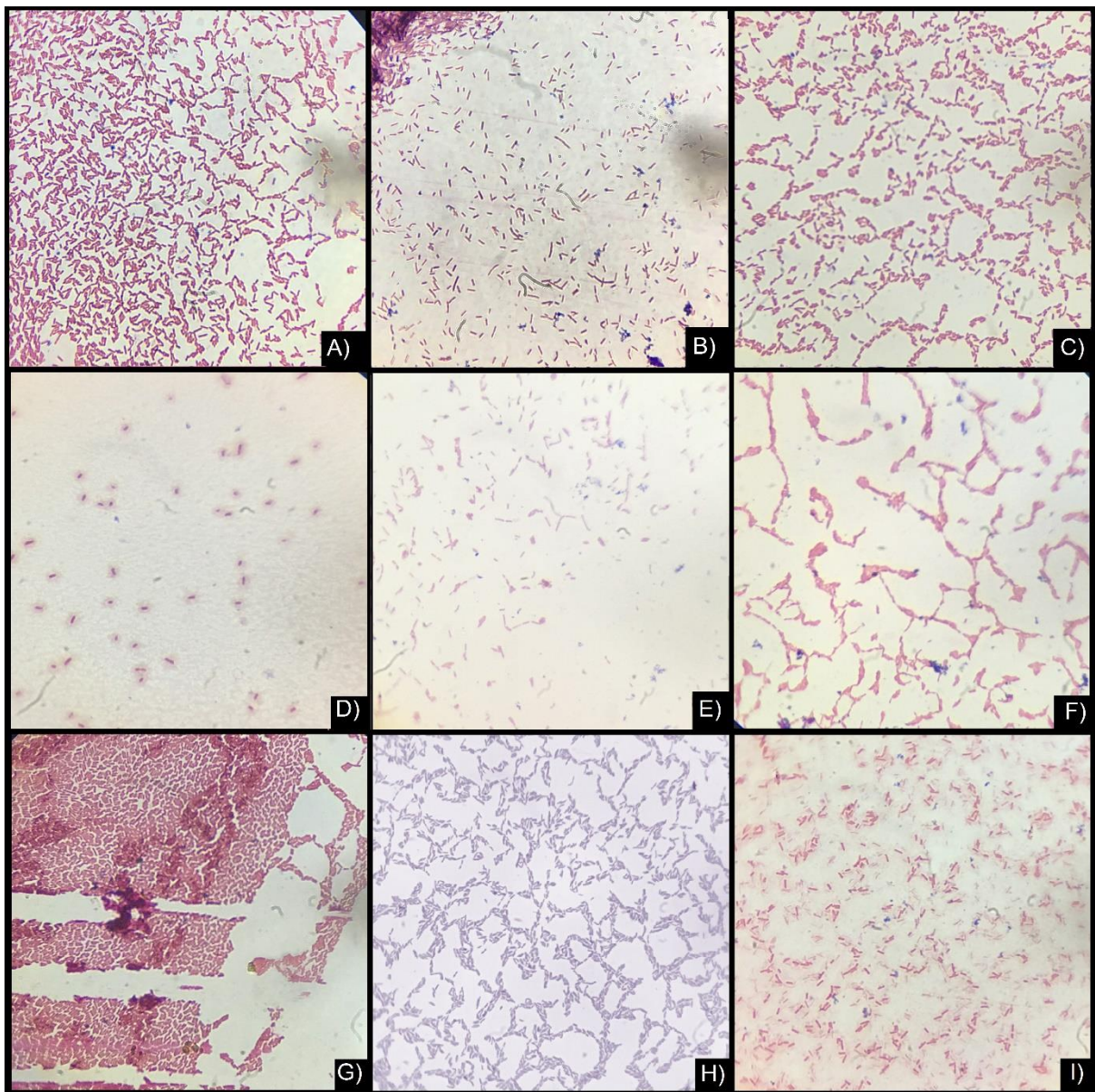


Figura 19. Tinción de Gram de las colonias aisladas en el medio RCMAS en anaerobiosis: A) RN5383, B) RN6382, C) RN5781, D) RN5392, E) RN6391, F) RN6393, G) RN5791, H) RN5311, I) RN5712.

Tabla 13. Agrupación de las distintas colonias aisladas en el medio GYECS en anaerobiosis.

Colonia	características morfológicas	características microscópicas	Catalasa	Oxidasa
GN8385 , GN8382, GN7792, GN7781, GN7782, GN7783, GN7312	Puntiforme, de bordes irregulares, textura seca-viscosa, color blanquecina-amarillenta	Bacilos cortos, de bordes redondeados agrupados en diplos o cadenas, alrededor de la célula se observa un halo, Gram positivos	+	+
GN8781 , GN8782, GN8783	Circular pequeña, de bordes enteros elevación convexa, de textura viscosa, blanca	Bacilos en letras chinas, Gram positivos	+	-
GN7393 , GN7392, GN8395, GN8396, GN7391, GN8394	Circular, de bordes enteros elevación convexa-espinalada, de textura viscosa, blanquecina	Bacilos, rectos y de bordes redondeados agrupados en empalizada, Gram positivos	+	-
GN8792 , GN8793	Circular, de bordes enteros, plana, de textura viscosa, crema	Bacilos cortos, delgados, de bordes rectos, Gram positivos	+	-
GN7311	Circular, de bordes irregulares elevación convexa-papilar, de textura butirosa, grisácea	Bacilos largos, agrupados en cadena Gram positivos	+	-
GN8311 , GN8312, GN8314	Circular pequeña, de bordes irregulares elevación convexa, de textura butirosa, blanca	Bacilos cortos, de bordes redondeados, Gram positivos	+	-
GN8313	Circular, de bordes enteros elevación convexa-espinalada, de textura viscosa, naranja	Cocos grandes, agrupados en racimo de uvas, Gram positivos	-	-
GN7313 , GN7711, GN8712	Circular, de bordes enteros elevación convexa, de textura viscosa, amarillenta brillante	Bacilos cortos, delgados, de bordes rectos, Gram positivos	+	-
GN8711 , GN7712, GN8713	Circular, de bordes enteros elevación convexa, de textura butirosa, blanquecina	Bacilos largos, agrupados en cadena Gram positivos	+	-

Las colonias con códigos en negritas se seleccionaron para secuenciar e identificar.

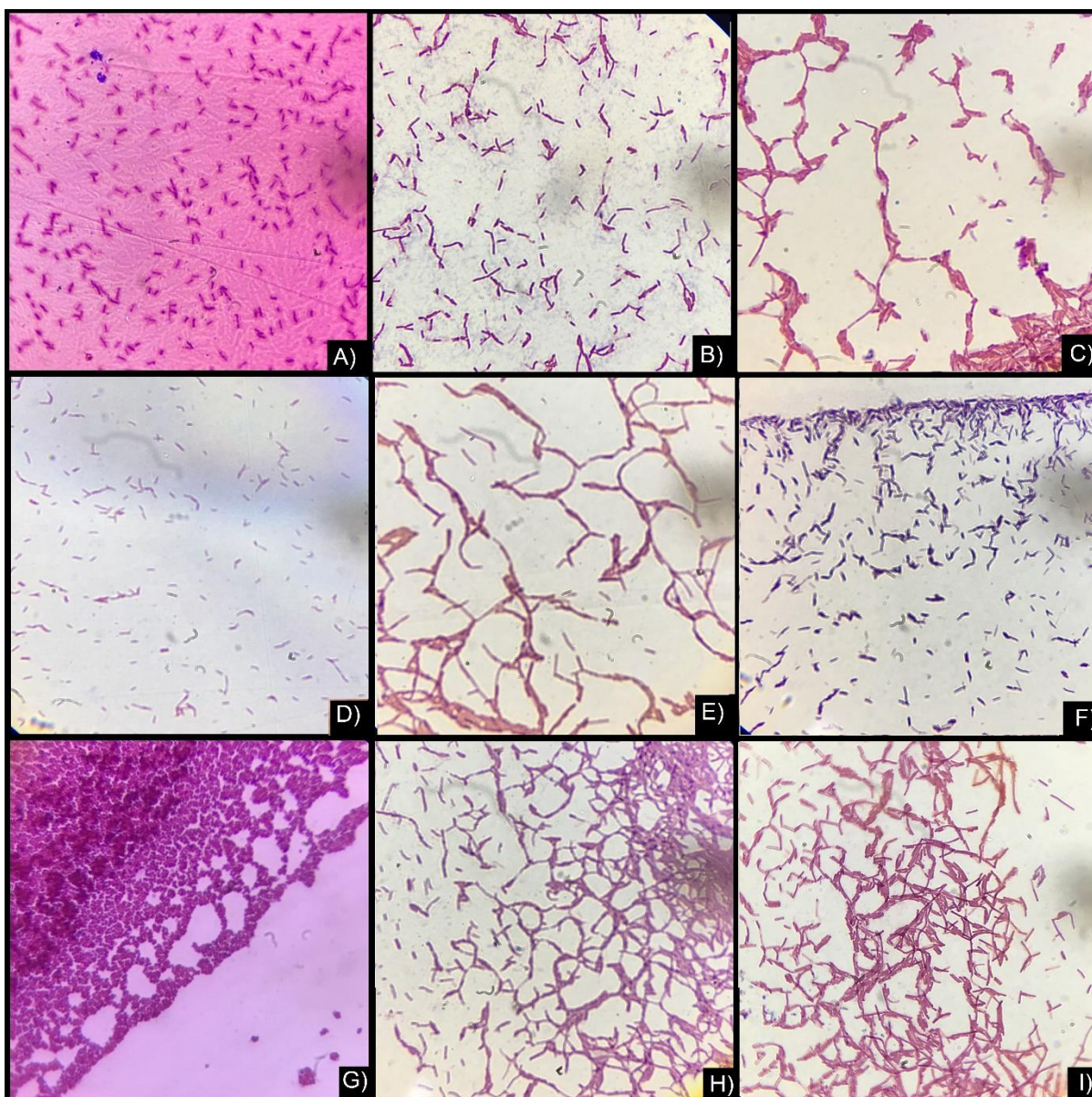


Figura 20. Tinción de Gram de las colonias aisladas en el medio GYECS en anaerobiosis: A) GN8385, B) GN8781, C) GN7393, D) GN8792, E) GN7311, F) GN8311, G) GN8313, H) GN7713, I) GN8711.

Para cada grupo colonial, se seleccionó a una colonia representante (letras negritas, al inicio de cada grupo), la cual sería analizada e identificada mediante métodos moleculares.

8.3. Evaluación de capacidades enzimáticas

Se detectó la capacidad enzimática de los microorganismos aislados, en los medios utilizados (agar leche descremada, agar RCMAS/ leche descremada, agar tributirina, agar RCMAS-Tributirina, agar aceite de oliva y agar RCMAS- aceite de oliva). Estos resultados, proporcionaron información sobre el metabolismo de las bacterias. Estas contienen enzimas que las ayudaron a sobrevivir en distintos ambientes, dado que les permite degradar compuestos complejos para la obtención de nutrientes.

8.3.1. Actividad proteasa

A continuación se muestran únicamente a las colonias que crecieron en el medio agar leche descremada, las cuales presentaron actividad en condiciones aeróbicas (Figura 21). Las colonias que presentaron actividad fueron: RO1792, GO4784 y RO1311.

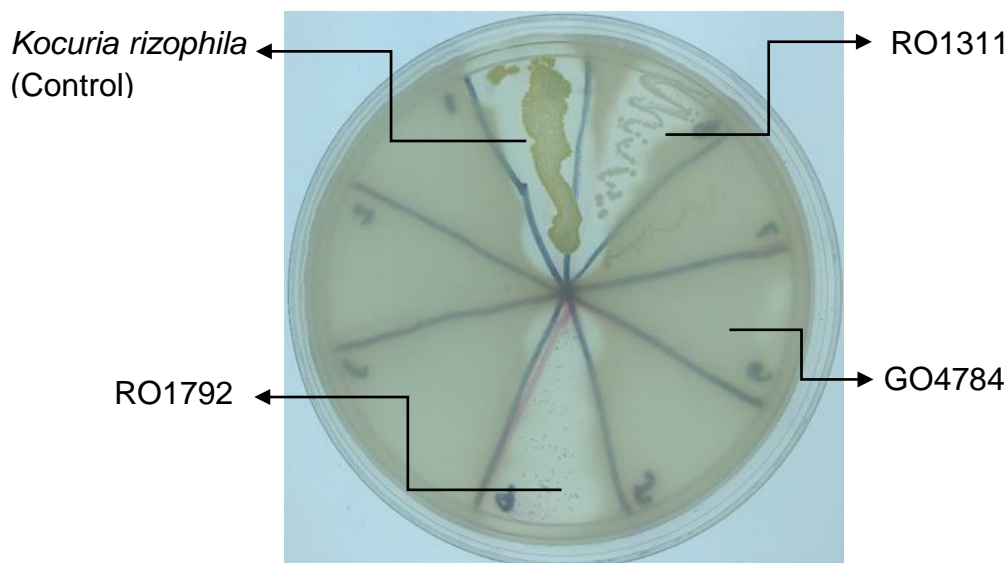


Figura 21. Halos y colonias en agar leche descremada en aerobiosis.

En la Figura 22 se observa el crecimiento y la actividad observada en condiciones anaeróbicas, las colonias que presentaron actividad fueron: GN8781, GN8313 y GN8385.

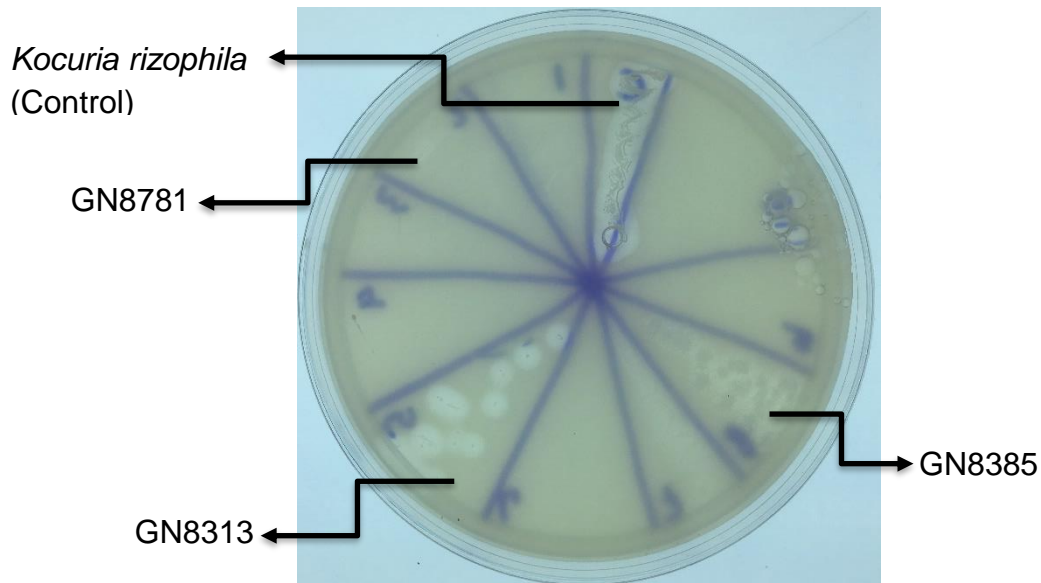


Figura 22. Halos y colonias en agar leche descremada en anaerobiosis.

Del mismo modo en la Figura 23, se observó la actividad proteasa en condiciones halófilas y alcalinas de las colonias en aerobiosis: RO1391, RO1792, GO4784, RO1311 y RO1782.

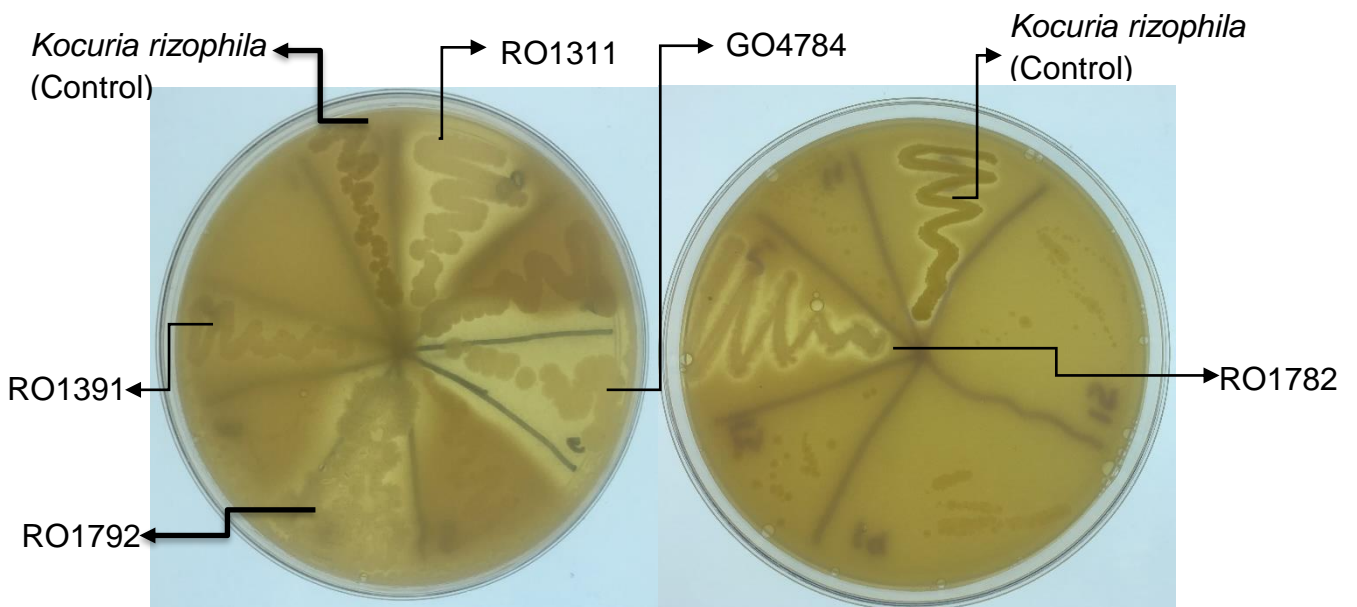


Figura 23. Halos y colonias en agar RCMAS/leche descremada en aerobiosis.

En la Figura 24 se observó la misma actividad, sin embargo, correspondió a las condiciones anaeróbicas de las colonias: RN5383, GN8781, RN5791, GN8313, GN7393, GN8385 y GN8792. Se muestran únicamente a las colonias que presentaron actividad.

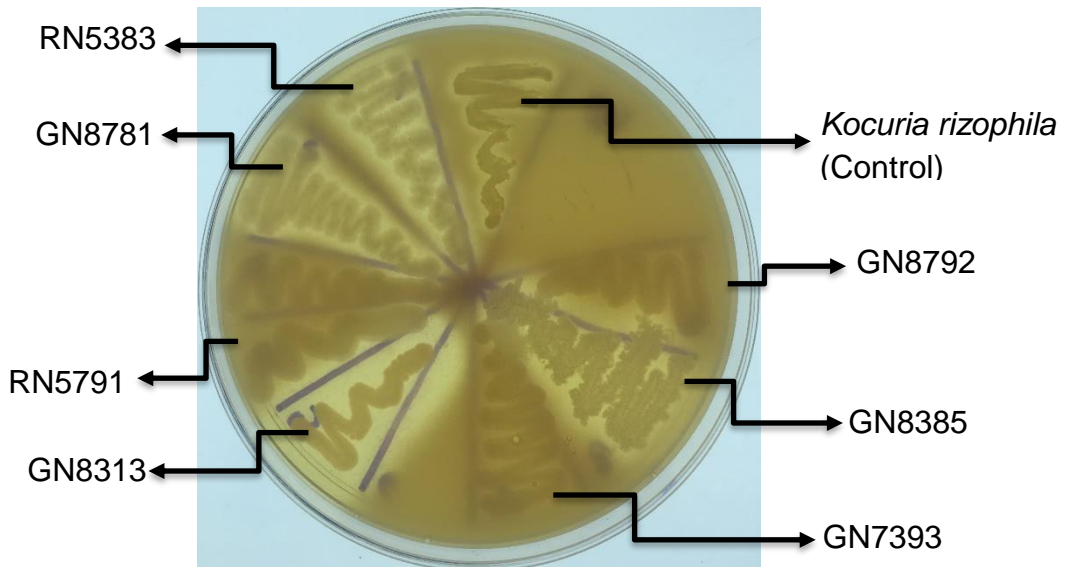


Figura 24. Halos y colonias en agar RCMAS/leche descremada en anaerobiosis.

8.3.2. Actividad esterasa

Se muestran únicamente a las colonias que presentaron actividad. En la Figura 25, se observan los halos de hidrólisis y el crecimiento en el agar tributirina en condiciones aeróbicas. Las colonias que presentaron actividad fueron: RO1391 y RO1311.

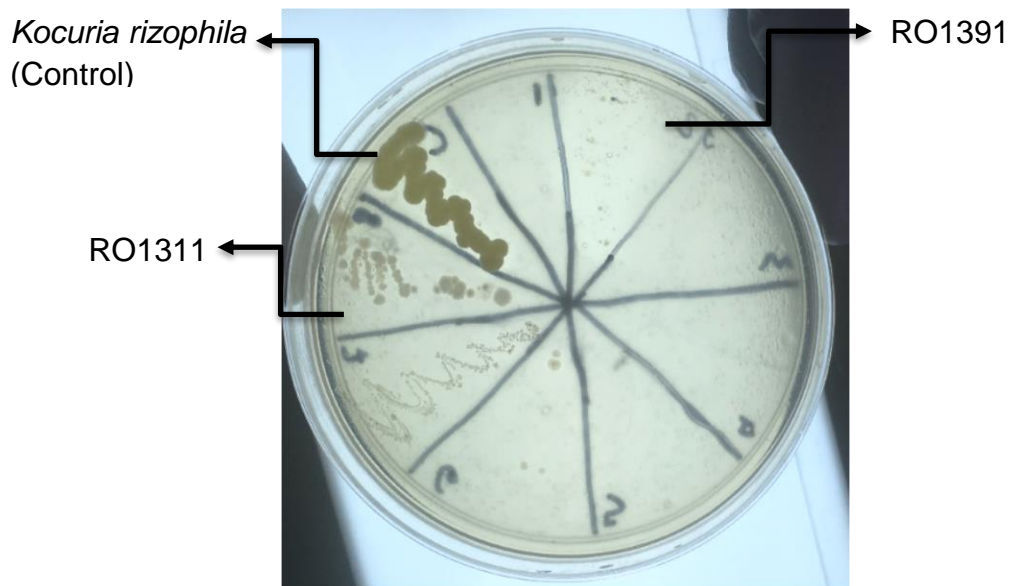


Figura 25. Halos y colonias en agar tributirina en aerobiosis.

Del mismo modo en la Figura 26, se observó la actividad esterasa en condiciones halófilas y alcalinas de las colonias en aerobiosis: RO1311, GO3781, GO4784, RO2781 y RO1782.

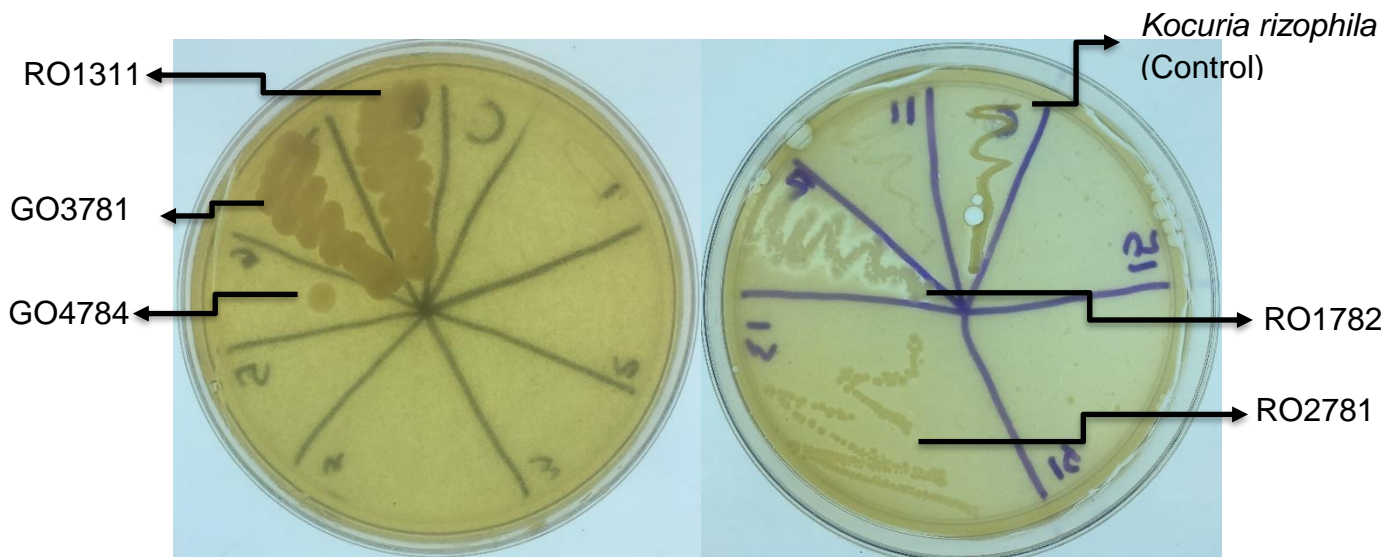


Figura 26. Halos y colonias en agar RCMAS-tributirina en aerobiosis.

En la Figura 27 se observó la misma actividad, en condiciones anaeróbicas de las colonias: RN5383, GN8781, GN7313, RN5791, GN7393 y GN8792.

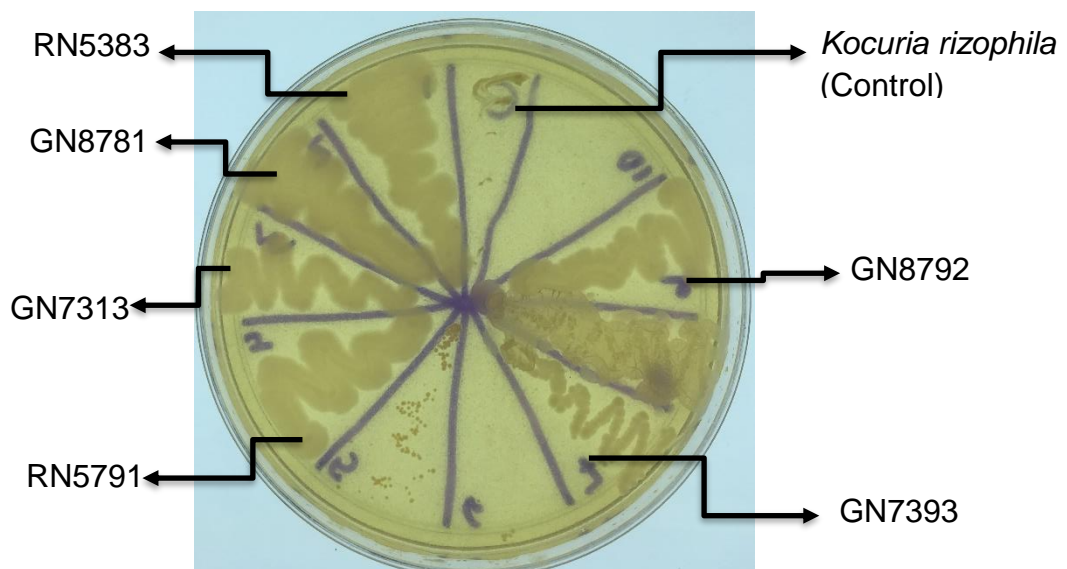


Figura 27. Halos y colonias en agar RCMAS-tributirina en anaerobiosis.

8.3.3. Actividad lipasa

Se muestran únicamente a las colonias que presentaron actividad. En la Figura 28, se observaron los halos de hidrólisis y el crecimiento en agar aceite de oliva en condiciones anaeróbicas. Las colonias que presentaron actividad fueron: RN5383, GN8781, GN7313, RN5791, GN8313, GN7393, GN8385 y GN8792.

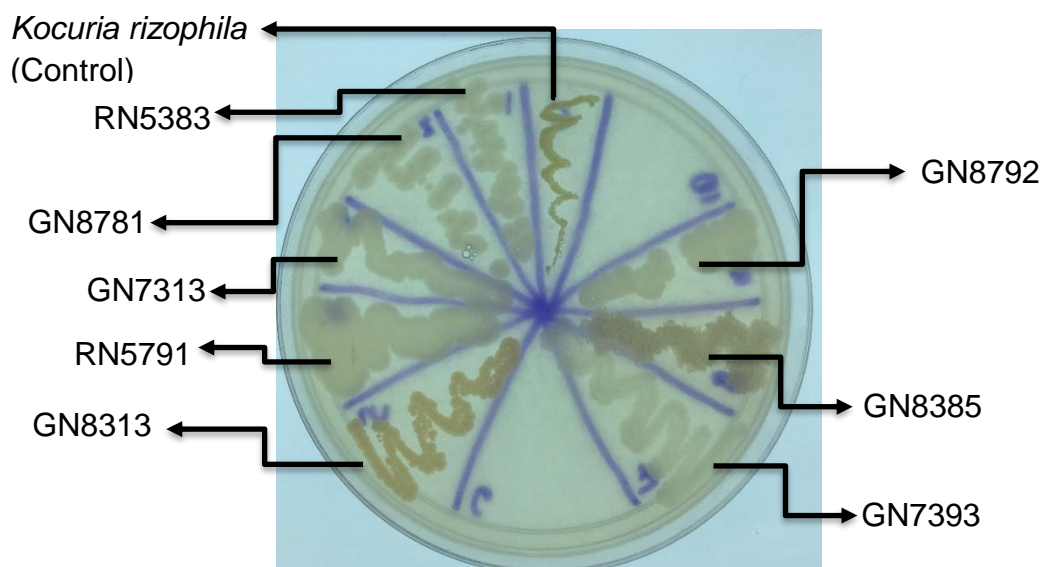


Figura 28. Halos y colonias en agar aceite de oliva en anaerobiosis.

En la **Tabla 14**. Se presenta el resultado de la actividad cualitativa de las pruebas del potencial enzimático (proteasa, esterasa y lipasa) con respecto a un control, el cual se utilizó como parámetro comparativo. Sin embargo, en condiciones de pH alcalino la actividad de algunas cepas fue mayor al control, esto se debe a que dicha referencia produjo enzimas cuya actividad óptima es en pH neutro.

Tabla 14. Resumen de las actividades enzimáticas.

Cepa	Actividad				
	Neutra			Alcalina	
	Proteasa	Esterasa	Lipasa	Proteasa	Esterasa
<i>Kocuria rizophila</i>	++++	++++	++++	+++	+++
RO1782				++++	+++
RO2781					+
RO1391		+		+	
RO1792	++++			++	++
RO1311	+++	+++		+++++	++
GO3781					+
GO4784	+			+++++	
RN5383			+	++++	++
RN5791			+	+	+
GN8385	++		++	++++	
GN8781	+		+	++++	+
GN7393			+	++	++++
GN8792			+	+	++
GN7313			++		+
GN8313	+++		++++	+++++	

8.4. Extracción de ADN

Después de agrupar y seleccionar las colonias se procedió a realizar la identificación mediante métodos de biología molecular. Para ello se extrajo y purificó el ADN de cada una de estas colonias seleccionadas.

Una vez extraído y purificado el ADN, este fue cuantificado, los resultados se muestran en la **Tabla 15**. La relación 260/280 es aproximadamente de dos, por lo que dicho ADN es de buena calidad, integro y de pureza adecuada respecto a la concentración de o componente que absorbe a 260 nm. Las muestras de ADN fueron cargadas en geles de agarosa para la verificación de su integridad, dichos geles se muestran en la Figura 29.

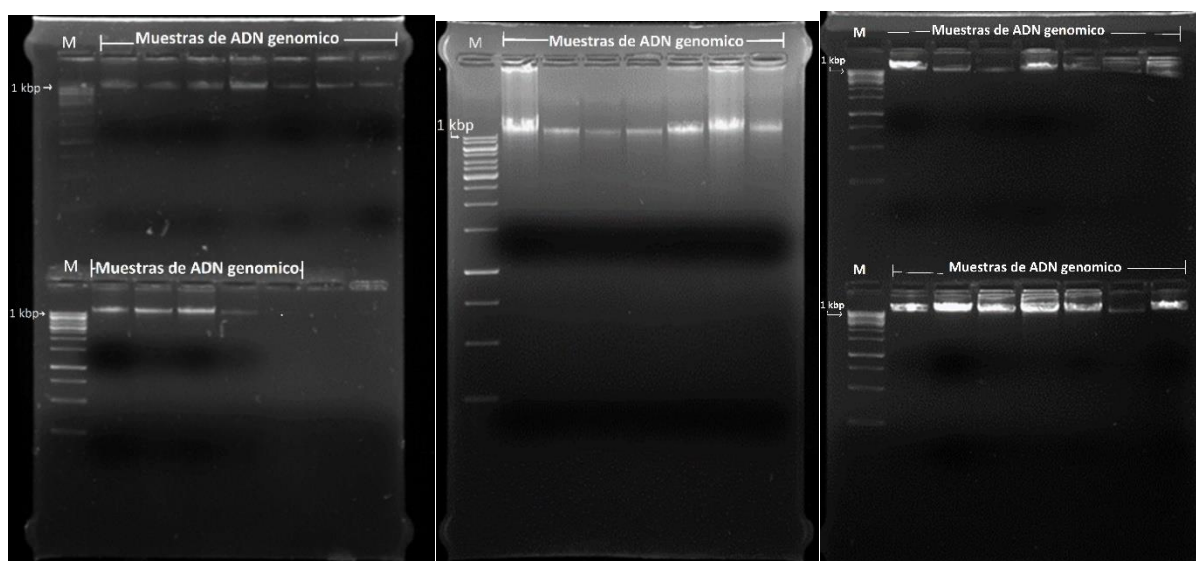


Figura 29. ADN genómico extraído de las cepas seleccionadas. Geles de agarosa al 1% (teñidos con bromuro de etidio al 1%) M) marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific)

Tabla 15. Calidad del ADN extraído.

Muestra	Concentración ng/uL	Relación 260/280	Muestra	Concentración ng/uL	Relación 260/280
RO1391	86.36	1.94	RN5311	42.19	2.08
RO1792	91.66	2.05	GN8781	85.45	2.06
RO2391	111.34	2.04	GO3793	25.12	2.01
RO1312	66.88	2.19	GN7311	58.76	2.07
RO2383	79.35	2.11	RN5791	56.09	1.99
RO1311	140.41	2.22	GN8313	68.19	1.99
RO1313	224.92	1.93	RN5392	32.22	1.93
RO1314	365.26	2.00	RN6391	35.85	2.14
RO2396	62.03	1.97	GN8385	21.13	2.16
RO2781	33.22	2.09	GN8792	242.50	2.26
RO1782	36.90	1.94	RN5781	18.57	1.91
GO3781	57.66	1.99	GN8711	46.98	2.06
GO4784	40.00	2.00	GN7393	100.86	1.98
RN6393	117.07	1.99	GN7313	52.63	2.03
RN5383	20.42	1.97	RN5712	17.24	2.08
GN8314	52.06	1.98	GN8311	68.33	2.04

8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN extraído de cada colonia, fue utilizado como molde para la amplificación del gen ribosomal 16S mediante PCR.

Los amplicones se utilizaron para la identificación de las bacterias mediante secuenciación. En las Figura 30, 31, 32, 33, 34 y 35 se muestran los geles de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio al 1%. Donde se revela el producto de PCR, con un tamaño aproximado de 1500 pb.

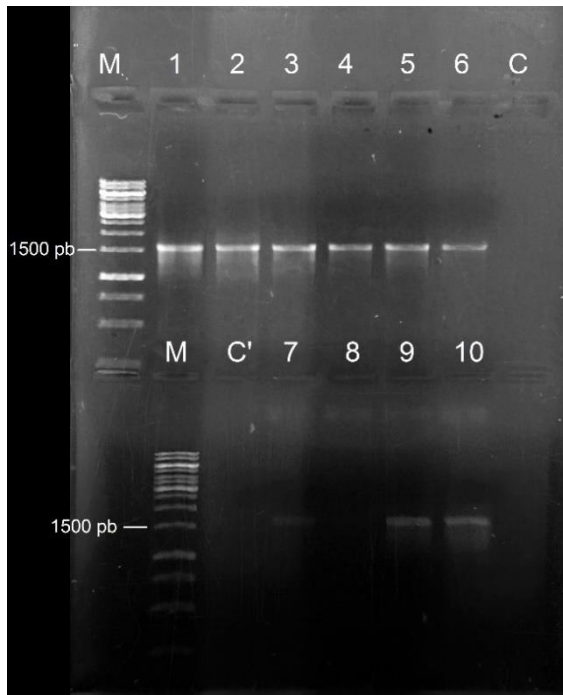


Figura 30. Amplicones del gen ribosomal 16S. Aislamientos: 1 y 2) RO1391, 3 y 4) RO2391, 5 y 6) RO1792, 7 y 8) RO1312, 9 y 10) RO2383, C) blanco sin ADN, M) marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1%

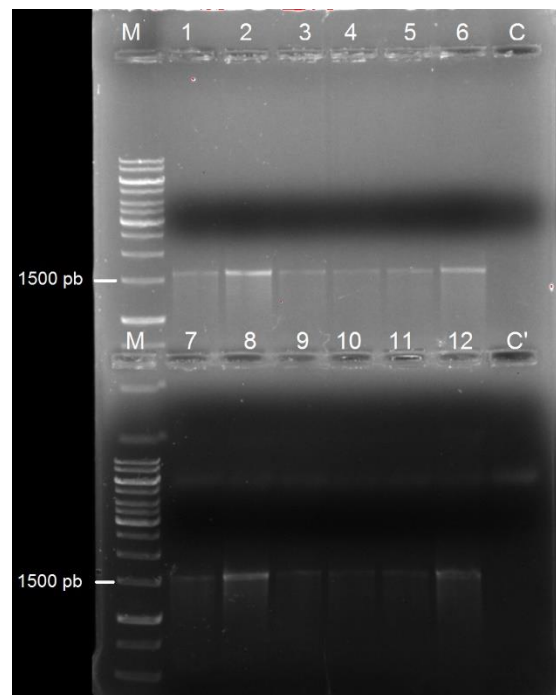


Figura 31. Amplicones del gen ribosomal 16S. Aislamientos: 1 y 2) RO1782, 3 y 4) RO2781, 5 y 6) RO2393, 7 y 8) RO1314, 9 y 10) RO1313, 11 y 12) RO1311, C) blanco sin ADN, M) marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1%

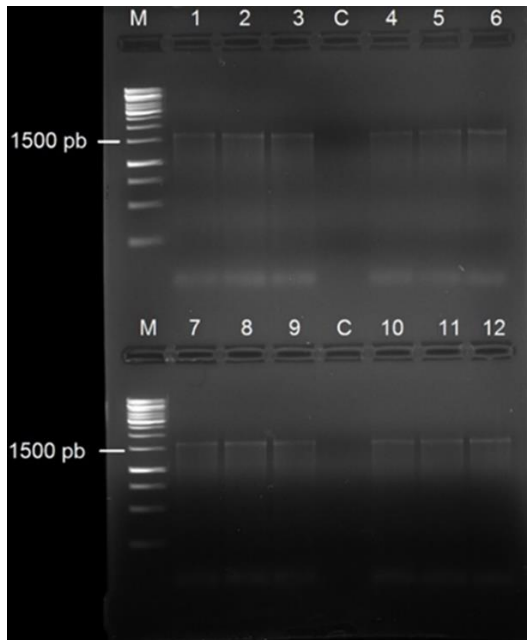


Figura 32. Amplicones del gen ribosomal 16S. Aislamientos: 1 y 7) GO3781, 2 y 8) RN6382, 3 y 9) RN5311, 4 y 10) GO4784, 5 y 11) GO3793, 6 y 12) GN8313, C) blanco sin ADN, M) marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1%

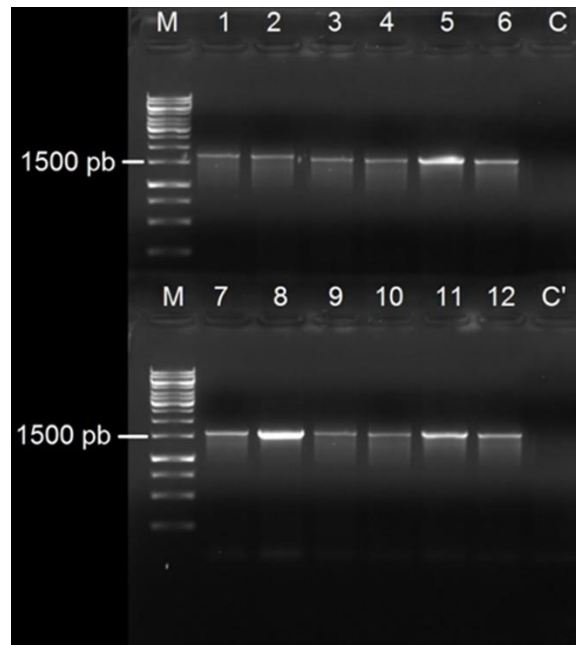


Figura 33. Amplicones del gen ribosomal 16S. Aislamientos: 1 y 7) GN8311, 2 y 8) RN5392, 3 y 9) RN5781, 4 y 10) RN6391 5 y 11) GN8712, 6 y 12) RN5712, C) blanco sin ADN, M) marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1%

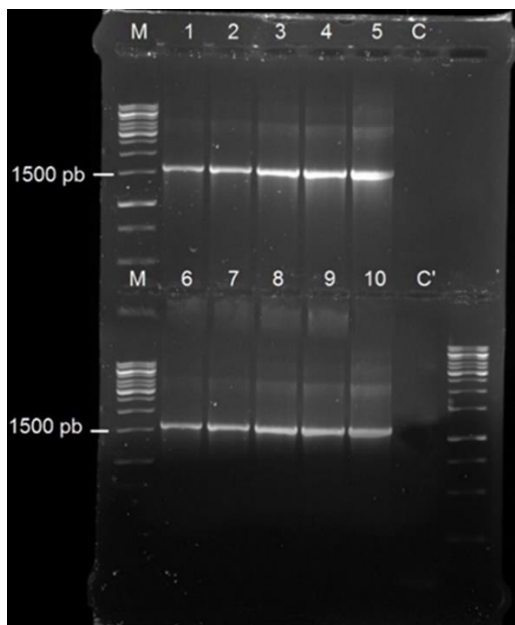


Figura 34. Amplicones del gen ribosomal 16S. Aislamientos: 1 y 6) GN7393, 2 y 7) GN8792, 3 y 8) GN8313, 4 y 9) GN7313, 5 y 10) GN8314, C) blanco sin ADN, M) marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1%

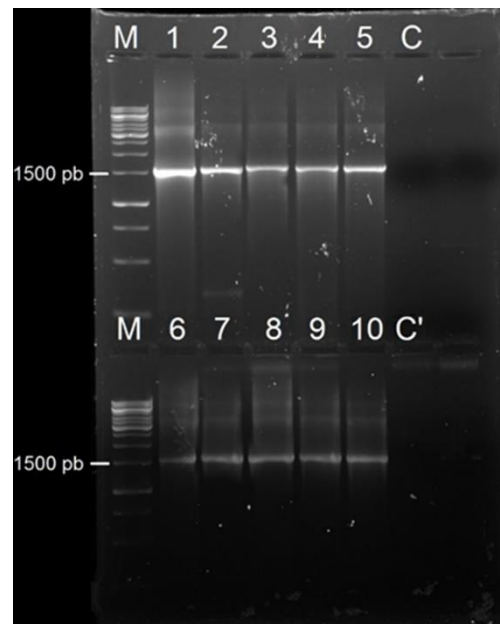


Figura 35. Amplicones del gen ribosomal 16S. Aislamientos: 1 y 2) RN5791, 3 y 4) GN8385, 5 y 6) RN5383, 7 y 8) GN8781, 9 y 10) GN7311, C) blanco sin ADN, M) marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1%

8.6. Análisis de restricción del gen 16S (ARDRA)

Con el análisis de restricción se supo si los aislamientos son distintos entre sí, dado que las características fenotípicas no representan un criterio para discernir si estos son diferentes. Previamente fueron elegidas las enzimas de restricción, con las que se llevó a cabo la digestión de los amplicones. Las únicas que tuvieron sitios de corte fueron Pst I y EcoR I.

Sin embargo, se decidió trabajar únicamente con Pst I, ya que EcoR I corta una región conservada del gen ribosomal 16S, por lo que no nos daría tanta información. A partir de algunas secuencias obtenidas previamente se utilizó el programa NEBcutter V2.0 (disponible en <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (ultimo acceso 8-10-18)) Los resultados obtenidos en este programa se muestran en el Anexo III. Con este hecho se dedujo el posible patrón que deberían tener las colonias.

Se reagruparon las colonias de acuerdo al patrón de bandeo, dado que se observó el corte de algunos fragmentos de ADN por parte de la endonucleasa de restricción tipo II. Sin embargo, no hubo corte por la misma en otras muestras de ADN. Con esta información fue posible determinar aquellas colonias que serían secuenciadas. En la **Tabla 16**. Se muestran los nuevos grupos, así como las colonias seleccionadas para secuenciar.

Tabla 16. Grupos ordenados a su patrón de restricción del gen ribosomal 16S. En negritas se muestran las colonias seleccionadas para ser secuenciadas.

Presentaron corte con Pst I	Longitud del fragmento	No presentaron corte con Pst I
GN8385 , GO3793, RN5392, RN5393, RN5394	850 pb +650 pb	GN7311, GN8314, GN8711, GN7712
		GN8313
GN8792	800 pb +700 pb	RO1782
RO1313, RO1314, RO2396, RO2781	850 pb +650 pb	GN7711, GN7313 , GN8781
RN5791 , RN6312,	900 pb +600 pb	RN5383 , RN5712

8.7. Identificación

En la **Tabla 17**. Se muestran los resultados del análisis de identidad con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del gen ribosomal 16S de la base de datos de la NCBI, los cuales fueron consistentes con los obtenidos en el RBD (Ribosomal Database).

Tabla 17. Resultados del alineamiento del gen ribosomal 16S.

Colonia	Especie	Referencia NCBI	Cobertura	Expectancia	Identidad
RN6382	<i>Amphibacillus marinus</i>	NR_108711.1	100%	0	98%
GN7393	<i>Bacillus circulans</i>	MH910254.1	100%	0	99%
RO1311	<i>Bacillus clausii</i>	NR_026140.1	99%	0	97%
GO4784	<i>Bacillus gibsonii</i>	NR_026143.1	100%	0	99%
RO1792	<i>Bacillus licheniformis</i>	LN995452.1	100%	0	100%
GN8385	<i>Bacillus licheniformis</i>	LT223628.1	100%	0	99%
RO1391	<i>Bacillus persicus</i>	NR_109140.1	95%	0	98%
RO1782	<i>Bacillus swezeyi</i>	NR_157608.1	100%	0	100%
GN8313	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	KX008295.1	100%	0	99%
GN7313	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	MG705785.1	96%	0	99%
GO3781	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	LT558824.1	100%	0	99%
RO2391	<i>Paraliobacillus quianhiensis</i>	NR_044411.1	100%	0	99%
RN5791	<i>Paraliobacillus ryukyuensis</i>	NR_113871.1	94%	0	99%
RN5311	<i>Paraliobacillus ryukyuensis</i>	NR_028642.1	100%	0	99%
GN8792	<i>Virgibacillus chiguensis</i>	KT758456.1	93%	4x10 ⁻¹⁶⁷	97%
RO2383	<i>Virgibacillus koreensis</i>	NR_043025.1	100%	0	98%
RO1312	<i>Virgibacillus koreensis</i>	NR_043025.1	100%	0	98%
RO2781	<i>Virgibacillus marismortui</i>	MF321845.1	100%	0	99%
RN5383	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	CP018622.1	100%	0	99%
GN8781	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	CP018622.1	100%	0	99%

De acuerdo con los resultados obtenidos por el alineamiento, utilizando el algoritmo BLAST se observaron valores altos de identidad para las cepas aisladas. Así mismo se consultó en la literatura, las características de los microorganismos aislados, comparándolos con los resultados obtenidos en este trabajo.

El BLAST es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, que compara las secuencias problema contra diferentes secuencias depositadas en una base de datos del GenBank; dando como resultado una amplia lista de microorganismos similares a esa secuencia. Sin embargo, es importante destacar que este tipo de programa sigue un algoritmo de tipo heurístico por lo que se realizan únicamente alineamientos locales, por lo que las similitudes en contrarias no siempre corresponden a esa secuencia (Altschul *et al.*, 1990). Dado este problema se necesita complementar la identificación con la elaboración de un análisis de agrupación al comparar la secuencia del gen completo contra referencias con algoritmo presentado en la metodología (apartado 7.9).

En la Figura 36, 37 y 38 se observan los árboles de agrupación obtenido, este tiene una enorme relación de parentesco con los resultados obtenidos en el BLAST. Sin embargo, este método de identificación es más confiable que el BLAST.

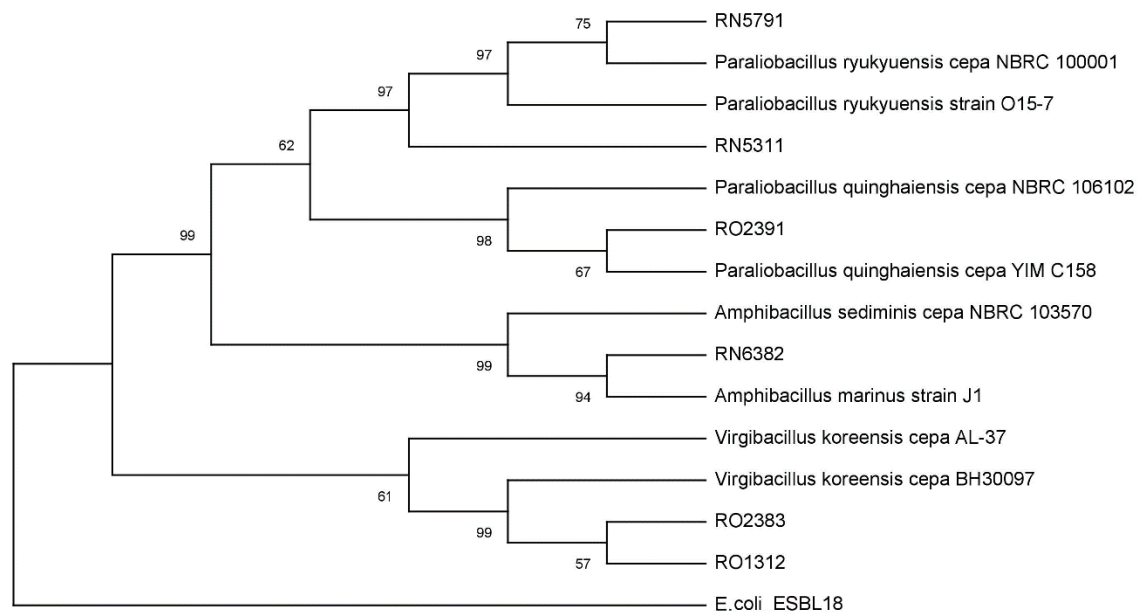


Figura 36. Dendrograma de los géneros bacterianos aislados

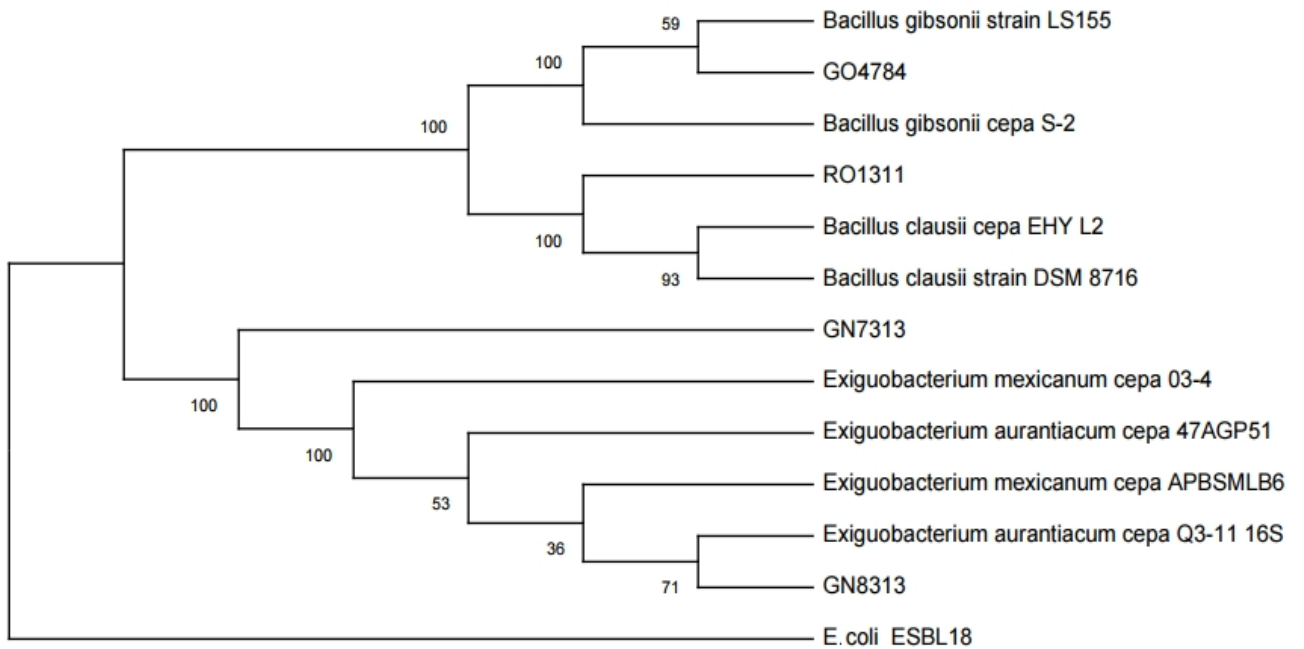
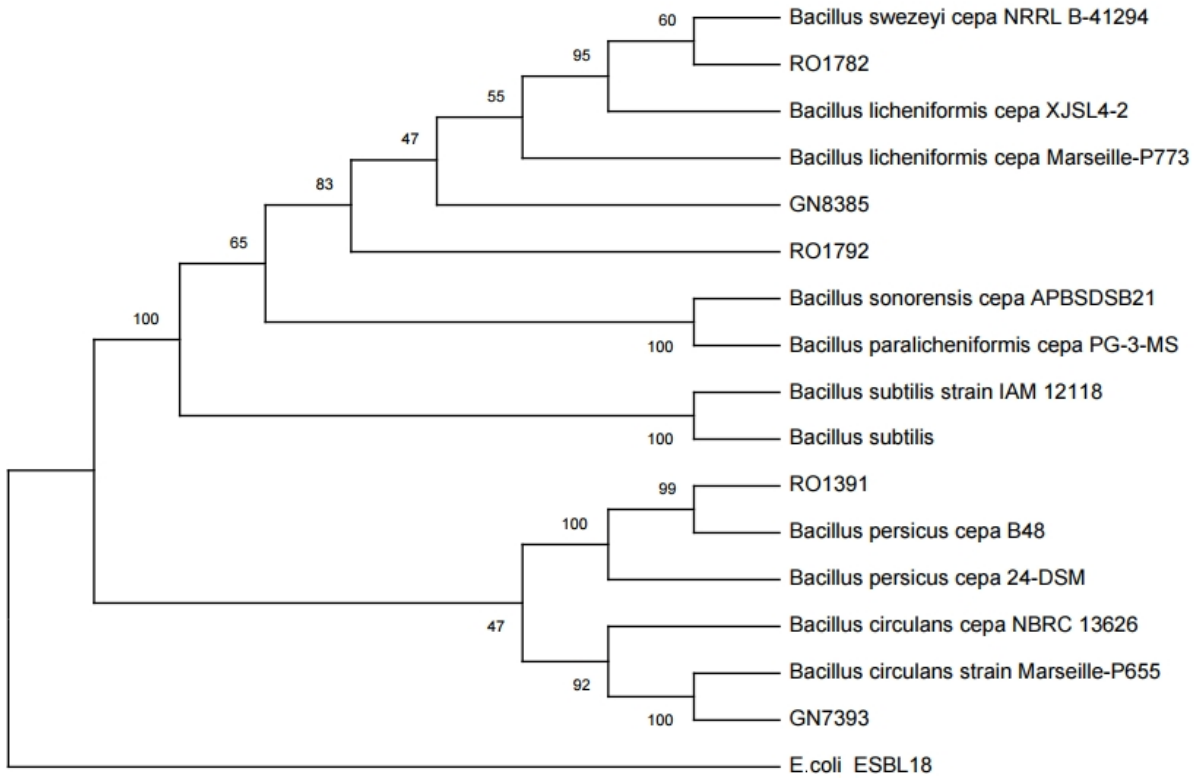


Figura 37. Dendrograma de los géneros bacterianos aislados

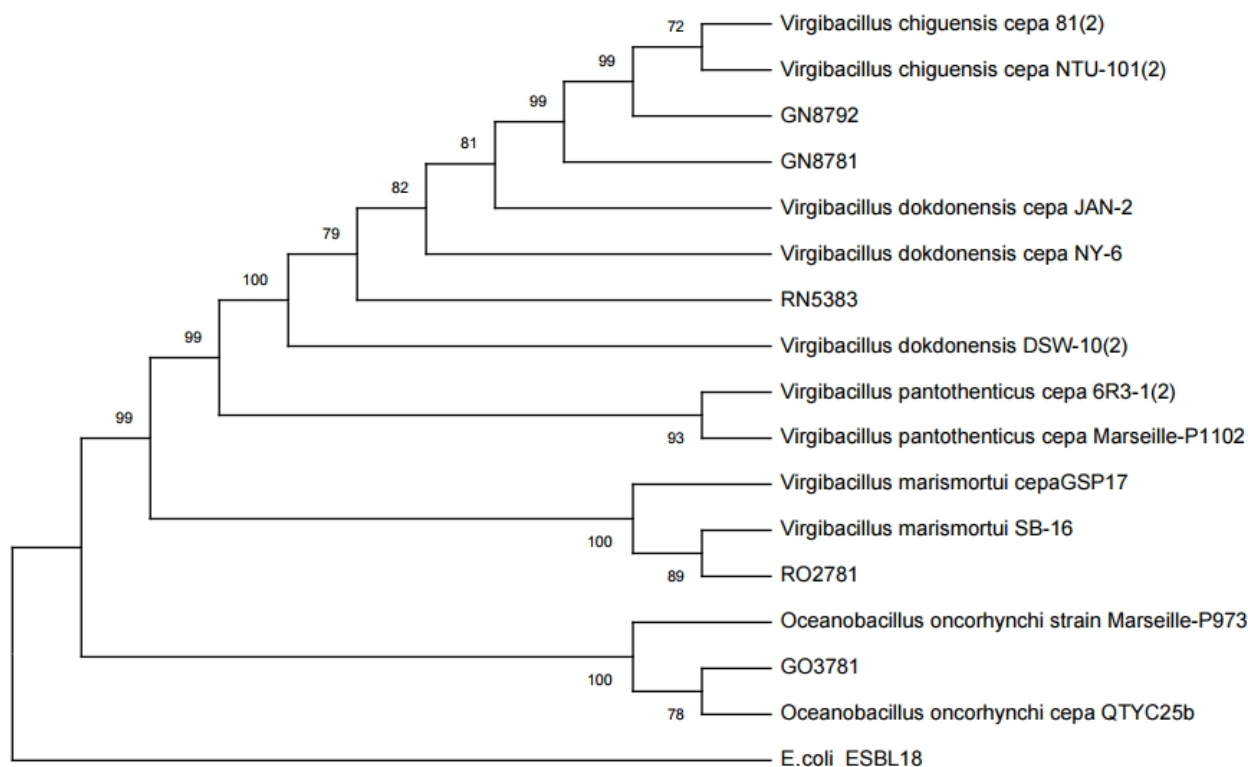


Figura 38. Dendrograma de los géneros bacterianos aislados

La mayoría de los microorganismos fueron bacilos Gram positivos, formadores de esporas. Esto se debe principalmente a que las esporas son una forma de supervivencia cuando las condiciones no son favorables. La sal contiene pocas sustancias orgánicas y baja cantidad de agua, por lo que es posible que estas bacterias se encontrasen en un estado de latencia. Se han encontrado bacterias de los géneros *Virgibacillus* y *Bacillus* en cristales de sal antiguos (Vreeland *et al.*, 2000).

Género: *Amphibacillus*

Tabla 18. Características de la cepa identificada

Microorganismo	Cepa	Total aisladas	Oxidasa	Catalasa	Proteasa	lipasa	Esterasa
<i>Amphibacillus marinus</i>	RN6382	1	-	-	-	-	-

El género fue aislado por primera vez por Niimura en 1990 a partir de composta de estiércol. Fue descrito como un bacilo Gram positivo, formador de esporas, anaeróbico facultativo, ya que carece de quinonas y citocromos, así mismo su pared

celular se encuentra formada principalmente de ácido meso diaminopimérico. Es considerado como alcalófilo dado que no crece a pH<8. A menudo se le considera como halotolerante dado que es capaz de crecer a concentraciones elevadas de NaCl. Dadas las características del género, la cepa fue aislada a pH de 8 y 3% de concentración de sal, además es incapaz de crecer en presencia de O₂, por lo que coincide con lo reportado.

Las especies pertenecientes a este género han sido aisladas de distintas fuentes halófilas (Pugin *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2010; Zhilina, *et al.*, 2001).

La presencia de este género en alimentos salados-fermentados fue reportado en las aceitunas verdes españolas (Lucena-Padrós y Ruiz-Barba, 2015). También se encontró a la especie *Amphibacillus iburiensis* en un licor japonés de 10 meses de fermentación, de donde fue aislado (Hirota *et al.*, 2013).

Así mismo, secuencias del ADN de este microorganismo fueron detectadas mediante el análisis de secuencias ribosomales 16S, en el metagenoma del queso Cotija por Escobar-Zepeda *et al.* en el 2016. Se considera como una especie escasamente representada en este alimento madurado, ya que el ADN de este género representó el 0.0013% del ADN total.

Género: *Bacillus*

Tabla 19. Características de las cepas identificada

Microorganismo	Cepa	Total aisladas	Oxidasa	Catalasa	Proteasa	lipasa	Esterasa
<i>Bacillus circulans</i>	GN7393	1	-	+	+	+	+
<i>Bacillus clausii</i>	RO1311	1	+	+	+	-	+
<i>Bacillus gibsonii</i>	GO4784	1	+	+	+	-	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	RO1792, GN8385	2	+	+	+	+	+
<i>Bacillus persicus</i>	RO1391	1	+	+	+	-	+
<i>Bacillus swezeyi</i>	RO1782	1	+	+	+	-	+

Este género es considerado como uno de los más vastos, dado que existe una enorme diversidad de especies, consideradas a menudo como ubicuas (Madigan *et al.*, 2015).

La importancia de este género se debe a la producción de una enorme cantidad de metabolitos, enzimas y antimicrobicidas. Además, que algunos de estos se toman como modelos para entender la patogenicidad de algunas especies de este género.

El género se ha descrito como bacilos Gram positivos, formadores de esporas, aeróbicos estrictos o anaeróbicos facultativos. Es considerado como alcalófilo moderado y halotolerante (Madigan *et al.*, 2015). Se le considera como ubicuo del suelo, aunque en diversos estudios se le ha encontrado como género dominante en lagos haloalcalinos (Tambekar y Dhundale, 2012).

Este género se ha encontrado en alimentos. García en el 2006, reportó la presencia de *Bacillus pumilus* en el queso Cotija, el cual presenta actividad lipolítica. Por otra parte, en el 2014 Avilés aisló e identificó a *Bacillus flexus*, miembro de éste género a partir de sal de grano de Cuyutlán Colima. Por otra parte, Escobar-Zepeda *et al.* en el 2016 encontró secuencias de ADN de este género mediante el análisis de secuencias ribosomales 16S, en el metagenoma del queso Cotija, se considera como subdominante dado que el ADN de este género representó el 1.86% del ADN total, y por el marcaje de copia única encontró a *B. subtilis* y *B. cereus* en el queso Cotija.

Se ha reportado la presencia de especies de este género en alimentos salados y fermentados como el Jeotgal (Pescados y marisco fermentados de origen coreano) (Guan *et al.*, 2011), gochujang (alimento tradicional coreano fermentado) (Jang *et al.*, 2011), dawadawa (frijol africano fermentado) (Ikenebomeh, 1989) y Hawaijar (Frijol de soya fermentado) (Jeyaram *et al.*, 2008).

Bacillus circulans

Recibió el nombre de *circulans* debido a que el interior de las colonias fluía en un patrón circular, las células son bacilos Gram positivos, móvil por la presencia de flagelos peritrícos (Logan *et al.*, 1985). Estas características fenotípicas coinciden con los resultados obtenidos para la cepa GN7393. Esta especie es considerada como patógeno oportunista (Logan *et al.*, 1985). Se ha encontrado con frecuencia en suelos, materia vegetal en descomposición, en intestinos de larvas de abejas y rara vez en lugares marinos (Encyclopedia of life, 2018). Las enzimas de esta especie son utilizadas ampliamente en aplicaciones de biotecnología, entre las que destacan: quitinasas y xilanasas (Esteban *et al.*, 1982; Watanabe *et al.*, 1990). Así mismo, esta

especie es capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en estado latente en cristales de NaCl (Vreeland *et al.*, 2000).

Bacillus clausii

Su principal hábitat es el suelo, aunque se le considera como ubicua (Encyclopedia of life, 2018). Las colonias de esta especie son blancas, con un margen filamentosos. Las esporas son elipsoidales y se ubican de manera subterminal. Las cepas en esta especie son capaces de hidrolizar caseína, gelatina y almidón. El pH óptimo es aproximadamente 8, y se obtiene un buen crecimiento en pH 7.0. El crecimiento a temperaturas de 15 a 50 °C. Se ha observado, que presenta tolerancia a la sal hasta aproximadamente 10% de NaCl (Nielsen *et al.*, 1995). Las características fenotípicas reportadas, son consistentes con las de la cepa RO1311.

Esta especie produce proteasas alcalinas y termorresistentes, muchas de ellas utilizadas en detergentes (Kumar *et al.*, 2004). Así mismo, se le considera como probiótica dado que produce una serie de sustancias antimicrobianas (Urdaci *et al.*, 2004), por lo que también se utiliza en bacterioterapia oral como suplemento a un tratamiento (Nista *et al.*, 2004).

Bacillus gibsonii

Esta especie se caracteriza por la producción de colonias amarillas y circulares con un margen entero y un liso, brillante. Las esporas tienen forma y están situadas en la región subterminal. Las cepas de esta especie hidrolizan la caseína y gelatina. El crecimiento óptimo es a pH 8.0, con un rango de temperatura de 10 a 37 °C, las cepas toleran hasta un 9% de NaCl (Nielsen *et al.*, 1995). Las características fenotípicas reportadas, son consistentes con las de la cepa GO4787.

Al igual que *B. clausii*, esta especie es productora de enzimas alcalofílicas (Li *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2013). Además de que puede utilizarse para la biorremediación, ya que puede absorber metales pesados (Zhang *et al.*, 2013).

Bacillus licheniformis

Sus hábitats son muy variados, se encuentra generalmente en el suelo y agua (Veith *et al.*, 2004). Aunque también es parte de la microbiota de las aves, dado que se encuentra en el plumaje (Burt *et al.*, 2011).

Esta singular especie, es conocida por la amplia gama de productos de interés biotecnológico que produce en los que destacan: antibióticos, bacteriocinas, biosulfactantes y enzimas (Kayalvizhi y Gunasekaran., 2010; Margesin y Schinner, 2001; Veith *et al.*, 2004).

Bacillus persicus

Esta especie se aisló a partir de suelo a las orillas del lago hipersalino, Aran-Bidgol en Irán (Didari *et al.*, 2013). No se ha reportado la presencia de esta especie en alimentos.

Bacillus swezeyi

Se describe como un bacilo Gram positivo, formador de esporas, anaeróbico facultativo y móvil. Fue aislado del suelo desértico de Negev, Israel. Esta especie, está muy relacionada con cepas del clado de *B. licheniformis*, ya que tiene altos niveles de similitud en las secuencias del gen ribosomal 16S con las especies de *B. sonorensis* (99.2%) y *B. licheniformis* (99.1%) (Dunlap *et al.*, 2017).

Por lo que, al realizar el BLAST, aparecían las secuencias de estos microorganismos aparecieron con identidades altas, para la secuencia problema identificada dentro de esta especie (cepa RO1782).

Género: *Exiguobacterium*

Tabla 20. Características de las cepas identificada

Microorganismo	Cepa	Total aisladas	Oxidasa	Catalasa	Proteasa	lipasa	Esterasa
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	GN8313	1	-	-	+	+	-
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	GN7313	1	-	+	-	-	+

Es un género de la familia *Bacillaceae* descrito por Collins *et al.*, en 1983. Su morfología es variable, ya que depende de la fase de crecimiento. En la fase exponencial corta son bacilos cortos y en la fase exponencial tardía y estacionaria son cocos. Ambas formas son Gram positivas, no forman esporas. Son catalasa positiva y oxidasa negativa, por lo que se les considera anaeróbicas facultativas. La

pared celular contiene un grupo peptidoglicano basado en lisina y contiene quinonas respiratorias.

Se ha encontrado en distintos lugares (glaciares, geisers, lagos salados entre otros), tienen un amplio rango de temperaturas que van desde los -12 °C, hasta los 55 °C. Algunas cepas son halotolerantes dado que pueden crecer en una concentración de NaCl de hasta un 13%. De igual forma crecen dentro de un amplio rango de valores de pH (5-11), toleran altos niveles de radiación UV y estrés a metales pesados (incluyendo arsénico) (Ordoñez, *et al.*, 2013; Vishnivetskaya *et al.*, 2009).

Así mismo, secuencias de ADN han sido encontradas en: quesos de origen latino (Lusk *et al.*, 2012), jeotgal (Jeong *et al.*, 2016) y Kaburazushi (Koyanagi *et al.*, 2013). Secuencias de este género fueron detectadas mediante el análisis de secuencias ribosomales 16S, en el metagenoma del queso Cotija por Escobar-Zepeda *et al.* En el 2016. Se considera como un género escasamente representado en este alimento madurado ya que el ADN de éste representó el 0.0013% del ADN total.

Exiguobacterium aurantiacum

Fue aislada en un efluente de una planta procesadora de papas, por Gee, *et al.* En 1980 y descrita en 1983 por Collins, *et al.* Se caracteriza por producir colonias con una pigmentación naranja opaca, circulares con un borde entero y un liso y elevación convexa. En condiciones anaeróbicas utilizando glucosa como sustrato, forma lactato, acetato y formato son los principales productos finales. Además de que puede hidrolizar almidón, caseína y gelatina. Las características fenotípicas reportadas, son consistentes con las de la cepa GN8313.

Una de sus posibles aplicaciones en la biotecnología, deriva de la producción de pigmentos derivados de los carotenoides. Estos carotenoides se caracterizaron por ser altamente estables, además de tener actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., y *Alternaria* sp. (Shatila *et al.*, 2013).

Exiguobacterium mexicanum

Esta especie fue aislada de la artemia franciscana, es muy parecida morfológicamente y metabólicamente a *E. aurantiacum* (López-Cortés *et al.*, 2006). Sin embargo, las colonias obtenidas no presentaron coloración dado que *E. mexicanum* forma colonias naranjas.

Género: *Oceanobacillus*

Tabla 21. Características de la cepa identificada

Microorganismo	Cepa	Total aisladas	Oxidasa	Catalasa	Proteasa	lipasa	Esterasa
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	GO3781	1	+	+	-	-	+

El género, fue reportado por Lu *et al.*, en el 2001, el cual es descrito como: bacilos cortos Gram positivos, formador de esporas, aeróbico estricto y móvil por la presencia de flagelos peritricos. Las especies que pertenecen a este género son consideradas a menudo como alcalófilas ya que se desarrolla en intervalos de pH de 8 a 10. Su crecimiento óptimo es del 3% de NaCl, además, pueden soportar concentraciones de NaCl del 20% por lo que son halotolerantes.

Estas especies, han sido reportadas en distintos alimentos salados y fermentados como: kimchi (alimento tradicional coreano fermentado) (Whon *et al.*, 2010), salsa de soja (Tominaga *et al.*, 2009), ka-pi (pasta de camarón fermentada, tailandesa) (Namwong *et al.*, 2009). Anteriormente *Oceanobacillus locisalsi*, es una especie que fue aislada a partir de sal solar de origen marino (Lee *et al.*, 2010). Las secuencias del ADN de este microorganismo fueron encontradas mediante el análisis de secuencias ribosomales 16S, en el metagenoma del queso Cotija por Escobar-Zepeda *et al.* (2016). Se considera como un género escasamente representado en este alimento madurado, ya que el ADN de éste representó un 0.22% del ADN total. Por lo que las especies de este género pueden encontrarse a menudo en alimentos salados.

Oceanobacillus oncorhynchi

Esta especie se aisló a partir de piel de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Las colonias son circulares y blancas. Es catalasa y oxidasa positivas. Fermenta varios carbohidratos. Es alcalifílica, dado que crece en un intervalo de pH entre 9 y 10, pero no es capaz de crecer a pH 7 y 8 (Yumoto *et al.*, 2005). Las características fenotípicas son similares, sin embargo, la cepa GO3781 aislada a

partir de sal de grano de Cuyutlán se aisló en pH 8 y es capaz de crecer de manera óptima en este pH. Además, produce un olor característico parecido al queso.

Género: *Paraliobacillus*

Tabla 22. Características de las cepas identificadas

Microorganismo	Cepa	Total aisladas	Oxidasa	Catalasa	Proteasa	lipasa	Esterasa
<i>Paraliobacillus quianhiensis</i>	RO2391	1	+	+	-	-	-
<i>Paraliobacillus ryukyuensis</i>	RN5311	2	-	-	-	-	-
	RN5791		-	+	+	+	+

Existen tres especies dentro de este género. Las cuales no se han reportado en alimentos. Sin embargo, Escobar-Zepeda *et al.* en el 2016 encontró secuencias de este, en el metagenoma del queso Cotija mediante el análisis de secuencias del ADNr 16S. El cual represento un 0.0011% del ADN total, por lo que se considera como un género escasamente representado.

El género fue descrito por Ishikawa *et al.* (2002). Las células son: bacilos Gram positivos, formadores de endosporas, Que móviles por flagelos peritrícos. Las endosporas son esféricas o elipsoidal y están situadas en la posición terminal.

Paraliobacillus ryukyuensis

Fue aislado de un alga en descomposición en las costas de Okinawa, Japón. El cual es anaerobio facultativo. Catalasa positiva cuando se cultiva aeróbicamente, por lo que se le considera pseudocatalasa negativa. En cultivo aeróbico, produce acetato y piruvato a partir de glucosa. En cultivo anaerobio, lactato, formiato, acetato y etanol son los productos finales de la fermentación de la glucosa, con una relación molar de aproximadamente 2: 1: 1. Se reporta que la concentración óptima de NaCl para el crecimiento es de 0.75 a 3% (p/v) con un rango de 0 a 22% (p/v). El pH óptimo es de 7 a 8.5 con un rango de 5.5 a 9.5 (Ishikawa *et al.*, 2002).

Paraliobacillus quianhiensis

Esta especie se aisló de sedimento de un lago salado en la Cuenca Qaidam, en el noroeste de China. El cual presenta una concentración de sal del 27% (p/v), por

lo que tiene una menor concentración de sal al de la laguna de Cuyutlan. A diferencia de *P. ryukyuensis*, es aeróbico estricto, por lo que es catalasa y oxidasa positiva. De igual forma es halotolerante y alcalofila (Chen *et al.*, 2009).

Género: *Virgibacillus*

Tabla 23. Características de las cepas identificadas

Microorganismo	Cepa	Total aisladas	Oxidasa	Catalasa	Proteasa	lipasa	Esterasa
<i>Virgibacillus chiguensis</i>	GN8792	1	-	+	+	-	-
<i>Virgibacillus koreensis</i>	RO2383, RO1312	2	+	+	-	-	-
<i>Virgibacillus marismortui</i>	RO2781	1	+	+	-	-	+
<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	RN5383	1	-	+	+	+	+
<i>Virgibacillus</i> sp.	GN8781	1	-	+	+	+	+

El género, fue propuesto por Heyndrickx *et al.*, en 1998 al separar a *B. pantothenicus* aislado por Proom y Knight., en 1950. En general son bacterias halófilas dado que la mayoría de estas proceden de ecosistemas que presentan una alta salinidad. Este género ha sido enmendado en su descripción (Heyndrickx *et al.*, 1999; Heyrman *et al.*, 2003)

Casillas en el 2013 encontró a *V. pantothenicus* en el auténtico queso Cotija. Produce proteasas alcalinas termoestables (Gupta *et al.*, 2008). Por otro lado, Avilés en el 2014 aisló a *V. dokdonensis*, a partir de la sal de Cuyutlán Colima. En el 2016 Escobar-Zepeda *et al.* Encontró secuencias de ADN de este género en el metagenoma del queso Cotija, mediante el análisis de secuencias del ADNr 16S. El cual representó un 0.0045 % del ADN total, por lo que se consideró como un género escasamente representado.

Las especies de este género son: bacilos Gram positivos o Gram variable dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre, formadores de esporas en la región terminal. Son aeróbicos facultativos y catalasa positivos (Heyrman *et al.*, 2003; Heyndrickx *et al.*, 1999).

Se han encontrado secuencias de ADN, tanto de *V. pantothenicus* como *V. marismortui*, en cristales de sal antiguos por lo que estas especies logran sobrevivir dentro de estos, además de la resistencia que les confiere ser esporulados (Vreeland *et al.*, 2000).

Algunas especies, se han encontrado en alimentos como: aceitunas españolas (Quesada *et al.*, 2007), jeotgal (Pescados y marisco fermentados de origen coreano), (Kim *et al.*, 2011) y salsa de pescado (Montriwong *et al.*, 2012). De igual manera el género se encuentra en sal solar de origen marino (Lee *et al.*, 2012(b); Wang *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2010).

Virgibacillus dokdonensis

Las cepas de esta especie son conocidas por producir proteasas extracelulares (Devirajeswari *et al.*, 2012). Las células son bacilos Gram variable, móvil, formador de esporas. Se considera como un halotolerante dado que su crecimiento óptimo se encuentra en un rango de 4-5% (p/v) de NaCl. Este microorganismo se aisló a partir de agua de mar por lo que está justificada la presencia en las muestras de sal. Además se esta es capaz de crecer en condiciones anaeróbicas (Yoon *et al.*, 2005).

Virgibacillus sp.

Fue aislado a partir de una muestra de sal de grano procedente de Cututlán Colima, se utilizó la secuencia del gen ribosomal 16S. Sin embargo, no fue posible discernir la especie mediante este método, dado que las especies de *V. chiguensis*, *V. dokdonensis* y *V. pantothenicus*.

Virgibacillus marismortui

Fue renombrado por Heyrman *et al.* en el 2003 a partir de los basónimos: *Bacillus marismortui* (Arahal *et al.* 1999) renombrado a *Salibacillus marismortui* (Arahal *et al.* 2000). Esto se debió principalmente a la similitud de esta especie con el género. Fue aislada a partir de agua del mar muerto. Hidroliza la caseína y la gelatina, pero no el almidón, las esporas se ubican en la región subterminal.

Produce una quitinasa, estable a distintas condiciones de pH, temperatura y salinidad (Essghaier *et al.*, 2012).

Virgibacillus chiguensis

Fue aislado de una salina comercial conocida como Chigu ubicada en el sur de Taiwán. Es móvil mediante flagelos peritrícos. Las esporas se encuentran en la posición terminal o subterminal. Las colonias son irregulares o regulares, planas y translúcidas, y de color blanquecino. Es aeróbica facultativa dado que tiene quinonas respiratorias. Pude hidrolizar la caseína y la gelatina (Lee *et al.*, 2012(b)).

Virgibacillus koreensis

Fue aislado de un campo de sal cerca del mar amarillo en Corea. Las células son bacilos Gram positiva, móviles. Presentan endosporas elipsoidales en la posición terminal. Es aeróbico dado que presenta actividad oxidasa y catalasa. El pH y la temperatura óptimos para el crecimiento de este organismo fueron pH 7 y 25 °C, respectivamente (Lee *et al.*, 2006). Sin embargo, esta especie fue reclasificada al género *Aquibacillus*, dado que esta especie es filogenéticamente más parecida a este (Amoozegar *et al.*, 2014).

9. Conclusiones

- Las condiciones y los medios de cultivo utilizados permitieron el desarrollo favorable de la microbiota cultivable en la sal de grano.
- La sal de grano aportó a los medios de cultivo trazas de minerales y de sustancias orgánicas, que favorecieron el desarrollo de los microorganismos presentes en la sal.
- La mayoría de los aislamientos fueron bacterias esporuladas (a excepción de *Exiguobacterium*), así mismo todos fueron Gram positivos.
- Todos los géneros aislados pertenecen a la familia *Bacillaciae*.
- Los géneros representativos cultivables son: *Bacillus*, *Virgibacillus* y *Paraliobacillus*.
- La relación entre los microorganismos aislados y los presentes en el queso Cotija, deriva de la cantidad de sal (aproximadamente un 5%) empleada para la salazón, por ello se encuentran en baja proporción.
- Se logró aislar microorganismos aeróbicos como anaeróbicos facultativos.

- El análisis ARDRA, permitió relacionar de acuerdo con el patrón de bandas obtenido, a microorganismos cuyas características fenotípicas eran similares
- El enfoque polifásico permite tener mayores criterios para agrupar distintos microorganismos de acuerdo con sus características fenotípicas y genotípicas.
- Algunas cepas contaron con actividad proteasa, esterasa y lipasa.
- Algunas de estas tienen potencial de aplicación, dado que su máxima actividad fue a altas concentraciones de sal y pH básico.

10. Perspectivas

- Realizar un estudio metagenómico, para conocer la microbiota presente en la sal de grano de Cuyutlán.
- Realizar los perfiles de actividad antimicrobiana, de las cepas aisladas, con el fin de detectar actividad contra patógenos de interés en el área de alimentos.
- Caracterizar, las enzimas (esterasas y proteasas) de los microorganismos aislados, para su posible aplicación biotecnológica.
- Realizar aislamientos a partir de sal de grano, utilizando los medios RCMAS y GYECS. Utilizando pH ácidos (4, 5 y 6). Así como utilizar condiciones anaeróbicas obligadas, para favorecer el desarrollo de otros microorganismos no cultivados.
- Detectar hongos filamentosos, en la sal de grano de Cuyutlán, para tener un estudio más profundo de la microbiota en la sal.

11. Bibliografía

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
2. Álvarez, B. R., Barragán, L. E., Chombo, M. P. (2005). Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen. El Colegio de Michoacán, México.
3. AMISAC (2017). Asociación Mexicana de la Industria Salinera A.C. Industria salinera, producción de la sal. Disponible en: <http://www.amisac.org.mx/produccion/> [Ultimo acceso 2-agosto-2017]
4. Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Didari, M., Mehrshad, M., Schumann, P., Spröer, C., Ventosa, A. (2014). *Aquibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Virgibacillus koreensis* as *Aquibacillus koreensis* comb. nov. and *Virgibacillus albus* as *Aquibacillus albus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(11), 3616-3623.
5. Andino, F., Castillo, Y. (2010). Microbiología de alimentos. U del Norte. Disponible en (<https://es.slideshare.net/clasesdequimica/microbiologia-de-los-alimentos-25689328>) [Ultimo acceso 6-junio-2018]
6. Arahall, D. R., Marquez, M. C., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., Ventosa, A. (1999). *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 521-530.
7. Arahall, D. R., Márquez, M. C., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., Ventosa, A. (2000). Reclassification of *Bacillus marismortui* as *Salibacillus marismortui* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(4), 1501-1503.
8. Avilés, B. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias halófilas a partir de sal de grano. Tesis de licenciatura. UNAM: México.

9. Biango-Daniels, M. N., Hodge, K. T. (2018). Sea salts as a potential source of food spoilage fungi. *Food microbiology*, 69, 89-95.
10. BLAST, NCBI (2018) Disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. [Ultimo acceso 25-octubre -2018]
11. Bhatt, H. B., Gohel, S. D., Singh, S. P. (2018). Phylogeny, novel bacterial lineage and enzymatic potential of haloalkaliphilic bacteria from the saline coastal desert of Little Rann of Kutch, Gujarat, India. *3 Biotech*, 8(1), 53.
12. Bravo, R. (2017). Evaluación del papel de especies de *Enterococcus* en la maduración de quesos. Tesis de licenciatura. UNAM: México.
13. Burt, E. H., Schroeder, M. R., Smith, L. A., Sroka, J. E., McGraw, K. J. (2011). Colourful parrot feathers resist bacterial degradation. *Biology Letters*, 7(2), 214-216.
14. Casillas, J. (2013). Caracterización molecular de la microbiota bacteriana del queso cotija elaborado en diversas regiones de México. Tesis de maestría. UNAM: México.
15. Cenzano, I. (1992). Los quesos. Madrid: AMV Ediciones y Mundi-Prensa Libros SA.
16. Collins, M. D., Lund, B. M., Farrow, J. A. E., Schleifer, K. H. (1983). Chemotaxonomic Study of an Alkalophilic Bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 129(7), 2037-2042.
17. Chen, Y. G., Cui, X. L., Zhang, Y. Q., Li, W. J., Wang, Y. X., Xu, L. H., Jiang, C. L. (2009). *Paraliobacillus quinghaiensis* sp. nov., isolated from salt-lake sediment in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(1), 28-33.
18. Devirajeswari, V., Jayaraman, G., Rameshpathy, M., Sridharan, T. B. (2012). Production and Characterization of Extracellular Protease From Halotolerant Bacterium *Virgibacillus dokdonensis* VITP14. *Res. J. Biotechnol*, 7, 38-43.

19. Didari, M., Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Mehrshad, M., Schumann, P., Spröer, C., & Ventosa, A. (2013). *Bacillus persicus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(4), 1229-1234.
20. Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Perry, E. B., Connor, N., Cohan, F. M., Rooney, A. P. (2017). *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2720-2725.
21. Encyclopedia of life (2018). Disponible en: <http://eol.org/pages/974612/overview> [Ultimo acceso 15-octubre -2018]
22. Escobar, A. (2012). Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de Fish. Tesis de Maestría. UNAM: México.
23. Escobar, A. (2016). Análisis taxonómico y del potencial metabólico del metagenoma de queso Cotija. Tesis de Doctorado. UNAM: México.
24. Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Quirasco, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food microbiology*, 57, 116-127.
25. Essghaier, B., Hedi, A., Bejji, M., Jijakli, H., Boudabous, A., Sadfi-Zouaoui, N. (2012). Characterization of a novel chitinase from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus marismortui* strain M3-23. *Annals of microbiology*, 62(2), 835-841.
26. Esteban, R., Villanueva, J. R., Villa, T. G. (1982). β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Canadian Journal of Microbiology*, 28 (7), 733-739.
27. Fernández Díez, M. J. (1991). Frutos y vegetales aderezados. *Grasas y aceites* 1991 42(1) 1991 61-73.
28. García, V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolitica del queso Cotija. Tesis de licenciatura. UNAM: México.

29. Gee, J. M., Lund, B. M., Metcalf, G., Peel, J. L. (1980). Properties of a new group of alkalophilic bacteria. *Microbiology*, 117(1), 9-17.
30. Gildberg, A., Thongthai, C. (2001). The effect of reduced salt content and addition of halophilic lactic acid bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(1), 77-88.
31. Gómez, B. (2010). Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de licenciatura. UNAM: México
32. Guan, L., Cho, K. H., Lee, J. H. (2011). Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food microbiology*, 28(1), 101-113.
33. Grau, C., Elguezabal, L., Ballenilla, O., Zerpa, A. (2003). Evaluacion de la flora microbiana halofila contaminante del pescado seco-salado elaborado en el estado sucre. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 13(4), 319-326.
34. Gupta, A., Joseph, B., Mani, A., Thomas, G. (2008). Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenicus*. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 237-243.
35. Hernández, N. (2007). Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de licenciatura. UNAM: México
36. Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G., Logan, N. A. (1998). *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(1), 99-106.
37. Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., Hoste, B., De Wachter, R., De Vos, P., Logan, N. A. (1999). Proposal of *Virgibacillus proomii* sp. nov. and emended

description of *Virgibacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1083-1090.

38. Heyrman, J., Logan, N. A., Busse, H. J., Balcaen, A., Lebbe, L., Rodriguez-Diaz, M., De Vos, P. (2003). *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2), 501-511.
39. Hirota, K., Aino, K., Yumoto, I. (2013). *Amphibacillus iburiensis* sp. nov., an alkaliphile that reduces an indigo dye. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(11), 4303-4308.
40. Ikenebomeh, M. J. (1989). The influence of salt and temperature on the natural fermentation of African locust bean. *International journal of food microbiology*, 8(2), 133-139.
41. Ishikawa, M., Ishizaki, S., Yamamoto, Y., Yamasato, K. (2002). *Paraliobacillus ryukyuensis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, slightly halophilic, extremely halotolerant, facultative anaerobe isolated from a decomposing marine alga. *The Journal of general and applied microbiology*, 48(5), 269-279.
42. Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(3), 711-720.
43. Ishikawa, M., Kodama, K., Yasuda, H., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, K., Yamasato, K. (2006). Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Letters in applied microbiology*, 44(3), 308-313.

44. Jacob, J. H., Hussein, E. I., Shakhathreh, M. A. K., Cornelison, C. T. (2017). Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *Microbiology Open*, 6(5).
45. Jang, S. J., Kim, Y. J., Park, J. M., Park, Y. S. (2011). Analysis of microflora in gochujang, Korean traditional fermented food. *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1435.
46. Jeong, D. W., Jung, G., Lee, J. H. (2016). Cultivable Bacterial Community Analysis of Saeu-jeotgal, a Korean High-Salt-fermented Seafood, during Ripening.
47. Jeyaram, K., Singh, W. M., Premarani, T., Devi, A. R., Chanu, K. S., Talukdar, N. C., Singh, M. R. (2008). Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar' a traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. *International journal of food microbiology*, 122(3), 259-268.
48. Jung, M. J., Kim, M. S., Roh, S. W., Shin, K. S., Bae, J. W. (2010). *Salinicoccus carnicancri* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Korean fermented seafood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 653-658.
49. Kayalvizhi, N., Gunasekaran, P. (2010). Purification and characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(2), 365-370.
50. Kim, J., Jung, M. J., Roh, S. W., Nam, Y. D., Shin, K. S., Bae, J. W. (2011). *Virgibacillus alimentarius* sp. nov., isolated from a traditional Korean food. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 2851-2855.
51. Kobayashi, T., Kajiwara, M., Wahyuni, M., Hamada-Sato, N., Imada, C., Watanabe, E. (2004). Effect of culture conditions on lactic acid production of *Tetragenococcus* species. *Journal of applied microbiology*, 96(6), 1215-1221.
52. Koyanagi, T., Nakagawa, A., Kiyohara, M., Matsui, H., Yamamoto, K., Barla, F., Nakamura, S. (2013). Pyrosequencing analysis of microbiota in Kaburazushi, a

traditional medieval sushi in Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(10), 2125-2130.

53. Kumar, C. G., Joo, H. S., Koo, Y. M., Paik, S. R., Chang, C. S. (2004). Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic *Bacillus clausii* isolate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 351-357.
54. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
55. Larsen, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 39(1-2), 3-7.
56. Lee, J. S., Lim, J. M., Lee, K. C., Lee, J. C., Park, Y. H., Kim, C. J. (2006). *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(1), 251-257.
57. Lee, S. H., Jung, J. Y., Jeon, C. O. (2012 a). Draft genome sequence of *Salimicrobium* sp. strain MJ3, isolated from Myulchi-Jeot, Korean fermented seafood. *Journal of bacteriology*, 194(23), 6695-6695.
58. Lee, S. Y., Oh, T. K., Kim, W., Yoon, J. H. (2010). *Oceanobacillus locisalsi* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(12), 2758-2762.
59. Lee, S. Y., Kang, C. H., Oh, T. K., Yoon, J. H. (2012 b). *Virgibacillus campisalis* sp. nov., from a marine solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(2), 347-351.
60. Li, Z., Bai, Z., Zhang, B., Xie, H., Hu, Q., Hao, C., Zhang, H. (2005). Newly isolated *Bacillus gibsonii* S-2 capable of using sugar beet pulp for alkaline pectinase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1483-1486.

61. López-Cortés, A., Schumann, P., Pukall, R., Stackebrandt, E. (2006). *Exiguobacterium mexicanum* sp. nov. and *Exiguobacterium artemiae* sp. nov., isolated from the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 183-190.
62. Logan, N. A., Old, D. C., Dick, H. M. (1985). Isolation of *Bacillus circulans* from a wound infection. *Journal of Clinical Pathology*, 38(7), 838–839.
63. Lucena-Padrós, H., Ruiz-Barba, J. L. (2015). Diversity and enumeration of halophilic and alkaliphilic bacteria in Spanish-style green table-olive fermentations. *Food microbiology*, 53, 53-62.
64. Lu, J., Nogi, Y., Takami, H. (2001). *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett* 205, 291–297.
65. Lusk, T. S., Ottesen, A. R., White, J. R., Allard, M. W., Brown, E. W., Kase, J. A. (2012). Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC microbiology*, 12(1), 254.
66. Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. (2015). Brock Biology of Microorganisms, 14va ed., Prentice Hall. pp 158-167,49
67. Martínez, R., Jakob, F., Tu, R., Siegert, P., Maurer, K. H., Schwaneberg, U. (2013). Increasing activity and thermal resistance of *Bacillus gibsonii* alkaline protease (BgAP) by directed evolution. *Biotechnology and bioengineering*, 110(3), 711-720.
68. Margesin, R., Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
69. México campo adentro (2017 a). Disponible en: <http://www.mexicocampoadentro.org/sal.php> [Ultimo acceso 3-agosto-2017]

70. México campo adentro (2017 b). Disponible en: http://www.mexicocampoadentro.org/queso_cotija.php [Ultimo acceso 3-agosto-2017]
71. Montriwong, A., Kaewphuak, S., Rodtong, S., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. (2012). Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation. *Process biochemistry*, 47(12), 2379-2387.
72. Mwirichia, R., Muigai, A. W., Tindall, B., Boga, H. I., Stackebrandt, E. (2010). Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles*, 14(4), 339-348.
73. Namwong, S., Tanasupawat, S., Lee, K. C., Lee, J. S. (2009). *Oceanobacillus kapialis* sp. nov., from fermented shrimp paste in Thailand. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2254-2259.
74. Nielsen, P., Fritze, D., Priest, F. G. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141(7), 1745-1761.
75. Niimura, Y., Koh, E., Yanagida, F., Suzuki, K. I., Komagata, K., Kozaki, M. (1990). *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(3), 297-301.
76. Nista, E. C., Candelli, M., Cremonini, F., Cazzato, I. A., Zocco, M. A., Franceschi, F., Gasbarrini, A. (2004). *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20(10), 1181-1188.
77. Ordoñez, O. F., Lanzarotti, E., Kurth, D., Gorriti, M. F., Revale, S., Cortez, N., Turjanski, A. G. (2013). Draft genome sequence of the polyextremophilic *Exiguobacterium* sp. strain S17, isolated from hyperarsenic lakes in the Argentinian Puna. *Genome announcements*, 1(4), e00480-13.

78. Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental technology*, 31(8-9), 825-834.
79. Pugin, B., Blamey, J. M., Baxter, B. K., Wiegel, J. (2012). *Amphibacillus cookii* sp. nov., a facultatively aerobic, spore-forming, moderately halophilic, alkalithermotolerant bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(9), 2090-2096.
80. Quesada, T., Aguilera, M., Morillo, J. A., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M. (2007). *Virgibacillus olivae* sp. nov., isolated from waste wash-water from processing of Spanish-style green olives. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(5), 906-910.
81. Ramírez, N., Serrano, J. A., Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3).
82. Ramírez, T., (2015). Discusión sobre la presencia de bacterias halófilas en alimentos. Tesis de licenciatura. UNAM: México.
83. Ren, B., Yang, N., Wang, J., Ma, X. L., Wang, Q., Xie, F., Zhang, L. X. (2013). *Amphibacillus marinus* sp. nov., a member of the genus *Amphibacillus* isolated from marine mud. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(4), 1485-1491.
84. Ryssel, M., Johansen, P., Al-Soud, W. A., Sørensen, S., Arneborg, N., Jespersen, L. (2015). Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of surface ripened semi-hard Danish Danbo cheeses investigated by culture-independent techniques. *International journal of food microbiology*, 215, 124-130.
85. Saitou N. Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

86. Shatila, F., Yusef, H., Holail, H. (2013). Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2(12), 176-191.
87. Tambekar, D. H., & Dhundale, V. R. (2012). Studies on the physiological and cultural diversity of bacilli characterized from Lonar lake (MS) India. *Biosci Discov*, 3(1), 34-39.
88. Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
89. Tominaga, T., An, S. Y., Oyaizu, H., Yokota, A. (2009). *Oceanobacillus soja* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. *The Journal of general and applied microbiology*, 55(3), 225-232.
90. Tortora, G., Funke, B., Case, C., (2007). Introducción a la microbiología. 9ª edición. Buenos aires: Médica Panamericana.
91. Urdaci, M. C., Bressollier, P., Pinchuk, I. (2004). *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *Journal of clinical gastroenterology*, 38, S86-S90.
92. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Ehrenreich, A. (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 7(4), 204-211.
93. Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3), 541-555.
94. Voet, D., Voet, JG, Pratt, CW (2013). Fundamentals of Biochemistry. 4ta ed., John Wiley & Sons. pp 67-68.
95. Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., Powers, D. W. (2000). Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407(6806), 897.

96. Wang, C. Y., Chang, C. C., Ng, C. C., Chen, T. W., Shyu, Y. T. (2008). *Virgibacillus chiguensis* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from Chigu, a previously commercial saltern located in southern Taiwan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(2), 341-345.
97. Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Tanaka, H. (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *Journal of bacteriology*, 172(7), 4017-4022.
98. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
99. Whon, T. W., Jung, M. J., Roh, S. W., Nam, Y. D., Park, E. J., Shin, K. S., & Bae, J. W. (2010). *Oceanobacillus kimchii* sp. nov. isolated from a traditional Korean fermented food. *The Journal of Microbiology*, 48(6), 862-866.
100. Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
101. Wu, X. Y., Zheng, G., Zhang, W. W., Xu, X. W., Wu, M., Zhu, X. F. (2010). *Amphibacillus jilinensis* sp. nov., a facultatively anaerobic, alkaliphilic bacillus from a soda lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(11), 2540-2543.
102. Yoon, J. H., Kang, S. J., Lee, S. Y., Lee, M. H., Oh, T. K. (2005). *Virgibacillus dokdonensis* sp. nov., isolated from a Korean island, Dokdo, located at the edge of the East Sea in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5), 1833-1837.
103. Yoon, J. H., Kang, S. J., Jung, Y. T., Lee, K. C., Oh, H. W., Oh, T. K. (2010). *Virgibacillus byunsanensis* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(2), 291-295.

- 104.** Yumoto, I., Hirota, K., Nodasaka, Y., Nakajima, K. (2005). *Oceanobacillus oncorhynchi* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile isolated from the skin of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and emended description of the genus *Oceanobacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1521-1524.
- 105.** Zhang, B., Fan, R., Bai, Z., Wang, S., Wang, L., Shi, J. (2013). Biosorption characteristics of *Bacillus gibsonii* S-2 waste biomass for removal of lead (II) from aqueous solution. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1367-1373.
- 106.** Zhilina, T. N., Garnova, E. S., Tourova, T. P., Kostrikina, N. A., Zavarzin, G. A. (2001). *Amphibacillus fermentum* sp. nov. and *Amphibacillus tropicus* sp. nov., New Alkaliphilic, Facultatively Anaerobic, Saccharolytic Bacilli from Lake Magadi. *Microbiology*, 70(6), 711-722.
- 107.** Zúñiga, A., (2009). Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría. UNAM: México.

12. Anexos

Anexo I. Protocolo de purificación de ADN mediante banda de gel. Mediante el kit QIAEX II de **Qiagen®**.

1. Cortar la banda de ADN, a partir del gel de agarosa. Colocar el fragmento en un tubo Eppendorf de 2.0 mL (previamente pesado). Para procesar 250 mg de agarosa por tubo.
2. Pesar el fragmento de gel, para saber la relación de buffer respecto al peso de el fragmento (250 mg). Agregar, el Buffer QX1 de acuerdo con la masa del gel de agarosa y el tamaño del fragmento de ADN: 3 volúmenes para el intervalo 100 bp - 4 kbp ($3 \times 250 = 750 \mu\text{L}$).
3. Agregar 10 μL de la suspensión QIAEX II para $\leq 2 \mu\text{g}$ de ADN, mezclar con vórtex durante 30 s.
4. Incubar a 50 ° C durante 10 minutos para solubilizar la agarosa. Mezclar con vórtex. Comprobar que el color de la mezcla sea amarillo. Si el color de la mezcla es naranja o violeta, agregue 10 μL de acetato de sodio 3 M, pH 5.
5. Centrifugar la muestra durante 1 minuto a 13000 rpm y eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
6. Lavar el pellet, con 500 μL del buffer QX1. Resuspender con vórtex, durante 30 s. Centrifugar la muestra durante 1 minuto a 13000 rpm y eliminar cuidadosamente el sobrenadante. Este paso de lavado elimina la agarosa residual.
7. Lavar el pellet dos veces con 500 μL de Buffer PE. Resuspender el pellet con vórtex. Centrifugar la muestra durante 1 minuto a 13000 rpm y eliminar cuidadosamente el sobrenadante. Este paso elimina la sal contaminante.
8. Secar al aire (se puede incubar a 40°C, con el tubo destapado), el pellet durante 10–15 minutos o hasta que el pellet se vuelva blanco. No secar al vacío, ya que secarlo en exceso, puede reducir la eficiencia de elución.
9. Para eluir el ADN, agregar 20 μL de buffer TE o agua y resuspender mediante agitación con vórtex. Incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 5 minutos.
10. Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, colocar el sobrenadante en un tubo limpio. Dado que ahora este, contiene el ADN purificado.

11. **Opcional:** repetir los pasos 9 y 10. combinar los eluidos. Un segundo paso de elución aumentará el rendimiento en aproximadamente un 10-15%.

Anexo II. Medios de cultivo para la evaluación de las capacidades enzimáticas de las cepas aisladas.

Trabajar por duplicado utilizando como control positivo a *Kocuria* sp.y un control de esterilidad.

- Agar leche descremada
 1. Adicionar la leche descremada a la mitad del volumen de agua y esterilizar en autoclave (121°C, 3 minutos).
 2. Esterilizar el Agar con la otra mitad de agua (121°C, 15 minutos).
 3. Mezclar ambas soluciones.

Tabla 1. Composición del agar leche descremada

Componente	cantidad
Agar	15 g
Leche descremada	15 g
Agua destilada	1L

- Agar RCMAS/Leche descremada
 1. Adicionar la leche descremada a la mitad del volumen de agua y esterilizar en autoclave (121°C, 3 minutos).
 2. Esterilizar el medio RCMAS con la otra mitad de agua (121°C, 15 minutos).
 3. Mezclar ambas soluciones.

Tabla 2. Composición del agar RCMAS/Leche descremada

Componente	cantidad
Peptona	1.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Extracto de levadura	0.3 g
Dextrosa	0.5 g
Almidón soluble	0.1 g
Clorhidrato de cisteína	0.05 g
Acetato de sodio	0.3 g
Sal	3.0 g
Agar	1.5 g
Leche descremada	1.5 g
Agua destilada	100 mL

- Agar tributirina

1. Adicionar bactotripton, extracto de levadura, cloruro de sodio y tributirina en agua destilada y ajustar a pH 7.5.
2. Emulsificar en un homogenizador (Ultraturax T25, Janke&kunkel; USA) durante 10 minutos a velocidad mínima.
3. Adicionar agar y esterilizar en autoclave (121°C, 15 minutos).
4. Dejar enfriar el medio y añadir glucosa previamente esterilizada por filtración en membrana de 0.22 µm.
5. Mezclar el medio con la glucosa.

Tabla 3. Composición del agar tributirina

Componente	cantidad
bactotripton	10 g
extracto de levadura	5 g
cloruro de sodio	10 g
Tributirina	10 mL
Glucosa 20%	5 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

- Agar RCMAS-tributirina

1. Adicionar los componentes del medio RCMAS y tributirina en agua destilada y ajustar a pH 9.
2. Emulsificar con un homogenizador (Ultraturax T25, Janke&kunkel; USA) durante 10 minutos a velocidad mínima.
3. Adicionar agar y esterilizar en autoclave (121°C, 15 minutos).

Tabla 4. Composición del agar RCMAS-tributirina

Componente	cantidad
Peptona	1.0 g
Extracto de carne	1.0 g
Extracto de levadura	0.3 g
Dextrosa	0.5 g
Almidón soluble	0.1 g
Clorhidrato de cisteína	0.05 g
Acetato de sodio	0.3 g
Sal	3.0 g
Agar	1.5 g
Tributirina	1 mL
Agua destilada	100 mL

- Agar aceite de oliva

1. Adicionar bactotripton, extracto de levadura, cloruro de sodio y aceite de oliva en agua destilada y ajustar a pH 7.5.
2. Emulsificar con un homogenizador (Ultraturax T25, Janke&kunkel; USA) durante 2 minutos a velocidad mínima.
3. Adicionar agar y esterilizar en autoclave (121°C, 15 minutos).
4. Dejar enfriar el medio y añadir glucosa previamente esterilizada por filtración en membrana de 0.22 µm.
5. Mezclar el medio con la glucosa.

Tabla 5. Composición del agar aceite de oliva

Componente	cantidad
bactotripton	10 g
extracto de levadura	5 g
cloruro de sodio	10 g
aceite de oliva	10 mL
Glucosa 20%	5 mL
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

- Agar RCMAS-aceite de oliva
 1. Adicionar los componentes del medio RCMAS, Tween 80 y aceite de oliva en agua destilada, ajustar a pH 9.
 2. Emulsificar con un homogenizador (Ultraturax T25, Janke&kunkel; USA) durante 10 minutos a velocidad mínima.
 3. Adicionar agar y esterilizar en autoclave (121°C, 15 minutos).

Tabla 6. Composición del agar RCMAS-tributirina

Componente	cantidad
Peptona	1 g
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	0.3 g
Dextrosa	0.5 g
Almidón soluble	0.1 g
Clorhidrato de cisteína	0.05 g
Acetato de sodio	0.3 g
Aceite de oliva	1 mL
Tween 80	0.1 mL
Sal	3.0 g
Agar	1.5 g
Agua destilada	100 mL

Anexo III. Sitios de restricción simulados programa NEBcutter V2.0(disponible en <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (ultimo acceso 8-10-18))

Especie bacteriana	Referencia NCBI	Fragmento (pb)	Enzimas de restriccion/Region						Tipo
<i>Virgibacillus koreensis</i>	NR_043025.1	1435	EcoR I	660	Pst I	847			IDENTIFICADA
<i>Paraliobacillus quianhiensis</i>	EU135728.1	1522	EcoR I	672	Pst I	859			IDENTIFICADA
<i>Bacillus persicus</i>	HQ433471.2	1458	EcoR I	673	Pst I	860			IDENTIFICADA
<i>Bacillus licheniformis</i>	EU513395.1	1516	EcoR I	675	Pst I	862	Xba I	900	IDENTIFICADA
<i>Streptomyces coelicolor</i>	MF429778.1	1502	EcoR I	620					Comparativa
<i>Marinilactibacillus piezotolerans</i>	NR_041393.1	1510	EcoR I	642			Xba I	978	Comparativa
<i>Marinilactibacillus pshycrotolerans</i>	NR_024794.1	1458	EcoR I	643			Xba I	979	Comparativa
<i>Lactobacillus fermentum</i>	AB856983.1	1491			Pst I	1314			Comparativa
<i>Lactobacillus plantarum</i>	M58827.1	1571			Pst I	887			Comparativa
<i>Bacillus clausii</i>	KR350629.1	1498	EcoR I	680			Xba I	25	IDENTIFICADA
<i>Bacillus gibsonii</i>	AY737309.1	1516	EcoR I	677			BamH I	72	IDENTIFICADA
<i>Paraliobacillus ryukyuensis</i>	AB087828.1	1500	EcoR I	663	Pst I	850			IDENTIFICADA
<i>Amphibacillus sediminis</i>	NR_041361.1	1520	EcoR I	671			Xba I	1008	IDENTIFICADA
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	LT558824.1	1525	EcoR I	687			Xba I	1023	IDENTIFICADA
<i>Halolactibacillus miurensis</i>	NR_041268.1	1491	EcoR I	658	Pst I	845			Comparativa
<i>Halolactibacillus alkaliphilus</i>	EF554593.1	1452	EcoR I	653	Pst I	840			Comparativa
<i>Alkalibacillus flavidus</i>	EU874387.1	1509	EcoR I	671	Pst I	856			Comparativa
<i>Alkalibacillus halophilus</i>	NR_115752.1	1506	EcoR I	639	Pst I	824			Comparativa