



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
*CENTRO DE INVESTIGACION EN DINÁMICA CELULAR*

**“Estudio de la haloadaptación de *Salinibacter ruber* ante  
condiciones que simulan el océano del satélite Europa”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**MARÍA CRISTINA CARDONA ECHAVARRÍA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Sandra Ignacia Ramírez Jiménez**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias

**DR. VICTOR BARBA LÓPEZ**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Estudio de la haloadaptación de *Salinibacter ruber* ante condiciones que simulan el océano del satélite Europa" que presenta la alumna María Cristina Cardona Echavarría (5620170101) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	Aprobada	
Dr. Carlos Daniel Amero Tello CIQ-UAEM	Aprobada	Carlos Amero Tello
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	Aprobada	
Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara CCG-UNAM	Aprobada	
Dra. Sandra Ignacia Ramírez Jiménez CIQ-UAEM	Aprobada	

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, contó con financiamiento a través del proyecto CONACyT-AEM 249086 y la sustentante recibió la beca número 622835 para realizar estudios de posgrado.

## **JURADO EVALUADOR**

Presidente	Dr. Enrique Rudiño Piñera	IBT-UNAM
Secretario	Dr. Carlos Daniel Amero Tello	CIQ-UAEM
Vocal	Dr. Ramón Alberto Batista García	CIDC-UAEM
Suplente	Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara	CCG-UAEM
Suplente	Dra. Sandra Ignacia Ramírez Jiménez	CIQ-UAEM

**Los resultados del presente proyecto de investigación se presentaron en los siguientes eventos académicos:**

- Presentación de cartel en el 3er Taller de Astrofísica Planetaria y X Congreso Nacional de Astrobiología realizado en Monterrey, Nuevo León del 6 al 10 de marzo de 2017.
- Presentación de cartel en el International Symposium on Extreme Ecosystems and Extremophilic Organisms: biodiversity, biochemistry, physiology realizado en Cuernavaca, Morelos del 18 al 20 de septiembre de 2017.
- Presentación de cartel en el V Congreso de Bioquímica y Biología Estructural de bacterias realizado en Puebla, Puebla del 1 al 5 de octubre de 2017.
- Presentación oral en el 42nd COSPAR Scientific Assembly realizado en Pasadena, California del 14 al 22 de julio de 2018.
- Presentación oral en el XI Congreso de Astrobiología realizado en Cuernavaca, Morelos el 20 y 21 de septiembre de 2018.

## RESUMEN

*Salinibacter ruber*, es una bacteria halófila extrema que se propone como un modelo biológico para evaluar el potencial de habitabilidad del océano de agua líquida salada del satélite Europa. Para determinar si puede sobrevivir en condiciones de salinidad semejantes a las reportadas para ese océano extraterrestre en el presente trabajo se evaluó su crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que recrean las posibles condiciones salinas del océano de Europa. Se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar la concentración salina de óptimo crecimiento y se evaluó la presencia de solutos compatibles mediante RMN cuantitativa y el efecto de la adición de betaína en su crecimiento. De manera simultánea se profundizó en el conocimiento de las características físicoquímicas de la proteína GroEL de *S. ruber*, que en trabajos previos se ha propuesto como una biomolécula importante en procesos de haloadaptación de esta bacteria.

En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de la bacteria halófila *S. ruber* en medios modificados con las sales NaCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se determinó que su crecimiento óptimo se da en 3.3 M de NaCl, 1.0 M de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1.0 M y 1.5 M de concentraciones equimolares y 2:1 de MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivamente. En dichas condiciones *S. ruber* puede acumular betaína, sin embargo, la adición de esta al medio no mejora su crecimiento.

Para el estudio de la proteína GroEL se diseñó un sistema de expresión heteróloga para la proteína y se desarrolló un protocolo de purificación para la proteína que permitió realizar pruebas de cristalización, que finalmente permitieron la obtención de cristales de la proteína GroEL.

Este trabajo permitió evidenciar que *S. ruber* podría sobrevivir en diferentes condiciones salinas propuestas para el océano de Europa utilizando estrategias como la acumulación de solutos compatibles y el uso de proteínas especializadas para contrarrestar el estrés salino.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigaciones Químicas y a sus integrantes por haberme facilitado la infraestructura y equipos analíticos para realizar esta tesis.

A la Dra. Sandra I. Ramírez por la oportunidad de pertenecer al laboratorio y su asesoría durante el desarrollo de la tesis.

A los integrantes de mi Comité Tutoral, el Dr. Ramón Batista y el Dr. Sergio Encarnación por aportar recomendaciones y observaciones durante todo el desarrollo de mi proyecto de tesis.

A los integrantes del Jurado Evaluador por aportar con sus recomendaciones para enriquecer el manuscrito de tesis.

Al grupo de Bioquímica Estructural del Instituto de Biotecnología de la UNAM por brindarme un espacio para continuar trabajando cuando el CIQ de la UAEM permaneció cerrado debido al sismo de 2017 y al movimiento de huelga 2018.

A mi familia, Irma, Ramiro, Ana Caro e Iris, porque en la distancia me apoyaron y amaron siempre.

A Ricardo, por enseñarme tanto, acompañarme y apoyarme siempre.

A mis compañeros del Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios, Regi, Artur, Daira, Clari, Meli, porque aprendiendo juntos terminamos siendo muy buenos amigos.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Estructural, principalmente a Angela y Dino por ser mis amigas.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por su apoyo, acompañamiento y bonitas enseñanzas.

A Dumas, mi mejor amigo, mi apoyo, me cuidaste siempre desde que llegue.

A mis amigas de Colombia Lau y Eve, porque me enseñaron la verdadera amistad a la distancia.

A Frida, mi angelito, regalo del Universo para amarme en los mayores momentos de soledad, siempre te amaré y extrañaré.

A todos los amigos, compañeros, Profesores y demás personas que siempre me apoyaron y ayudaron.

# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1. La Astrobiología.....	6
3.2 Habitabilidad planetaria.....	8
3.3. Objetos de interés astrobiológico.....	10
3.4. Europa.....	13
3.5. Los organismos extremófilos.....	16
3.6. Los organismos halófilos.....	18
3.7. Actividad de agua.....	19
3.8. Estrategias de haloadaptación en bacterias halófilas.....	20
3.9. La bacteria <i>Salinibacter ruber</i> .....	29
3.10 La chaperona GroEL-GroES.....	32
3.11 Técnicas de análisis y caracterización.....	35
3.11.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano.....	35
3.11.2 Dispersión en matriz de fase sólida.....	37
3.11.3 Resonancia magnética nuclear.....	38
3.11.4 Métodos cromatográficos.....	40
3.11.5 Cristalografía de rayos X.....	43
4. HIPÓTESIS.....	46
5. OBJETIVOS.....	46
5.1    Objetivo general.....	46
5.2    Objetivos específicos.....	46
6. MÉTODOS Y MATERIALES.....	47
6.1. Activación de <i>Salinibacter ruber</i> .....	47
6.2. Cinéticas de crecimiento.....	47
6.3. Extracción de solutos compatibles.....	50
6.4. Identificación y cuantificación de solutos compatibles.....	50



6.5. Cinéticas de crecimiento con adición de betaína.....	51
6.6. Generación de un sistema de expresión heterólogo de la proteína GroEL .....	51
6.7. Purificación de la proteína GroEL .....	55
6.8 Pruebas de cristalización.....	56
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
7.1. Cinéticas de crecimiento.....	57
7.2. Cuantificación de solutos compatibles.....	65
7.3. Cinéticas de crecimiento con adición de betaína a los medios modificados .....	68
7.4. Cuantificación de betaína en los medios modificados adicionados con betaína .....	70
7.5. Generación de un sistema de expresión heterólogo para la proteína GroEL .....	74
7.6. Purificación de la proteína GroEL .....	79
7.7. Cristalización de la proteína GroEL .....	83
7. CONCLUSIONES .....	88
8. PERSPECTIVAS .....	91
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
10. Apéndices .....	98
Apéndice A: Cinéticas de crecimiento bacteriano.....	98
Apéndice B: Espectros de resonancia magnética nuclear.....	102
Apéndice C: Cromatogramas de purificación .....	106
Apéndice D: Condiciones donde se encontraron cristales .....	107

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Representación de la zona habitable del sistema solar.....	9
Figura 3.2. Algunos de los objetos de interés astrobiológico del sistema solar.....	12
Figura 3.3. Modelo de la composición interna de Europa.....	14
Figura 3.4. Árbol filogenético de los seres vivos.....	19
Figura 3.5. Estrategias de haloadaptación en organismos halófilos.....	21
Figura 3.6. Representación gráfica de algunas de las proteínas transportadoras de membrana implicadas en la internalización de cationes potasio (K <sup>+</sup> ) en organismos halófilos.....	22
Figura 3.7. Distribución de los puntos isoeléctricos predichos de las secuencias genómicas para <i>Halorubrum lacusprofundi</i> , <i>Acetohalobium arabaticum</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , y <i>Escherichia coli</i> .....	23
Figura 3.8. Distribución de los organismos que utilizan salt-in como estrategia única o principal de haloadaptación.....	25
Figura 3.9. Distribución de los organismos que utilizan solutos compatibles como estrategia única o principal de haloadaptación.....	28
Figura 3.10. Filogenia los phyla Bacteroidetes y Rhodothermaeota.....	30
Figura 3.11. Filogenia de la familia Salinibacteraceae.....	31
Figura 3.12. Estructura de GroEL de <i>Escherichia coli</i> en sus distintas conformaciones .....	34
Figura 3.13. Cinética general de crecimiento de un cultivo bacteriano.....	36
Figura 3.14. Etapas principales de una extracción por dispersión de matriz en fase sólida.....	38
Figura 3.15. Representación de un equipo de resonancia magnética nuclear.....	40
Figura 3.16. Representación de la obtención de un patrón de difracción partir de un cristal.....	44
Figura 6.1. Vector de expresión pET22b + GroEL.....	53

Figura 7.1. Cinética de crecimiento y ajuste lineal de los valores correspondientes a la fase exponencial para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_D$ ).....	59
Figura 7.2. Velocidad específica de crecimiento en función de la actividad de agua (A) y en función de la osmolaridad.....	62
Figura 7.3. Concentración de $MgSO_4$ estimada para el océano de agua líquida del satélite Europa.....	64
Figura 7.4. Espectro de resonancia magnética nuclear de la betaína.....	66
Figura 7.5. Identificación de betaína en la condición salina equimolar de $MgSO_4$ y $Na_2SO_4$ 1.0 M.....	68
Figura 7.6. Porcentaje de betaína encontrada en función de la concentración final de betaína presente en cada condición de crecimiento óptimo.....	72
Figura 7.7. Rutas metabólicas para la biosíntesis de betaína.....	73
Figura 7.8. Confirmación de la amplificación del gen <i>groEL</i> de <i>Salinibacter ruber</i> mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	74
Figura 7.9. Confirmación de la ligación del gen <i>Sr-groEL</i> en el vector pJET mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	76
Figura 7.10. Confirmación de la ligación del gen <i>Sr-groEL</i> en el vector pJET mediante para corte de banda del fragmento <i>Sr-groEL</i> mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	77
Figura 7.11. ADN de las colonias transformadas que contienen la construcción pET22b + <i>Sr-groEL</i> evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	78
Figura 7.12. Expresión de <i>Sr-GroEL</i> a partir de la inducción de la colonia 2 observada en un gel de electroforesis SDS-PAGE 12 % acrilamida.....	79
Figura 7.13. Fracciones resultantes del primer paso del proceso de purificación de la proteína GroEL mediante cromatografía de interacciones hidrofóbicas.....	80
Figura 7.14. Fracciones resultantes del proceso de purificación de la proteína GroEL mediante cromatografía de intercambio aniónico.....	81

Figura 7.15. Fracciones resultantes del proceso de purificación de la proteína GroEL mediante cromatografía de exclusión molecular.....83

Figura 7.16. Cristales obtenidos.....84

Figura 7.17. Comparación de la proteína GroEL de *S. ruber* contra el de otras bacterias tanto mesófilas como extremófilas.....87

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Propiedades físicas de Europa, Encélado, Marte, La Luna y la Tierra.....	11
Tabla 3.2. Distribución de los solutos compatibles en procariotas.....	26
Tabla 3.3 Algunos de los núcleos activos en Resonancia Magnética Nuclear.....	39
Tabla 6.1. Concentraciones molares (M) para cada uno de los medios modificados en los que se evaluó el crecimiento de <i>Salinibacter ruber</i> .....	48
Tabla 7.1. Actividad de agua ( $a_w$ ) y osmolaridad de los medios modificados con NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y MgSO <sub>4</sub> en los que se realizaron las cinéticas de crecimiento de <i>Salinibacter ruber</i> .....	58
Tabla 7.2. Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>Salinibacter ruber</i> en las distintas condiciones salinas evaluadas.....	60
Tabla 7.3. Cantidad de betaína en las concentraciones de óptimo crecimiento en cada condición salina evaluada.....	67
Tabla 7.4. Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>Salinibacter ruber</i> en distintas condiciones salinas con y sin betaína añadida .....	69
Tabla 7.5. Cantidad de betaína presente en las concentraciones de óptimo crecimiento adicionadas con betaína.....	71

# 1. INTRODUCCIÓN

La Astrobiología es la ciencia que estudia el origen, la evolución, la distribución y el destino de la vida en el Universo (Domagal-Goldman *et al.*, 2016). Su objeto de estudio central es la vida terrestre ya que es la única conocida y científicamente aceptada hasta ahora. Desde su surgimiento, la vida ha evolucionado y se ha diversificado para adaptarse a las distintas condiciones físicas y geoquímicas de la Tierra (Demirjian *et al.*, 2001). En términos generales, la mayoría de los organismos que conocemos se desarrollan en ambientes en donde prevalece una temperatura templada, donde existe agua líquida, nutrientes y algunas otras condiciones que les permiten desarrollarse sin mayores retos. Sin embargo, a principios de los años 70 se comenzaron a explorar otros ambientes en los que se identificaron temperaturas del orden de los 80 °C, altos niveles de acidez, presencia de metales pesados y poca disponibilidad de nutrientes (Stahl *et al.*, 1985). La primera hipótesis fue que en estos lugares no podían existir seres vivos. Sorprendentemente se encontró que estos nichos cuentan con una variedad de organismos, principalmente microscópicos, que no solamente resisten en esas condiciones severas, sino que las requieren para desarrollarse y proliferar. Estos organismos se denominan extremófilos y su estudio, así como el posterior descubrimiento de muchos ejemplos más viviendo en otros ambientes extremos, han permitido comprender nuevos aspectos de la vida en la Tierra (Ramírez, 2010).

Aun cuando estamos ciertos de que la Tierra es el único planeta del Universo conocido en el que tenemos evidencias científicas contundentes de la presencia de seres vivos, a la Astrobiología le interesa determinar si ciertos seres vivos terrestres tendrían la posibilidad de sobrevivir en alguno de los objetos planetarios de interés astrobiológico del sistema solar (Des Marais *et al.*, 2008; Javaux, 2006). Los objetos de interés astrobiológico se denominan así ya que cuentan con al menos uno de los requerimientos identificados como básicos para vida: la presencia de agua líquida, la disponibilidad de elementos químicos para formar biomoléculas o la existencia de una fuente de energía que permita sustentar un metabolismo (Chyba y Hand 2005; Domagal-Goldman *et al.* 2016). En el sistema solar se han identificado como objetos de

interés astrobiológico al planeta Marte, así como a los satélites Titán, Europa, Ganímedes y Encélado (Domagal-Goldman *et al.*, 2016).

De particular interés para el presente proyecto de investigación es Europa, uno de los satélites del planeta Júpiter del cual se tienen evidencias teóricas y observacionales que permiten postular la existencia de un océano de agua líquida salada debajo de su superficie de hielo (Chyba y Phillips, 2002; Hand *et al.*, 2007). De acuerdo con los datos de la sonda Galileo, las sales existentes en ese océano corresponden con sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) y sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ ) (Carlson, 2012; McCord *et al.*, 1998), en concentraciones equimolares o con un exceso de  $MgSO_4$ , sin embargo datos experimentales y observacionales posteriores han propuesto la presencia de cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl) como sales dominantes en el océano de Europa (Hibbitts *et al.*, 2019). Europa es un satélite muy frío, la temperatura promedio en su superficie es de 102 K (-171 °C) sin embargo hay estimaciones que proponen que la temperatura en la interfase de la base de hielo y el océano interno de agua líquida, puede llegar a ser de 277 K (4 °C) (Mitri y Showman, 2008; Zelenyi *et al.*, 2010). Ante este escenario planetario, existe un debate sobre la posibilidad de la existencia de vida microscópica en ese océano salado extraterrestre, que inclusive podría tener una génesis distinta a la de la vida terrestre (Zelenyi *et al.*, 2010). En el marco de uno de los objetivos centrales de la Astrobiología, el presente proyecto de investigación se centra en evaluar si *Salinibacter ruber* una bacteria halófila extrema, tiene la capacidad de proliferar en un ambiente controlado que simula al océano del satélite Europa en términos de la presencia de sales sulfatadas y de ser así, estudiar entonces las estrategias que *S. ruber* estaría utilizando para adaptarse a ese ambiente. Se toman como referencia los resultados obtenidos previamente en el grupo de investigación, los cuales indican que *S. ruber* requiere 1.7 M de cloruro de sodio (NaCl) como concentración salina mínima para subsistir, que utiliza a la betaína como soluto compatible, que sobreexpresa a la proteína chaperona GroEL-ES cuando se encuentra fuera de su concentración de óptimo crecimiento y que posee adaptaciones características de halófilos tanto del dominio Bacteria como del dominio Arquea (Miranda, 2015).

Por todo lo anteriormente descrito, es relevante sistematizar el estudio de las estrategias de haloadaptación de *S. ruber* en el contexto de la adaptación de la vida terrestre ante el escenario

que ofrece el océano de agua líquida salada del satélite Europa. La información generada permitirá comprender aspectos específicos de las distintas estrategias de adaptación de las bacterias halófilas, del papel que desempeña la proteína GroEL-ES cuando *S. ruber* tiene que contender contra el estrés osmótico provocado por altas concentraciones de  $MgSO_4$  y de  $Na_2SO_4$ , así como de aspectos relevantes para comprender mejor el potencial de habitabilidad del océano del satélite Europa y con ello, el contexto del futuro de la vida que conocemos pero en un objeto planetario distinto a la Tierra.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para la Astrobiología, los organismos extremófilos pueden visualizarse como un modelo biológico que otorga la posibilidad de explorar la maquinaria bioquímica y la capacidad de adaptación de la vida terrestre ante alguna condición o parámetro extremo que bien puede encontrarse en nuestro planeta, como las aguas ácidas y de elevada temperatura de las pozas del parque Yellowstone o las altas concentraciones salinas del Mar Muerto, o que puede ocurrir en el entorno de algún otro objeto planetario como en los océanos de agua líquida con bajas temperaturas de los satélites helados (Russell *et al.*, 2014) o en el subsuelo del planeta Marte donde pueden encontrarse depósitos de agua líquida y algunas moléculas como nitratos que pueden ser metabolizadas por algunos seres vivos (Orosei *et al.*, 2018; Stern *et al.*, 2017).

El satélite Europa se reconoce como un objeto de interés astrobiológico del sistema solar debido a la existencia de un vasto océano de agua líquida que reside debajo de su helada superficie y en el que se han identificado sales sulfatadas disueltas. Si bien estas características implican que puede satisfacer el cumplimiento de dos de los requerimientos básicos para la vida, es decir la presencia de agua líquida y la disponibilidad de elementos químicos, aún no se ha identificado alguna fuente de energía que le permitiera sustentar la presencia de seres vivos. De cualquier modo, es válido proponer a este océano de agua líquida salada como un escenario potencialmente habitable, es decir que puede albergar algún tipo de organismo, específicamente alguno de los organismos extremófilos que conocemos en la Tierra. En este contexto se propone para el presente proyecto de investigación, el estudio de la adaptación de una bacteria halófila extrema en un ambiente controlado que recrea las condiciones de salinidad del océano del satélite Europa.

En el grupo de investigación se ha encontrado que *S. ruber* puede crecer no sólo en presencia de NaCl sino también en medios modificados con MgSO<sub>4</sub>, que en condiciones de estrés osmótico acumula betaína, una pequeña molécula orgánica que funciona como soluto compatible y que la expresión de algunas de sus proteínas cambia en función de la naturaleza química y de la concentración de la sal mayoritaria a la que sea expuesta.

Es notoria la sobreexpresión de la proteína GroEL-ES cuando se disminuye la concentración de NaCl en el medio al que se expone *S. ruber*, comportamiento esperado para una bacteria halófila acostumbrada al NaCl. Estos resultados preliminares motivaron el desarrollo de estudios sistemáticos y más detallados sobre la habilidad de *S. ruber* para crecer en presencia de mayores concentraciones de MgSO<sub>4</sub> y tratando de replicar más cercanamente las condiciones del escenario extraterrestre de interés, evaluar si logra crecer en presencia de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y en medios modificados con combinaciones de ambas sales sulfatadas. Para determinar si la betaína que utiliza *S. ruber* como soluto compatible tiene efecto en el crecimiento bacteriano, se evalúa el crecimiento en ausencia y en presencia de cantidades específicas de esta molécula orgánica. No está determinado aún si la proteína GroEL de *S. ruber* posee características estructurales diferentes a las de otras chaperonas de bacterias y de ser así, si pueden estas características ayudarle a adaptarse mejor ante condiciones de estrés salino originado por sales sulfatadas. Esto se evaluará comparando la secuencia de aminoácidos de la proteína GroEL de *S. ruber* con la de otras bacterias halófilas para identificar diferencias. Adicionalmente se generará un protocolo para purificar a la proteína GroEL e identificar condiciones de cristalización, lo cual permitirá conocer su estructura tridimensional y observar si algunas de sus características estructurales son las responsables de una mejora en la actividad de esta proteína en condiciones de estrés, realizando una comparación con la misma proteína, tanto de organismos halófilos como no halófilos.

Los objetivos del presente proyecto de investigación están orientados para proporcionar información que permita responder a los anteriores cuestionamientos. La información generada permitirá además abonar en la argumentación sobre la habitabilidad del océano del satélite Europa y sobre las posibilidades de adaptación de los algunos seres vivos terrestres en ese escenario de interés astrobiológico.

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1. La Astrobiología

La Astrobiología es una ciencia que busca comprender el origen, la evolución, la distribución y el destino de la vida en el Universo (Domagal-Goldman *et al.*, 2016). Entre las actividades de investigación que pueden enmarcarse en esta área del conocimiento se pueden mencionar los estudios orientados a la comprensión del origen y la evolución temprana de la vida en la Tierra, de la diversidad de los seres vivos terrestres y su capacidad para colonizar prácticamente cualquier rincón del planeta, la exploración de los diversos objetos del sistema solar, la colonización de Marte o de la Luna, la búsqueda y caracterización de exoplanetas, entre otros. La Astrobiología es una ciencia multidisciplinaria que se apoya en el conocimiento de áreas más tradicionales como la astronomía, la química, la geología o la biología y en tecnologías como las de la información o las de exploración espacial para buscar la manera de responder los cuestionamientos centrales sobre la vida y el Universo (Des Marais *et al.*, 2008; Javaux, 2006).

Uno de los temas centrales de los que se ocupa la Astrobiología es la búsqueda de vida extraterrestre para lo cual existen 3 estrategias generales:

- La búsqueda *in situ*, es decir mediante algún instrumento robotizado o manejado desde alguna estación en la Tierra buscar indicios de vida en la superficie o en la atmósfera de algún planeta o satélite. Actualmente esta estrategia solo ha podido realizarse en objetos del sistema solar (Des Marais *et al.*, 2008; Domagal-Goldman *et al.*, 2016).
- El estudio espectral de las atmósferas planetarias para identificar evidencias de la presencia de vida, conocidas genéricamente como bioseñales. Este tipo de estudios pueden realizarse en los diversos objetos del sistema solar y también en algunos de los planetas extrasolares, aquellos que orbitan alrededor de estrellas distintas al Sol (Chyba y Hand, 2005; Menou *et al.*, 2003).

- La búsqueda de señales de vida inteligente extraterrestre, cuya principal estrategia es la búsqueda y análisis de señales de radiofrecuencia provenientes de lugares fuera del sistema solar (Domagal-Goldman *et al.*, 2016; Tarter, 2001).

Estas investigaciones se reducen a la búsqueda de vida como la conocemos, es decir, a la vida que requiere agua líquida, moléculas orgánicas y una fuente utilizable de energía libre. Diversas investigaciones han demostrado que las moléculas orgánicas, aquellas que tienen al elemento químico carbono como elemento central y las fuentes útiles de energía se pueden encontrar con facilidad en el sistema solar (Des Marais y Walter, 1999).

Las actuales herramientas moleculares e informáticas para el análisis de la presencia de genomas de diferentes organismos en diferentes ambientes permiten explorar la enorme diversidad de la vida terrestre, así como ampliar la gama de entornos en los que ésta puede prosperar. La variedad de condiciones físicas y geoquímicas de estos entornos también permite redefinir el intervalo de condiciones en las que es posible encontrar vida. Estos ambientes terrestres donde actualmente se reconoce que puede prosperar la vida, en algunos casos poseen similitudes con entornos encontrados fuera de la Tierra, permitiendo proponer la posibilidad de que la vida pueda prosperar más allá de la Tierra (Des Marais y Walter, 1999).

Se tienen registros de organismos vivos en la Tierra muy poco después de que ésta terminó de formarse. Se estima que los estromatolitos más antiguos se formaron hace 3,700 millones de años y las rocas terrestres más antiguas están datadas en 4,400 millones años (Kuiper *et al.*, 2008; Nutman *et al.*, 2016). Estos hechos alientan la idea de que la vida en la Tierra surgió en etapas muy tempranas y de que, si esto ocurrió en nuestro planeta, puede ocurrir también en otro lugar del Universo.

El subsuelo terrestre alberga ambientes habitables en los depósitos de agua subterráneos y una extensa biota que subsiste utilizando fuentes de energía no fotosintéticas, principalmente la energía obtenida de reacciones de oxidación-reducción. Podría pensarse entonces que otros objetos planetarios como el planeta Marte o el satélite Europa pueden tener condiciones habitables en sitios ubicados debajo de sus superficies. Para el caso de Europa y otros satélites

helados, en océanos debajo de su cubierta de hielo y en Marte, en depósitos acuíferos bajo la superficie.

Diferentes entornos habitables podrían haberse desarrollado más allá de la Tierra y pudieron haber existido durante el tiempo suficiente para que la vida tuviera oportunidad de originarse. Por estos motivos, es que se buscan este tipo de escenarios en los diferentes objetos planetarios del sistema solar (Des Marais y Walter, 1999).

### **3.2 Habitabilidad planetaria**

La habitabilidad es la capacidad de un ambiente para soportar la actividad de al menos un organismo conocido (Cockell *et al.*, 2016). Para identificar a un lugar como habitable se ha determinado que debe cumplir como mínimo con tres requerimientos que son necesarios para todos los seres vivos terrestres. Estos requerimientos son:

- 1) La presencia de una fuente de energía que pueda ser utilizada para sustentar un metabolismo. En la Tierra existen organismos que pueden transformar a pequeñas moléculas inorgánicas como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) presentes en la atmósfera, en moléculas orgánicas como la glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) gracias a la radiación visible que proviene del Sol, la estrella principal de nuestro sistema planetario, y a unos organelos específicos denominados cloroplastos, que se encuentran en las células de esos organismos. Este proceso se conoce como fotosíntesis y lo realizan los organismos fotoautótrofos. (Domagal-Goldman *et al.*, 2016).
- 2) La existencia de elementos químicos que puedan utilizarse para construir moléculas útiles para los seres vivos. La vida terrestre utiliza un conjunto de elementos químicos para sintetizar biomoléculas. Este conjunto de bioelementos primarios está constituido por carbono (C), hidrógeno (H) oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S). También se necesitan pequeñas cantidades de algunos elementos secundarios como sodio (Na), potasio (K), hierro (Fe), aluminio (Al), flúor (F), por mencionar algunos. Con todos ellos y en una continua transformación, se sintetizan los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos que constituyen a todos los seres que habitan la Tierra. (Cockell *et al.*, 2016).

3) La disponibilidad de un disolvente que permita la ocurrencia de las interacciones químicas propias de los seres vivos. Todos los seres vivos conocidos necesitan de agua líquida para subsistir. El agua líquida facilita la interacción de moléculas pequeñas que se unen para formar moléculas más grandes y forma parte de algunos de los procesos metabólicos. Se mantiene líquida en un amplio intervalo de temperatura, de 0 a 100 grados centígrados, a la presión de 1 atmósfera (atm), pero también podría mantenerse líquida si la temperatura es cercana a 0 °C y la presión disminuye, o bien, si la temperatura es cercana a 100 °C y la presión aumenta. Para algunos de los objetos de interés astrobiológico del sistema solar se ha propuesto que sustancias como los hidrocarburos, específicamente el etano ( $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ ), o el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) podrían funcionar como un disolvente adecuado en lugares como el satélite Titán (Cockell et al., 2016; Domagal-Goldman *et al.*, 2016).

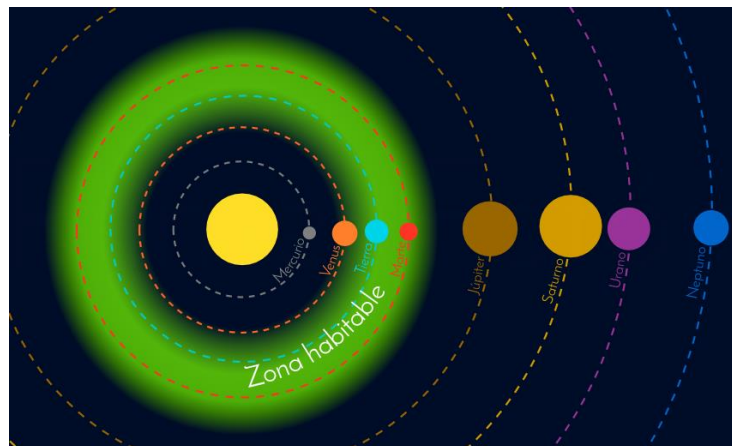


Figura 3.1. Representación de la zona habitable del sistema solar. A una distancia de entre 0.84 y 1.67 se localiza la zona habitable del Sol (región verde). Más cerca del Sol, la temperatura es muy alta para permitir la existencia de agua líquida en la superficie de algún planeta y más lejos, la temperatura es muy baja. Fuente: Francisca Concha, Observatorio Astronómico Andino

Debido a que el agua es el único disolvente en el que se sustenta la vida como la conocemos, la presencia de este elemento en estado líquido se toma como un parámetro importante en la búsqueda de lugares habitables fuera de la Tierra y se utiliza para definir al término de zona

habitable (Figura 3.1), entendida como el área alrededor de una estrella donde puede estar presente al menos un planeta cuya temperatura global permita la existencia de agua líquida en su superficie (Menou, Tabachnik, y Fellow, 2003)

Sin embargo, esta definición no toma en cuenta dos fuentes de energía que podrían ser responsables de mantener líquida al agua presente en algunos de los objetos del sistema solar exterior, la energía radiogénica y la fuerza de marea. La energía radiogénica consiste en la generación de calor debida al decaimiento de distintos isótopos (Hand *et al.*, 2007). La fuerza de marea es el resultado de la diferencia de la fuerza gravitacional que existe a lo largo del diámetro de un cuerpo (Mitri *et al.*, 2008). Para los satélites Europa, Ganímedes y Calisto estas dos fuentes pueden ser las responsables de mantener líquida el agua (Hand *et al.*, 2007). Los objetos planetarios del sistema solar en los cuales es posible identificar al menos 2 de los tres requerimientos básicos para la vida terrestre, se denominan objetos de interés astrobiológico.

### **3.3. Objetos de interés astrobiológico**

La comprensión de la naturaleza de la vida terrestre proporciona un importante punto de partida para guiar las estrategias de exploración de lugares habitables y/o la presencia de vida en el sistema solar. La superficie de algunos planetas y satélites del sistema solar son actualmente hostiles a la vida tal como la conocemos, debido a que en general, presentan condiciones extremas de temperatura, presión, anoxia, disponibilidad de agua líquida y de fuentes de energía aprovechables por los seres vivos. Sin embargo, debajo de la superficie de algunos de estos objetos pueden existir océanos o depósitos acuíferos que pueden considerarse habitables.

A partir de los años 90, se comenzó a ampliar el conocimiento del potencial de habitabilidad, pasado y presente, del planeta Marte, así como de los satélites Europa, Encelado y Titán (Des Marais *et al.*, 2008; Domagal-Goldman *et al.*, 2016; Morrison, 2001) reconociéndolos como los principales objetos de interés astrobiológico del sistema solar (Figura 3.2).

Tabla 3.1. Propiedades físicas de Europa, Encélado y Marte. Se muestran también las propiedades físicas de La Luna y la Tierra como comparación.

	<b>Europa</b>	<b>La Luna</b>	<b>Marte</b>	<b>Tierra</b>
<b>Tipo de objeto</b>	Satélite de Júpiter	Satélite de la Tierra	Planeta	Planeta
<b>Distancia al Sol (UA*)</b>	5.21	0.002	1.5	1
<b>Periodo orbital (días terrestres)</b>	3.5	29	686.9	365
<b>Periodo de rotación (horas)</b>	84	655	24.6	24
<b>Diámetro (km)</b>	3121.6	3474	6794.4	12742
<b>Masa (kg)</b>	$4.80 \times 10^{22}$	$7.34 \times 10^{22}$	$6.42 \times 10^{23}$	$5.97 \times 10^{24}$
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	3.013	3.344	3.933	5.515
<b>Gravedad (m/s<sup>2</sup>)</b>	1.3	1.6	3.7	9.8
<b>Albedo</b>	0.670	0.12	0.150	0.367
<b>Temperatura (K)</b>	50-125	40-396	186-293	184-331
<b>Presión (kPa)</b>	$1 \times 10^{-10}$	0.003	0.63	101.325
<b>Constituyentes de la atmósfera</b>	Muy tenue, compuesta principalmente por O <sub>2</sub>	25 % He 25 % Ne 23 % H <sub>2</sub> 20 % Ar	95.3 % CO <sub>2</sub> 2.7 % N <sub>2</sub> 0.16 % Ar	78 % N <sub>2</sub> 21 % O <sub>2</sub> 0.93 % Ar 0.4 % CO <sub>2</sub>

Marte ha sido, después de la Tierra, el planeta más explorado con misiones robóticas. La información obtenida ha permitido determinar la presencia de agua subsuperficial en los polos y estacional en diversas regiones, encontrar evidencias como las formaciones geológicas y minerales cuyo origen solo pudo darse en presencia de agua líquida de un Marte antiguo con condiciones habitables, e incluso proponer que algunos microorganismos terrestres estudiados actualmente podrían soportar las condiciones ambientales que existen en este planeta (Beegle *et al.*, 2007).



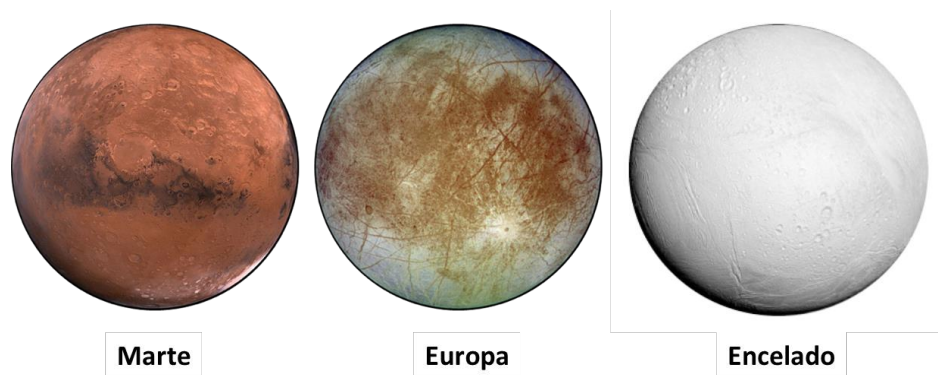


Figura 3.2. Algunos de los objetos de interés astrobiológico del sistema solar. Fuente: NASA/JPL

Titán, el satélite más grande de Saturno, a pesar de no poseer agua en estado líquido, tiene una densa atmósfera constituida por nitrógeno molecular ( $N_2$ ) y metano ( $CH_4$ ), ésta última la molécula orgánica más sencilla. La radiación ultravioleta (UV) y algunas partículas de alta energía provocan reacciones que transforman esos constituyentes primarios en moléculas orgánicas formadas por átomos de carbono e hidrogeno como los hidrocarburos, y otras formadas por átomos de carbono, hidrógeno y nitrógeno como los nitrilos. Ambos tipos de moléculas pueden existir en fase gaseosa y en fase condensada. Las moléculas en fase condensada forman a los aerosoles que por acción de la gravedad son depositados en la superficie del satélite (Domagal-Goldman *et al.*, 2016).

Los satélites Europa y Encélado se consideran también objetos de interés astrobiológico debido principalmente a las evidencias de la existencia de un océano salado debajo de sus superficies congeladas. Con la existencia de agua en estado líquido y la presencia de algunos compuestos químicos que podrían utilizar algunos organismos vivos para formar biomoléculas, se cumplen en estos satélites al menos dos de los tres requerimientos básicos para la vida terrestre, por lo que su estudio es de alto interés en Astrobiología (Des Marais *et al.*, 2008; Domagal-Goldman *et al.*, 2016; Spencer y Nimmo, 2013).

### 3.4. Europa

Europa es uno de los cuatro satélites galileanos descubiertos en 1610 por el astrónomo italiano Galileo Galilei. Posee un radio de 1,560 km que se encuentra en resonancia con sus vecinos Ío y Ganímedes. Presenta rotación sincrónica con Júpiter, por lo que siempre dirige una misma cara hacia el planeta, como sucede con la Luna y la Tierra. Tiene un periodo rotacional y orbital de 3.6 días terrestres. La distancia entre Júpiter y Europa varía debido a que el satélite posee una órbita elíptica, produciendo una deformación por efecto de marea y disipación interna de energía. Una proporción grande de este calor es disipado desde el núcleo de Europa hacia el manto de silicatos y hacia la capa de hielo de la superficie. La densidad media es de  $3.0 \text{ g/cm}^3$  lo que indica que está formado principalmente por silicatos (Showman y Malhotra, 2003). Es un satélite frío ya que la temperatura promedio de los polos es de 50 K y la del ecuador es de 120 K. Se ha detectado una atmósfera tenue de oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) en la superficie, producto de la fotólisis que sufre el hielo de agua (Chyba y Phillips, 2002).

El modelo aceptado de la composición interna de Europa predice la presencia de un núcleo de hierro (Fe) o sulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ ), un manto rocoso anhidro y una capa externa con una densidad de  $1,000 \text{ kg/m}^3$  que cubre toda la superficie (Figura 3.3) y que por este hecho lo más probable es que corresponda a una capa de agua, aunque estas mediciones no permiten precisar si esta agua se encuentra en estado sólido o en estado líquido (Kargel *et al.*, 2000). La capa de agua corresponde al 7% de la masa total de Europa ( $3.36 \times 10^{21} \text{ Kg}$ ). Si toda esa masa de agua estuviera líquida, correspondería al doble del volumen de agua que hay en todos los océanos de la Tierra (Anderson *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Chyba y Phillips, 2002).

La superficie del satélite Europa es de agua sólida, pero se pueden apreciar algunas características geológicas como líneas, fracturas, lentículas, domos y algunos cráteres de impacto. Debido a la presencia de pocos cráteres de impacto se sugiere que la superficie de Europa es una superficie joven, con una antigüedad menor a 10 millones de años (Carr *et al.*, 1998).

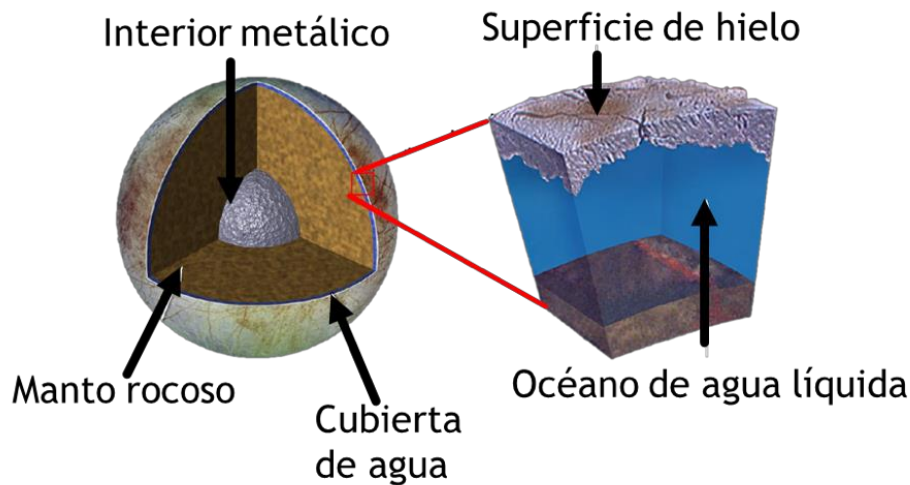


Figura 3.3. Modelo de la composición interna de Europa, Modificado de NASA/Caltech JPL.

Las mediciones realizadas con el espectrómetro de mapeo en el infrarrojo cercano (NIMS por *Near-Infrared Mapping Spectrometer*) indican la presencia de ácido sulfúrico y sales sulfatadas de magnesio y sodio (Carlson, 2012; McCord *et al.*, 1998). Se demostró que la presencia de sulfatos de magnesio y sodio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  epsomita,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  bloedita,  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  mirabilita), carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  natrón) y mezclas de estas sales proporcionan un buen ajuste para los espectros obtenidos por el NIMS en la región del infrarrojo cercano (Carlson, 2012; Zolotov y Shock, 2001). Posteriormente, gracias a las observaciones realizadas a longitudes de onda entre 1.4 y 2.4  $\mu\text{m}$ , utilizando el sistema de óptica adaptativa y el espectrógrafo de campo integrado OSIRIS (Ohio State Infrared Imager/Spectrograph) en el Observatorio W. M. Keck localizado en Hawaii, se determinó que los cloruros ( $\text{Cl}^-$ ), cloratos ( $\text{ClO}_3^-$ ) y percloratos ( $\text{ClO}_4^-$ ) pueden también representar una fracción importante de las sales presentes en la superficie de Europa (Brown y Hand, 2013; Hibbitts *et al.*, 2019; Ligier *et al.*, 2016). Si las sales detectadas en la superficie provienen de las aguas que emergen del océano interno, es posible proponer entonces cuál sería la composición de este océano. Si el océano interno es pobre en cloruros, las sales sulfatadas, principalmente el sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) sería la dominante (Kargel *et al.*, 2000; Vu *et al.*, 2016). Otros modelos indican que con una cantidad inicial de cationes sodio ( $\text{Na}^+$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y de aniones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), predominarían el sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y el cloruro

de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) (Vu *et al.*, 2016);. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que las sales sulfatadas detectadas en la superficie podrían ser el resultado de procesos radiolíticos, es decir provenir de la descomposición de otros materiales más primigenios por acción de alguna forma de radiación ionizante como la radiación ultravioleta (UV) que el satélite recibe del Sol. Esto provocaría que las sales sulfatadas no sean las dominantes en el océano (Brown y Hand, 2013) y que por lo tanto, la composición química del mismo sea diferente a la comúnmente aceptada hasta hoy. La presencia de un posible ciclo de los silicatos podrían incluso favorecer la presencia de cloruros como sales mayoritarias (Hibbitts *et al.*, 2019; Küppers y Schneider, 2000).

Independientemente de la composición química del océano, es indiscutible la necesidad de que existan en él iones disueltos. La evidencia más convincente para este hecho es la existencia de un campo magnético inducido en Europa detectado por el magnetómetro de la sonda Galileo. Para explicar la presencia de este campo magnético inducido, se requiere una capa conductora global cerca de la superficie. La identidad más probable para esta capa conductora es la existencia de iones disueltos en el agua líquida, es decir, la existencia de un océano de agua líquida salada (Chyba y Phillips, 2002; Hand *et al.*, 2007).

Con respecto a la energía disponible en el satélite Europa se sabe que el flujo energético total resultante de los iones, protones y electrones incidentes significa un promedio de  $125 \text{ mW/m}^2$  en la superficie,  $12.8 \text{ W/m}^2$  provienen del Sol y de 21 a  $42 \text{ mW/m}^2$  provienen de Júpiter. Todo esto hace un total de casi  $13 \text{ W/m}^2$ . Sin embargo, debido al alto valor del albedo de Europa (0.67) la mayor parte de esta energía es reflejada por la brillante superficie de hielo de agua, la energía restante no logra penetrar mucho en esa capa de hielo y consecuentemente se irradia rápidamente perdiéndose como calor en la superficie. Las otras fuentes de energía disponibles en el satélite, corresponden a la energía generada por las fuerzas de marea que se estima entre 10 y  $190 \text{ mW/m}^2$  y al calor radiogénico que proviene del núcleo y que aporta de 4 a  $7 \text{ mW/m}^2$  (Hand *et al.*, 2007). Estas estimaciones indican la presencia de suficiente energía para el mantenimiento de un océano subsuperficial y de fuentes de energía disponibles para sustentar alguna forma de vida.

Basados en la posible composición del interior de Europa, se han propuesto algunas reacciones químicas, principalmente de óxido-reducción, que podrían proveer energía suficiente para sustentar algún tipo de vida microbiana en Europa como por ejemplo la disociación natural del agua y la filtración de oxidantes a través de la corteza helada de Europa que podrían proporcionar suficiente oxígeno para producir un gradiente redox significativo en el océano de Europa (Hand *et al.*, 2007; Schulze y Irwin, 2002).

Las condiciones de presencia de sales, bajas temperaturas y las fuentes de energía disponibles, posicionan al océano de Europa como un ambiente extremo. Por esta razón las formas de vidas con la capacidad de subsistir en este entorno son los organismos extremófilos, los cuales poseen adaptaciones que les permiten vivir en lugares donde alguna condición como temperatura, pH o disponibilidad de agua, está por fuera del intervalo donde se desarrollan óptimamente la mayor parte de los organismos terrestres.

### **3.5. Los organismos extremófilos**

Son organismos que han evolucionado para desarrollarse en una gran variedad de ambientes extremos (Demirjian *et al.*, 2001), cuyas condiciones son un requisito para subsistir (Ramírez, 2010). Se pueden clasificar en función de las condiciones que predominan en los ambientes en los que se les encuentra. Entonces se identifican a los organismos termófilos e hipertermófilos si requieren de altas o muy altas temperaturas, a los psicrófilos si crecen en condiciones de baja temperatura, a los acidófilos o alcalófilos cuando se les encuentra en lugares con pH ácido o básico, respectivamente; los organismos barófilos si crecen en sitios con un alto valor de presión y los organismos halófilos si requieren de altas concentraciones salinas para vivir. Además, algunos de estos organismos pueden ser poliextremófilos ya que están adaptados para vivir en ambientes donde se presenta más de un parámetro con valores extremos (Rampelotto, 2013).

Los extremófilos incluyen organismos pertenecientes a cualquiera de los tres dominios filogenéticos en los que actualmente se organiza la vida. En el dominio Arquea es en el que se

encuentran organismos capaces de enfrentar algunas de las condiciones más extremas. En este grupo se encuentran, por ejemplo, algunos organismos hipertermófilos, acidófilos, alcalófilos y halófilos más extremos. Estos organismos además suelen ubicarse entre los menos versátiles de los extremófilos, cuando se comparan con los extremófilos pertenecientes a los dominios Bacteria y Eucariota (Rampelotto, 2013). Desde el punto de vista de la clasificación basada en su historia evolutiva, la comparación de los taxa que presentan los organismos extremófilos junto con el análisis de sus ecosistemas puede proveer respuestas sobre el origen, distribución y evolución de la vida, pues permite entender las relaciones filogenéticas y evolutivas entre los organismos (Pikuta, *et al.*, 2007).

En el campo de la biotecnología, las enzimas de algunos organismos extremófilos poseen diversas aplicaciones, pues sus inusuales propiedades les permiten funcionar en condiciones muy particulares como altas y bajas temperaturas, altas concentraciones salinas o altas presiones, convirtiéndose en una herramienta útil en algunos procesos químicos, biológicos e industriales, ya que las condiciones en las que ocurren estos procesos no podrían ser soportadas por las enzimas de los organismos mesófilos (Demirjian *et al.*, 2001; Fujiwara, 2002).

Sin embargo, la biotecnología no es la única que se ve beneficiada del estudio de los organismos extremófilos, ya que existen diferentes condiciones extremas terrestres, que son semejantes con alguna o algunas de las características conocidas para los objetos planetarios del sistema solar. Como por ejemplo, los océanos con bajas temperaturas como el de Europa o el de Encélado, o el ambiente anóxico y árido de la superficie de Marte. La habilidad que han mostrado algunos de los organismos terrestres para colonizar ambientes con condiciones extremas puede proponerse como marco de referencia para estudiar con detalle algunos de los objetos planetarios del sistema solar que presentan un elevado potencial de habitabilidad, es decir que pueden o pudieron albergar algún tipo de vida en alguna etapa de su pasado geológico y de la cual puede aún existir algún registro fósil (Botcharova, 1974; Cavicchioli, 2002).

### 3.6. Los organismos halófilos

Aun cuando todos los organismos terrestres necesitan de una cierta cantidad de cloruro de sodio (NaCl), algunos organismos tienen un especial requerimiento de altas concentraciones de NaCl para tener un óptimo desarrollo. Estos organismos se denominan halófilos (DasSarma y DasSarma, 2012). Los primeros organismos halófilos fueron aislados de salmueras relacionadas con la industria alimenticia en los años 90. En las últimas tres décadas se han desarrollado estudios más detallados sobre los organismos halófilos aislados de ambientes naturales como lagos salinos, pozas de evaporación y suelos salinos (Ventosa *et al.*, 2011). Estos organismos halófilos se clasifican de acuerdo a la concentración molar (mol/L) de NaCl que se ha identificado como la de su óptimo crecimiento, clasificándose como halófilos moderados si crecen óptimamente entre 0.5-2.5 molar (M) de NaCl y halófilos extremos si lo hacen entre 2.5 M y 5.2 M de NaCl. (Oren, 2008; Ventosa *et al.*, 2011).

La capacidad de crecer en altas concentraciones salinas está dada por su capacidad para crecer y replicarse a pesar de las altas presiones osmóticas que generan los iones disueltos en el medio. Para lograr esto utilizan estrategias basadas en contrarrestar o igualar la presión osmótica externa, ya sea acumulando iones dentro del citoplasma o moléculas orgánicas pequeñas (Empadinhas y Da Costa, 2008).

Se ha reconocido que los halófilos están presentes en los tres dominios de la vida (Oren, 2008) y que poseen una amplia diversidad metabólica que incluye a organismos fotótrofos oxigénicos y anóxicos, aeróbicos heterótrofos, metanógenos, denitrificantes entre otros y que esta diversidad disminuye a medida que hay un mayor requerimiento salino (Oren, 2002). En el dominio Arquea se encuentran los organismos con mayores requerimientos de NaCl, ubicados en el orden Halobacteriales, en el género *Halobacterium* y en el género *Methanothermus* (Empadinhas y Da Costa, 2008). En el dominio Eucariota existen menos representantes, como lo son el alga verde unicelular del género *Dunaliella*, algunos hongos, camarones, flagelados, ciliados y protozoos ameboides. Por su parte, en el dominio Bacteria pueden encontrarse halófilos en los phyla Cianobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes y Bacteroidetes. Estas bacterias halófilas suelen encontrarse como la biomasa dominante en la zona planctónica de lagos hipersalinos. La mayor parte de las bacterias halófilas presentes en el dominio bacteria son halófilas moderadas, a excepción de algunos representantes del

phylum Bacteroidetes que son halófilos extremos como lo son los géneros *Salinibacter* y *Salisaeta* (Figura 3.4) (Oren, 2008).

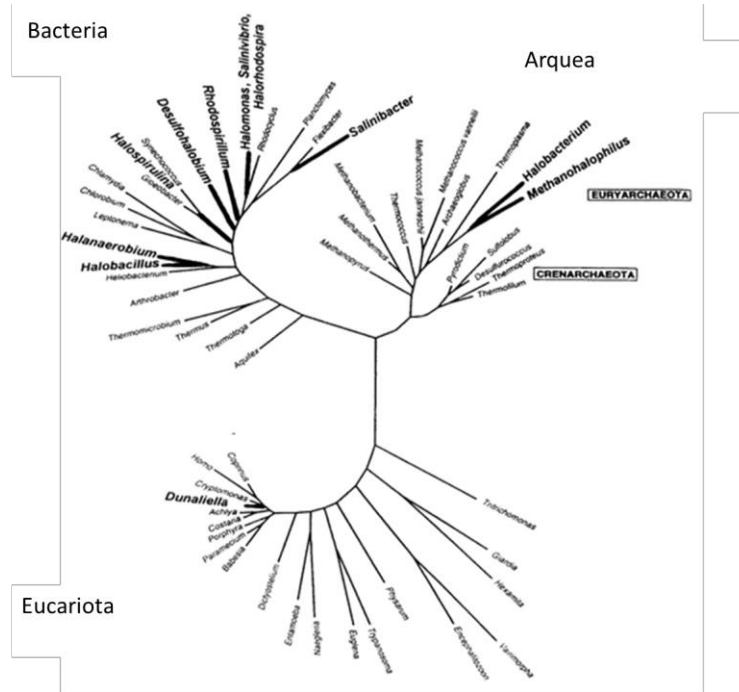


Figura 3.4. Árbol filogenético de los seres vivos. Las ramas resaltadas en negro incluyen algunos grupos en los que se han identificado organismos halófilos (Oren, 2002)

Una alta concentración salina en un medio disminuye la cantidad de agua biodisponible. El parámetro que mide esta cantidad de agua biodisponible es la actividad de agua.

### 3.7. Actividad de agua

El agua líquida es necesaria para todas las formas de vida en la Tierra. Sin embargo, no toda el agua líquida terrestre es habitable. Si la concentración salina, típicamente expresada en función de la concentración de NaCl, es alta entonces el agua no se encuentra disponible químicamente debido a que las moléculas de agua se encuentran solvatando los iones presentes, por lo cual no puede ser utilizada por los organismos vivos para su metabolismo (Tosca *et al.*, 2008). Como resultado, al aumentar la concentración de NaCl en un medio acuoso, la actividad biológica disminuye bruscamente. Cuantitativamente, la disponibilidad



química del agua líquida se puede expresar en términos de su actividad ( $a_w$ ). El parámetro de actividad de agua corresponde con el contenido efectivo de agua expresado como:

$$a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{n_{\text{soluto}}}{n_{\text{soluto}} + n_{\text{disolvente}}} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Donde P es la presión de vapor de la disolución,  $P_0$  es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura,  $n_{\text{soluto}}$  es el número de moles del soluto y  $n_{\text{disolvente}}$  indica el número de moles del disolvente. El agua pura tiene un valor de actividad de agua de 1.0 y éste valor disminuye a medida que aumenta la cantidad de solutos en el medio acuoso, que bien pueden corresponder con un aumento en la concentración de NaCl o de cualquier otra sustancia química (Grant, 2004; Tosca *et al.*, 2008).

La actividad de agua ( $a_w$ ) determina la viabilidad y la funcionalidad de los seres vivos. La mayor parte de los seres vivos no extremófilos, se desarrollan en actividades de agua entre 0.980 (valor de  $a_w$  del agua de mar) y 1.000 (valor de  $a_w$  del agua pura), y no pueden reproducirse en ambientes que tienen un valor de  $a_w$  superior a 0.900. Por otro lado, no se ha encontrado organismos que puedan dividirse en medios con actividades de agua menores a 0.610. Este límite de actividad biológica le corresponde al hongo xerófilo *Xeromyces bisporus* (Grant, 2004). Los organismos halófilos, que pueden crecer en ambientes con valores de  $a_w$  de entre 0.700 a 0.980, han desarrollado diferentes estrategias que les permiten desarrollarse en sitios con poca agua biodisponible.

### **3.8. Estrategias de haloadaptación en bacterias halófilas**

Los organismos halófilos deben mantener una presión osmótica en su citoplasma igual o incluso mayor a la presión osmótica que les impone su entorno. Cuando se presenta una alta concentración de iones en el medio, se genera una presión osmótica que busca ser igualada con la del interior de la bacteria, por lo cual la célula pierde agua pues esta puede moverse fácilmente a través la membrana, generando plasmólisis celular. Esta es la razón por la cual las estrategias de adaptación se basan principalmente en mantener el turgor celular (Edbeib *et al.*, 2016).

Se han descrito como estrategias principales de haloadaptación en bacterias, la acumulación de algunos iones inorgánicos y de algunos solutos compatibles. Estas estrategias se pueden presentar en conjunto o de manera independiente (Empadinhas y Da Costa, 2008; Oren, 2008; Ventosa, *et al.*, 1998).

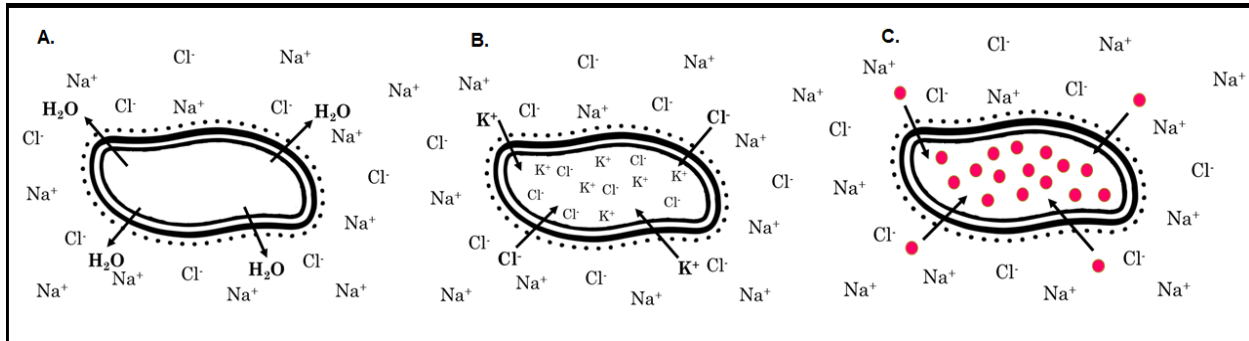


Figura 3.5. Estrategias de haloadaptación en organismos halófilos. A. En organismos no halófilos se genera pérdida de agua y se da plasmólisis, B. Los halófilos extremos mantienen acumulan iones para igualar la presión osmótica, C. Los halófilos moderados mantienen su turgor acumulando solutos compatibles.

La acumulación de iones inorgánicos, también conocido como *salt-in*, consiste en almacenar cationes potasio (K<sup>+</sup>) y aniones cloruro (Cl<sup>-</sup>) en el citoplasma del organismo halófilo para mantener el turgor celular (DasSarma y DasSarma, 2015) como se muestra en la figura 3.5 B. Esta estrategia implica un bajo costo energético para el organismo ya que puede utilizar transportadores específicos para estos iones.

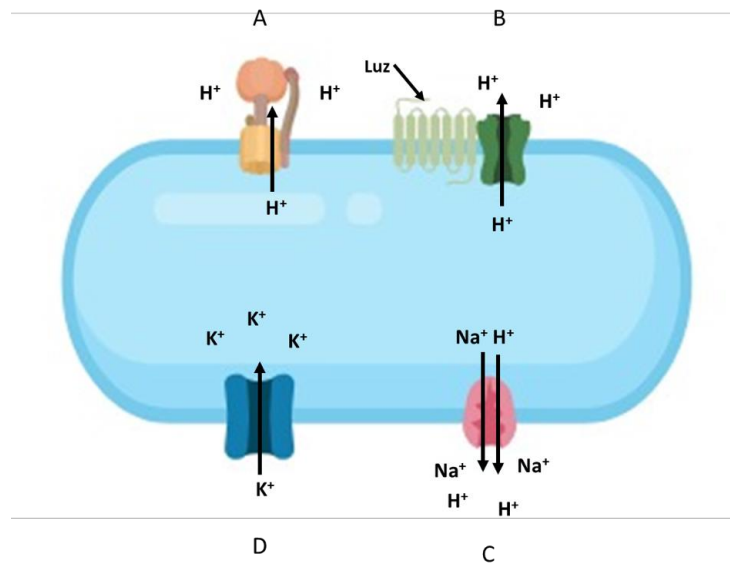


Figura 3.6. Representación gráfica de algunas de las proteínas transportadoras de membrana implicadas en la internalización de cationes potasio ( $K^+$ ) en organismos halófilos. A. ATP sintasa, B. Bacteriorodopsina, C. Antiportador sodio/hidrógeno, D. Uniportador de potasio.

Los halófilos utilizan proteínas de membrana de transporte activo que trasladan iones y moléculas en contra del gradiente, conocidas como bombas. Las utilizan para internalizar iones potasio ( $K^+$ ) y cloruro ( $Cl^-$ ) hacia el citoplasma. Las bombas que utilizan los organismos halófilos, a diferencia de los transportadores de la mayor parte de los organismos no halófilos, presentan una mayor proporción de argininas y lisinas en la entrada y salida de estos transportadores, aminoácidos que favorecen la toma y liberación del anión cloruro. Respecto al ion potasio se ha reportado la acción conjunta de cuatro bombas de protones representadas esquemáticamente en la figura 3.6. Estas enzimas son la ATP sintasa (Figura 3.6 A), la bacteriorodopsina (Figura 3.6 B), el antiportador  $Na^+/H^+$  (Figura 3.6 C) y el uniportador de  $K^+$  (Figura 3.6 D). El mecanismo de acción de estos transportadores consiste en la generación de un potencial eléctrico por parte de la ATP sintasa, la bacteriorodopsina y el antiportador  $Na^+/H^+$ , el cual favorece la entrada de  $K^+$  hacia el interior de la célula por medio del uniportador de  $K^+$  (Edbeib *et al.*, 2016).

Debido a la alta concentración de iones en su citoplasma, los organismos que usan esta estrategia necesariamente requieren de una maquinaria celular adaptada para funcionar

correctamente en presencia de altas concentraciones de KCl. Una alta concentración de KCl afecta la estabilidad de las proteínas de organismos no halófilos y desestabilizan su plegamiento, ya que se genera una deshidratación en la superficie debido a la pérdida de la capa de solvatación de las proteínas a raíz de la presencia de iones disueltos (Figura 3.5 A). Para contrarrestar esta situación, las proteínas de las bacterias halófilas presentan una mayor cantidad de aminoácidos ácidos, lo que les permite mantenerse estables en un citoplasma con altas concentraciones de KCl (Madern *et al.*, 2000).

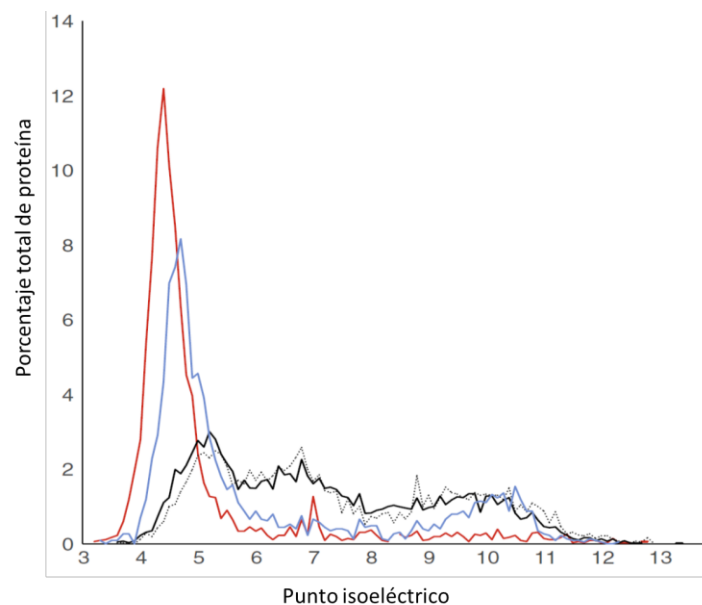


Figura 3.7. Distribución de los puntos isoeléctricos predichos de las secuencias genómicas para *Halorubrum lacusprofundi* (rojo), *Acetohalobium arabaticum* (azul), *Debaryomyces hansenii* (línea negra), y *Escherichia coli* (puntos negros)

Se han realizado estimaciones que permiten identificar que el proteoma de los organismos halófilos que utilizan la acumulación de KCl como su estrategia principal de haloadaptación, presentan un punto isoeléctrico que se ubica en valores de pH de entre 4 y 5 (Figura 3.7). En la figura 3.7 se compara la distribución de los puntos isoeléctricos para la arquea halófila extrema *Halorubrum lacusprofundi*, la bacteria halófila moderada *Acetohalobium arabaticum*, la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* y la bacteria no halófila *Escherichia coli*. Se observa claramente que los puntos isoeléctricos de las proteínas de los procariotas halófilos

presentan los valores más bajos. Esta tendencia hacia los valores ácidos se explica en base a la alta proporción de aminoácidos ácidos como aspartato y glutamina y sus respectivos ácidos, ácido aspártico y ácido glutámico, que aportan una carga negativa y que suelen estar ubicados en la superficie de las proteínas de halófilos extremos. Cuando la superficie de las proteínas está cargada negativamente, se mejora su habilidad para competir por las moléculas de agua y al evitar la pérdida de la capa de solvatación (DasSarma y DasSarma, 2015; Edbeib *et al.*, 2016; Oren, 2008). Los valores bajos en el punto isoeléctrico de las proteínas de las bacterias halófilas también se relacionan con el déficit de aminoácidos básicos, principalmente lisina. Se han identificado cerca de 800 grupos de proteínas conservadas en haloarqueas, denominados HOGs por *Haloarchaeal Orthologous Groups*, que demuestran cómo se conserva la naturaleza ácida de las proteínas de las Haloarqueas en contraste con las de sus ortólogos no halófilos (DasSarma y DasSarma, 2015).

La acumulación de iones inorgánicos la presentan solo los organismos procariontes y parece estar restringida para las arqueas de la familia Halobacteriaceae que contiene géneros como *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium* y *Natronococcus*, aunque también se ha encontrado en las bacterias del orden Haloanaerobiales phylum Firmicutes y en el género *Salinibacter* phylum Bacteroidetes. Estos grupos están señalizados en los recuadros rosa en la Figura 3.8 (Empadinhas y Da Costa, 2008).

Además de la presencia de una mayor proporción de aminoácidos ácidos en las proteínas de las bacterias halófilas, se ha identificado también una disminución de las cadenas hidrofóbicas laterales en algunos de los aminoácidos como la fenilalanina, la leucina y la isoleucina, localizados en la superficie de las proteínas y un aumento de estos mismos aminoácidos hacia las regiones interiores del cuerpo tridimensional de las proteínas (DasSarma y DasSarma, 2015; Edbeib *et al.*, 2016).

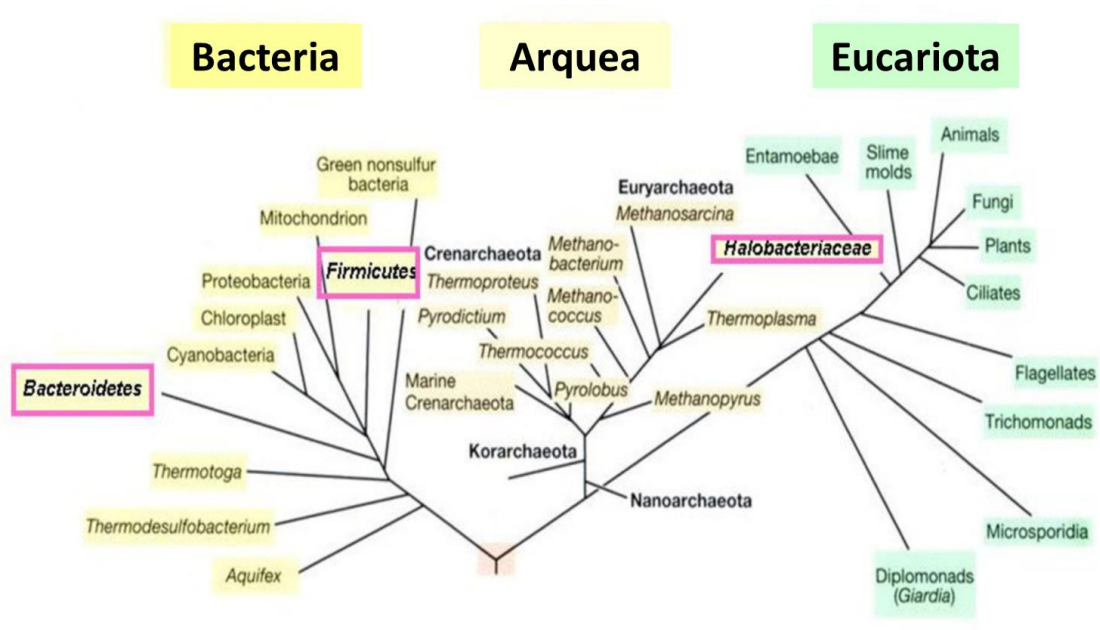


Figura 3.8. Distribución de los organismos que utilizan salt-in como estrategia única o principal de haloadaptación. Los grupos marcados poseen la menos una especie que utiliza dicha estrategia.

La acumulación de solutos compatibles se ha descrito como la otra estrategia principal de haloadaptación. Los solutos compatibles son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que las bacterias pueden acumular en su citoplasma en concentraciones del orden de 1 mol/kg de agua, que no interfieren con el metabolismo celular (Galinski, 1993; Pflüger y Müller, 2004).

Estas moléculas pueden ser azúcares, alcoholes, aminoácidos y ocasionalmente péptidos, así como derivados de alguna de estas familias químicas (Oren, 2008; Roberts, 2005). En general, los solutos compatibles que se han identificado en los dominios Eucariota y Bacteria son moléculas neutras o de tipo zwitterónico, un compuesto químicamente neutro diferentes que posee cargas formales positivas y negativas sobre átomos específicos, presentando carácter polar. Las Arqueas prefieren acumular solutos cargados negativamente, aunque algunas tienden a modificar a los mismos solutos neutros utilizados por los eucariotas y las bacterias, cargándolos negativamente (Roberts, 2005).

Tabla 3.2. Distribución de los solutos compatibles en procariotas (Empadinhas y Da Costa, 2008)

<b>Componente</b>	<b>Ocurrencia</b>
<b>Aminoácidos</b>	
N-Acetil- $\beta$ -lisina	Único de arqueas metanogénicas
N- $\delta$ -Acetil-ornitina	<i>Bacillus</i> spp., <i>Planococcus citreus</i> , <i>Sporosarcina halophila</i>
Ectoína e hidroxiectoína	Cepas de <i>Bacillus</i> halófilas y halotolerantes, <i>Ectothiorhodospira halochloris</i> , la mayoría de las proteobacterias halófilas, <i>Micrococcus</i> spp., <i>Marinococcus</i> spp., <i>Halobacillus halophilus</i>
$\alpha$ -Glutamato	<i>Petrotoga miotherma</i> , <i>P. mobilis</i> , <i>Aquifex pyrophilus</i> , <i>Halobacillus halophilus</i>
$\alpha$ -Glutamina	<i>Streptomyces</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Halobacillus halophilus</i>
$\beta$ -Glutamina	Metanógenos halófilos
Glicina betaína	Bacteria, Arquea, se presenta en los 3 dominios de la vida, en procariotas no suele ser sintetizado de novo
Prolina	<i>Streptomyces</i> , cepas de <i>Bacillus</i> halófilas y halotolerantes
<b>Azúcares</b>	
Sacarosa	<i>Anabaena</i> , <i>Synechosistis</i> , <i>Nitrosomonas europaea</i>
Trehalosa	<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rubrobacter xylanophilus</i>
<b>Fosfodiésteres</b>	
Di-myo-inositol fosfato	<i>Pyrococcus woesei</i> , <i>Aeropyrum</i> , <i>Aquifex</i> , <i>Archaeoglobus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Stetteria</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Thermotoga</i> , <i>Rubrobacter xylanophilus</i> , <i>Persephonella marina</i>
Di-manosil-di-mio-inositol fosfato	<i>Thermotoga</i> spp.
Gliceril-mio-inositol fosfato	<i>Aquifex pyrophilus</i> , <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
<b>Derivados del ácido glicérico</b>	
Manosilglicerato	<i>Thermus thermophilus</i> , <i>Rhodothermus marinus</i> , <i>Rubrobacter xylanophilus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Palaeococcus</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Archaeoglobus</i> , <i>Aeropyrum</i> , <i>Stetteria</i>
Manosilgliceramida	<i>Rhodothermus marinus</i>
Glucosilglicerato	<i>Agmenellum quadruplicatum</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> , <i>Persephonella marina</i>

Glucosil-(1,6)-glucosilglicerato	<i>Persephonella marina</i>
Manosil-(1,2)-glucosilglicerato	<i>Petrotoga miotherma</i>
<b>Poliol</b>	
Sorbitol	<i>Zymomonas mobilis</i>
Manitol	<i>Pseudomonas putida</i>
Glucosilglicerol	<i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> , <i>Synechocystis</i>

Los solutos compatibles pueden ser biosintetizados por las bacterias o pueden ser transportados desde el exterior hacia su citoplasma. Para la biosíntesis de solutos compatibles, se requiere que el organismo halófilo tenga acceso a los precursores del soluto compatible y además, que posea las enzimas necesarias para la ruta metabólica que lleva a la síntesis del soluto (Empadinhas y Da Costa, 2008). Cuando un organismo no cuenta con las rutas de biosíntesis para los solutos compatibles, debe entonces internalizarlos desde el entorno en que se encuentre. Algunos solutos pueden ser liberados cuando un organismo deja de estar viable y quedan disponibles para ser utilizados por otros organismos, ya sea como una fuente de carbono o para ser utilizados directa y nuevamente como un soluto compatible. De cualquier manera es necesario que el organismo que los va a utilizar cuente con algún mecanismo para su ingreso y para poder metabolizarlo (Empadinhas y Da Costa, 2008; Roberts, 2005).

Los solutos compatibles pueden ser utilizados por organismos de cualquiera de los 3 dominios filogenéticos como se muestra en la figura 3.9. En Arqueas halófilas, la acumulación de  $K^+$  sin que se acumule suficiente  $Cl^-$  genera un desbalance que puede ser contrarrestado por la acumulación de solutos compatibles con carga negativa. El más común es el  $\alpha$ -glutamato, seguido por glicerol, glicosil glicerol, betaína, glutaminas y prolina, que al pH fisiológico de la bacteria se encuentran cargados negativamente (Edbeib *et al.*, 2016; Empadinhas y Da Costa, 2008). En el dominio Eucariota en las plantas, la sacarosa es el principal osmoprotector, pero también acumula glicina betaína (Roberts, 2005); y en el caso de los hongos, algunos solutos compatibles encontrados son la alanina, la glutamina, la glicina betaína y la prolina (Empadinhas y Da Costa, 2008).



Se ha encontrado una amplia diversidad de solutos compatibles que son utilizados por organismos del dominio Bacteria, aunque los más comunes son la glicina betaína, la hidroxiectoína, la *N*- $\delta$ -acetil-ornitina, la sacarosa, la trehalosa, el sorbitol, el manitol y el glucosil glicerol. En la tabla 3.1 se encuentran listados los solutos compatibles encontrados más frecuentemente en procariontas (Empadinhas y Da Costa, 2008).

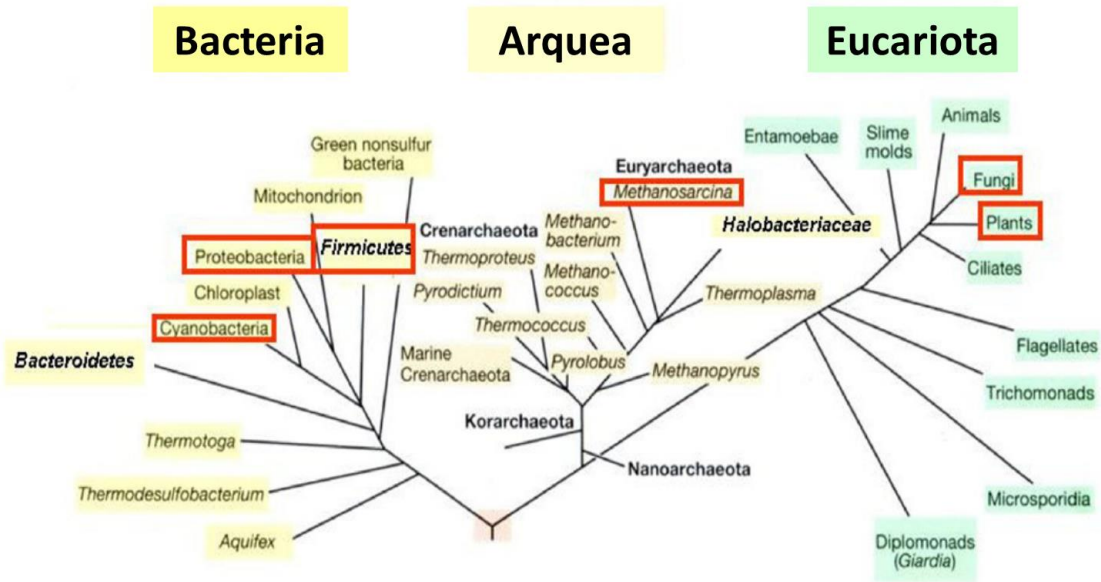


Figura 3.9. Distribución de los organismos que utilizan solutos compatibles como estrategia única o principal de haloadaptación. Los grupos marcados poseen al menos una especie que utiliza dicha estrategia.

Algunos organismos halófilos modifican las características y la composición de sus membranas y/o paredes celulares para soportar las altas concentraciones salinas. En algunas bacterias halófilas, se ha encontrado una mayor proporción de lípidos cargados negativamente respecto a los encontrados en los organismos mesófilos. Esto origina una membrana más compacta. En las bacterias que presentan una pared celular también se han detectado cambios en la composición de ésta encontrándose una mayor proporción de carbohidratos (Kogej *et al.*, 2006; Niemetz *et al.*, 1997; Smithies *et al.*, 2010; Vreeland *et al.*, 1984). En el caso de los hongos halófilos se ha encontrado un aumento en el tamaño de la pared celular, cambios en

la composición y morfología de crecimiento y aumento de la melanización (Kogej *et al.*, 2007, 2006; Kunčič *et al.*, 2010).

### 3.9. La bacteria *Salinibacter ruber*

*Salinibacter ruber* es una bacteria halófila extrema aislada de los estanques salinos de Alicante y de Mallorca en España. Sus células corresponden con bacilos móviles con dimensiones de 2-6 x 0.4  $\mu\text{m}$ . En agar, sus colonias presentan una coloración roja, son circulares, pequeñas, con diámetro de aproximadamente 1 mm y forma convexa. Presenta un crecimiento óptimo en un intervalo de temperatura de entre 37 a 47 °C y en un intervalo de pH de 6.5 a 8.0. El contenido de guanina y citocina (G+C) en su ADN es de 66.5%. La cepa modelo es la identificada como M31, la cual corresponde con el identificador 13855 en la colección alemana de microorganismos y cultivos de células (DSMZ, por *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*), la cual posee un cromosoma con 3.5 millones de pares de bases (Mbp) y un plásmido de 35 mil pares de bases (kpb) (Oren, 2013b).

La bacteria *Salinibacter ruber* fue la primera especie descrita dentro de un nuevo linaje de organismos halófilos extremos. Junto con la bacteria *Rhodothermus marinus*, fue inicialmente asociada al phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (Antón *et al.*, 2002), pero posteriormente con resultado de los trabajos realizados por Munoz y colaboradores (Munoz *et al.*, 2016) se reclasificó en un nuevo phylum denominado Rhodothermaeota (*incertae sedis*), que incluye 3 familias, Salinibacteraceae, Rhodothermaceae y Rubricoccaceae (Figura 3.10), del cual *S. ruber* pertenece a la familia Salinibacteraceae que incluye los géneros *Salinibacter* y *Salinivenus* (figura 3.11). El género *Salinibacter* ha sido identificado tanto con métodos dependientes como independientes del cultivo, lo que ha permitido determinar que *S. ruber* tiene una distribución mundial, ya que se le ha encontrado no sólo en lagos salinos de España, sino también en el lago Tuz en Turquía, en los Lagos Alcalinos (pH entre 9 y 11) en Egipto, en las Maras andinas de Perú (Antón *et al.*, 2008). En el 2011 se aisló a la nueva especie *Salinibacter altiplanensis* en ambientes hipersalinos del altiplano argentino (Viver *et al.*, 2018) (Figura 3.11). En México se identificó la presencia *S. ruber* en lagos salinos en Guerrero Negro, Baja California y una bacteria con un 96% de similaridad con el género *Salinibacter* en

biopelículas que han colonizado monumentos mayas en Uxal; en ambos casos la presencia de estas bacterias se identificó por la presencia del gen rRNA 16s (Antón *et al.*, 2008)

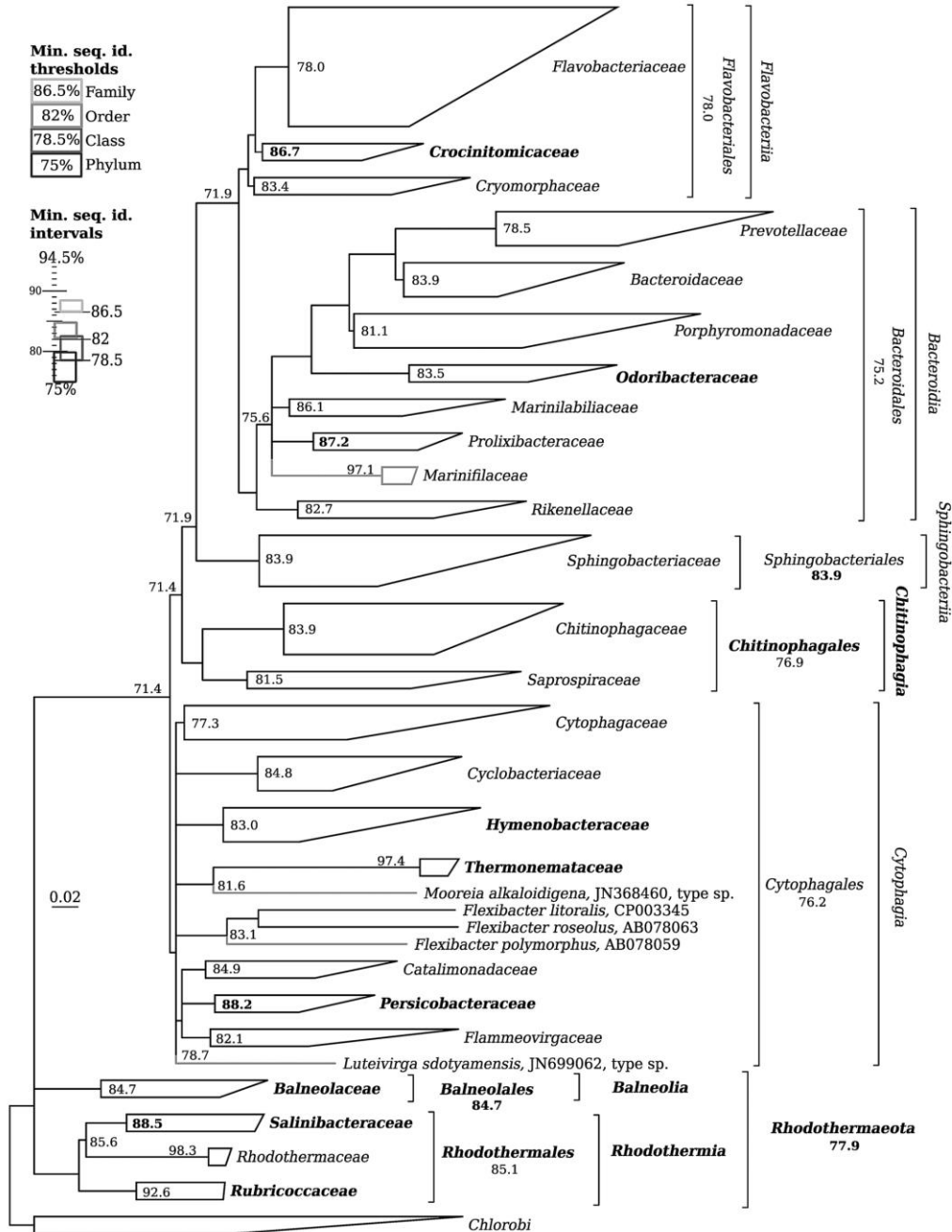


Figura 3.10. Filogenia los phyla Bacteroidetes y Rhodothermaeota propuesta por Munoz *et al.*, 2016. Árbol consenso del gen 16S de miembros del phylum Bacteroidetes y phyla relacionados, resultado de compilar seis árboles resultantes, tres por el método de unión de vecinos (neighbor-joining) y tres por RaxML.

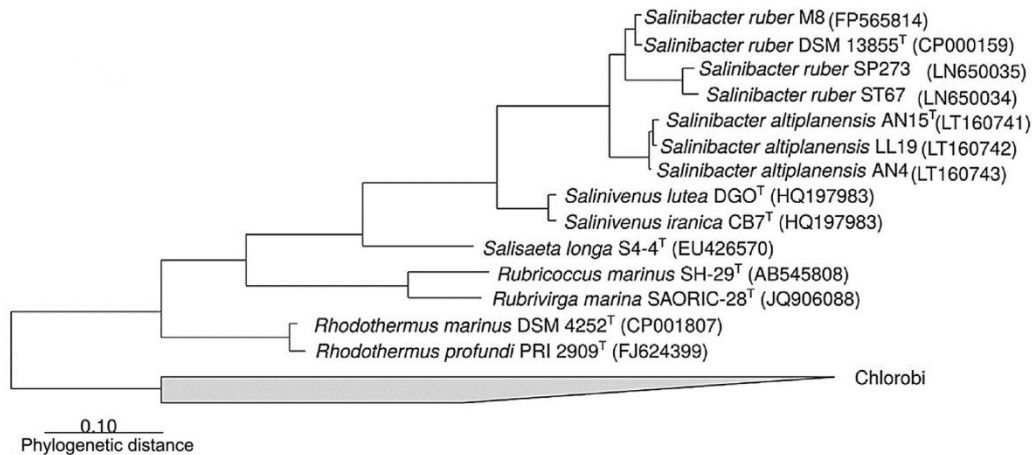


Figura 3.11. Filogenia de la familia Salinibacteraceae propuesta por Viver *et al.*, 2018. Árbol consenso del gen 16S basado en el método de unión de vecinos (neighbor-joining).

*Salinibacter ruber* posee similitudes con halófilas del dominio Arquea con las que comparte el mismo hábitat; son aeróbicas, heterótrofas y poseen carotenoides que le dan una coloración rojo-rosado. Además acumulan altas concentraciones de potasio intracelularmente y poseen una alta proporción de aminoácidos ácidos y pocos aminoácidos hidrofóbicos en su proteoma con un punto isoelectrico medio de 5.2 (Mongodin *et al.*, 2005; Oren *et al.*, 2002).

Las bacterias halófilas generalmente utilizan solutos compatibles para generar, en su citoplasma, la presión osmótica en el citoplasma necesaria para contrarrestar la presión osmótica impuesta por el medio externo que contiene una alta concentración salina. En el caso específico de *Salinibacter ruber*, esta bacteria halófila extrema utiliza como principal estrategia para contender contra la presión osmótica externa, la acumulación intracelular de iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (Oren, 2013b). Por esta razón, las enzimas de *S. ruber* están adaptadas para funcionar en altas concentraciones salinas presentando, cambios en la proporción de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos característicos del dominio Arquea (Oren *et al.*, 2002). No se ha identificado el mecanismo exacto de entrada de los iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en *S. ruber*. Sin embargo, su genoma

sugiere que la toma del catión potasio ( $K^+$ ) ocurre por medio de una tropomiosina receptor cinasa A, que se cree surgió a partir de un evento de transferencia horizontal de genes (Edbeib *et al.*, 2016). La tropomiosina receptor cinasa A es una proteína de membrana orientada hacia el citoplasma que se une a NADH y  $NAD^+$ , y la subunidad de translocación que abarca la membrana es esencial para el transporte activo; en *S. ruber* se presentan dos copias de este gen (Edbeib *et al.*, 2016). El ión cloruro ( $Cl^-$ ) lo importa a través de la bomba de cloruro-rodopsina, una proteína para la que hay cuatro copias en el genoma de *S. ruber*, de las cuales, la tercera copia traduciría para la bomba de  $Cl^-$ . También hay dos copias del cotransportador Na-K/Cl que ha sido encontrado en eucariontes y que podría ingresar cloruro en *S. ruber* (Edbeib *et al.*, 2016).

Aunque la principal estrategia de haloadaptación de *S. ruber* es el mecanismo de *salt-in*, Oren y colaboradores (Oren *et al.*, 2002) encontraron que bajas concentraciones de glutamato, de glicina, de betaína y de Na-acetil lisina pueden también contribuir a su haloadaptación. En el grupo de trabajo en el que participo se encontró que *S. ruber* puede acumular hasta 9.5  $\mu g$  de betaína/mg de biomasa cuando se hace crecer en medios modificados con NaCl y 11.54  $\mu g$  de betaína/mg de biomasa cuando los medios se modifican con  $MgSO_4$ . Además, en condiciones de estrés por disminución de la concentración salina en el medio, se identificó la sobreexpresión de las proteínas tRNA aspartato ligasa, el factor de elongación EF-TU y la proteína L21, todas asociadas a procesos de síntesis de proteínas, así como de la chaperona GroEL-GroES, implicada en el plegamiento de proteínas (Miranda, 2015).

### **3.10 La chaperona GroEL-GroES**

Muchos procesos celulares dependen del correcto funcionamiento de las proteínas, el cual a su vez, depende de la estructura tridimensional que adopten esas proteínas. Aunque prácticamente todas las proteínas mantienen su estructura funcional y son estables en las condiciones fisiológicas celulares, cualquier pequeño cambio en las condiciones celulares puede implicar la desnaturalización y en consecuencia la pérdida de su función (Kim *et al.*, 2013). En las células, estos problemas se enfrentan con un conjunto de proteínas específicas denominadas chaperonas, cuyo sustrato son precisamente las proteínas desnaturalizadas, entre cuyas funciones se encuentra el asegurar su correcto plegamiento (Weaver *et al.*, 2014). Se han caracterizado distintas chaperonas como la Hsp70, la Hsp90 y Hsp60, que son

proteínas que previenen el desplegamiento y promueven el plegamiento de proteínas desnaturalizadas al reconocer a los aminoácidos hidrofóbicos expuestos en estas proteínas desnaturalizadas y median el correcto plegamiento en un proceso dependiente de ATP (Hayer-Hartl *et al.*, 2016; Sterner y Liebl, 2001).

La chaperona de estrés de choque térmico identificada como Hsp60, también conocida como chaperonina, GroEL en *E. coli*, Hsp60 en mitocondria y subunidad de rubisco de unión a proteínas en el cloroplasto, es un intermediario en el plegamiento proteínas. Se trata de complejos con un elevado peso molecular mayores a 800 mil Daltons (kDa) con actividad ATPasa, que requieren de la presencia del catión magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y de la presencia de su cofactor, la proteína GroES (Langer *et al.*, 1992; Sterner y Liebl, 2001).

La información recopilada mediante análisis por microscopía electrónica y a través de modelos cristalográficos han permitido determinar que el complejo GroEL-GroES se organiza en dos anillos heptaméricos formado, cada uno, por 7 monómeros de 57 kDa (Figura 3.12 B y E). En cada monómero se reconocen tres dominios: el ecuatorial de unión a adenosin trifosfato (ATP), ubicado entre los residuos 6-133 a 409-523, el dominio intermedio que va de los residuos 134-190 a 377-408 y el dominio apical, que se encuentra entre los residuos 191 a 376 (Figura 3.12 A). En la forma activa de la proteína (Figura 3.12 D, E y F), el dominio apical de GroEL se une a los sustratos proteicos y a GroES (Figura 3.12 D). En el extremo carboxilo terminal de GroEL los 23 residuos de aminoácidos finales presentan una secuencia de repeticiones Gly-Gly-Met y este extremo sobresale del dominio ecuatorial cuando se forma la cavidad (Figura 5.12 F), lo cual impide el libre paso del sustrato entre las cavidades. El dominio ecuatorial permite que ocurran los contactos intra-anillo (monómeros formando un anillo heptamérico) e inter-anillo (dos anillos heptaméricos formando el complejo proteico) entre las dos subunidades (Figura 3.12 B y E). El dominio apical forma la entrada al anillo y presenta un cambio conformacional, transmitido desde el dominio ecuatorial, cuando se da la hidrólisis de ATP (Figura 3.12 D) (Hayer-Hartl *et al.*, 2016).

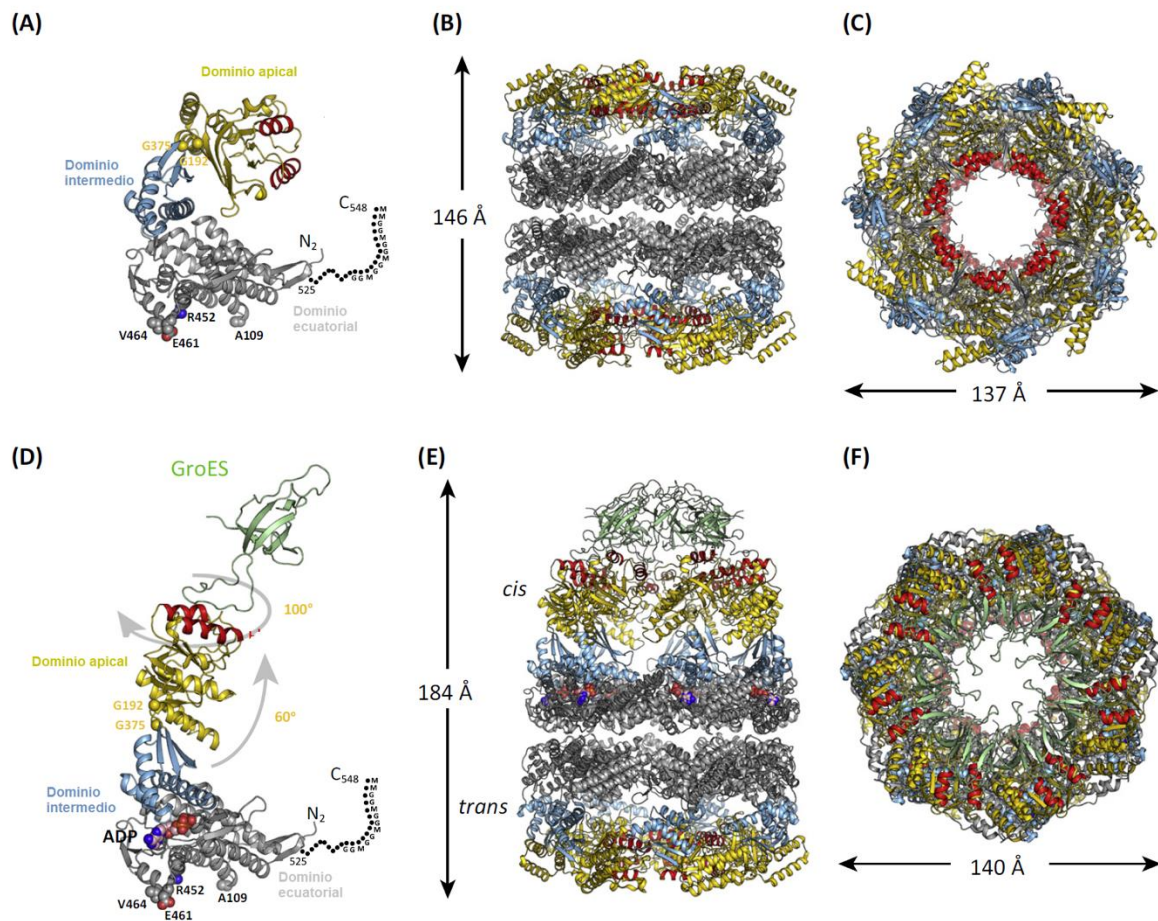


Figura 3.12. Estructura de GroEL de *Escherichia coli* (código PDB 1SS8) en sus distintas conformaciones. Los dominios apical, intermedio y ecuatorial se indican en oro, azul y gris respectivamente. A: Monómero de GroEL inactivo. B y C: Complejo proteico inactivo y dimensiones. D: Monómero de GroEL activo. E y F: Complejo proteico activo y dimensiones. (Hayer-Hartl et al., 2016)

La chaperona GroEL, está asociada a procesos de termotolerancia adquirida ya que previene la agregación de proteínas que han perdido su estructura después de ser expuesta a altas temperaturas. La expresión de GroEL es inducida cuando se presenta esta condición de estrés (Sternier y Liebl, 2001). En los organismos termófilos e hipertermófilos, el complejo Hsp60 se conoce como termosoma y se ha encontrado en organismos como *Thermoplasma acidophilum*, *Pyrodictium occultum*, *Prodictium brockii*, *Pyrococcus* sp., *Methanococcus*

*jannashii*, *Methanopyrus kandleri*, *Sulfolobus solfataricus* y *Thermococcus* sp. (Sterner y Liebl, 2001; Trent, 2000).

### **3.11 Técnicas de análisis y caracterización**

#### **3.11.1 Cinéticas de crecimiento bacteriano**

Una gráfica de crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo de estudio. Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada. En la gráfica de crecimiento se diferencian cuatro fases, la de latencia, la de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular como se muestra en la Figura 3.13 ( Stanier *et al.*, 1992). En la fase de latencia, las células trasferidas a un medio de cultivo fresco experimentan un cambio de composición química antes de ser capaces de iniciar su crecimiento. Posteriormente viene la fase exponencial, que describe un crecimiento equilibrado e imita una reacción auto catalítica de primer grado, es decir, la velocidad del aumento en el número o masa celular de bacterias es proporcional a un intervalo de tiempo determinado. La velocidad de aumento de las células, o constante de proporcionalidad, representada por  $\mu$ , se denomina velocidad específica de crecimiento. Este valor es proporcional al crecimiento de diferentes componentes del cultivo, incluyendo el número de células por mililitro, la masa celular por mililitro o cualquier otro componente celular como la presencia de proteínas o metabolitos asociados al crecimiento en el organismo de interés. Este parámetro es suficiente para definir la velocidad de crecimiento de un cultivo bacteriano, sin embargo también se utilizan a menudo otros parametros como el tiempo de duplicación promedio ( $t_D$ ) que se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un valor de 2 (Stanier *et al.*, 1992).



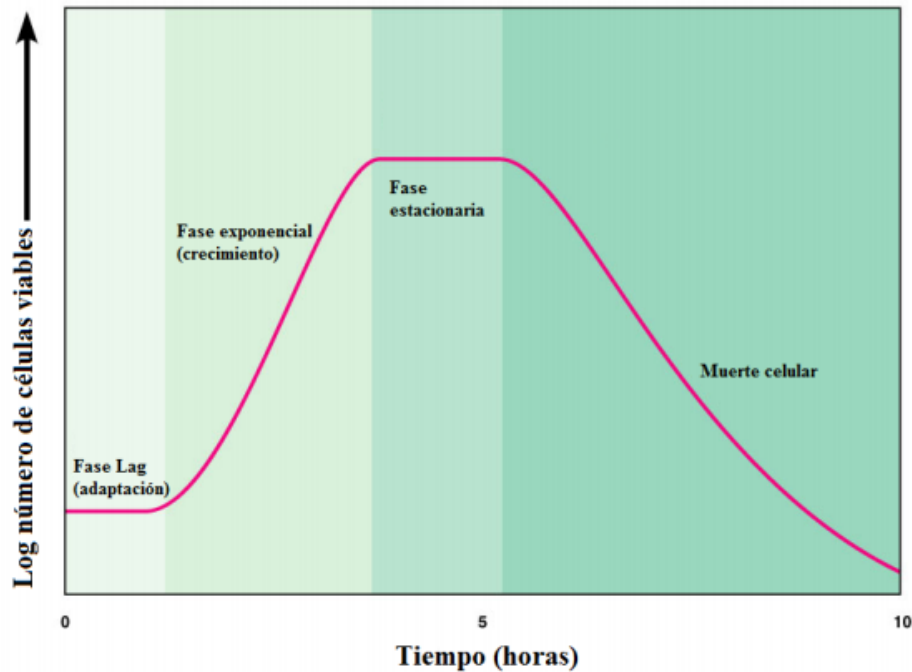


Figura 3.13. Cinética general de crecimiento de un cultivo bacteriano. Se observan las cuatro fases principales (Izquierdo, 2019).

Tanto la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) como el tiempo de duplicación ( $t_D$ ) describen adecuadamente al crecimiento exponencial en un cultivo bacteriano, sin embargo, las poblaciones microbianas raramente mantienen un crecimiento a altas velocidades durante largos periodos de tiempo. El crecimiento bacteriano está limitado por el agotamiento de los nutrientes disponibles o por la acumulación de productos tóxicos generados por el metabolismo del organismo, lo que va provocando una disminución en  $\mu$  hasta el punto en que su valor no cambia o cambia muy poco y se llega entonces a la fase estacionaria. La transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un periodo de crecimiento desequilibrado en el que los componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades y típicamente las células que llegan a este estadio poseen una composición química diferente a la de las células de la fase exponencial (Stanier *et al.*, 1992).

La última fase es la de muerte celular y se presenta debido a que las células bacterianas se encuentran en un estado en el que el crecimiento es nulo o no existe y se van agotando hasta morir. Esta fase se puede describir también con una función exponencial. La velocidad de muerte es variable ya que depende del organismo en estudio y del ambiente en el que se encuentre (Stanier *et al.*, 1992).

### **3.11.2 Dispersión en matriz de fase sólida**

La técnica de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es una técnica de extracción que se basa en el uso de adsorbentes sólidos para separar, con ayuda de un disolvente, moléculas de interés desde la matriz analítica en la que se encuentran. Las moléculas de interés se denominan analitos. La técnica de DMFS puede utilizarse también para aumentar la pureza de los analitos ya separados o extraídos, realizando nuevamente el mismo procedimiento. Esta técnica fue desarrollada por Barker y colaboradores en 1989 (Barker, 2007). La DMFS consiste en mezclar a la matriz en la que está contenido el o los analitos de interés, con un adsorbente adecuado en la proporción adecuada. Esta mezcla se homogeneiza utilizando un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, la mezcla homogénea se empaca en una pequeña columna de polipropileno a la que se coloca en el fondo, un filtro de celulosa que ayuda a evitar la pérdida del material homogeneizado. Para realizar la elución de los analitos de interés, se adiciona desde la parte superior de la columna, el disolvente o la mezcla de disolventes apropiados, mismos que van eluyendo por gravedad al tiempo que van ocurriendo interferencias selectivas entre la fase sólida y la fase líquida, que facilitan la separación de las moléculas de interés (Figura 3.14) (Vásquez, 2015).

La DMFS es una técnica amigable con el medio ambiente ya que disminuye considerablemente el consumo de reactivos y disolvente respecto a otras las técnicas de extracción que usan una gran cantidad de disolventes de difícil disposición posterior. Esto reduce los gastos e impactos ambientales implicados en el confinación y disposición final de los disolventes y reactivos utilizados (Vásquez, 2015)



Figura 3.14. Etapas principales de una extracción por dispersión de matriz en fase sólida

En el grupo de investigación en el que participo, se desarrolló un protocolo basado en esta técnica de extracción, el cual permite extraer los solutos compatibles acumulados en el citoplasma bacteriano.

### 3.11.3 Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica cuyo fundamento de operación se basa en las interacciones magnéticas de los núcleos atómicos con un campo magnético externo, brindando información molecular con resolución atómica (Amero, 2014).

Los núcleos atómicos que tienen un número impar de electrones presentan un espín o una dirección de giro (Deleanu y Paré, 1997). Cuando se introducen núcleos atómicos con espín nuclear distinto de cero a un campo magnético externo, cada núcleo se comporta como un pequeño imán que tiende a orientarse a favor de la dirección del campo magnético o en contra de la dirección de éste. (del Río Portilla, 2003).

En la resonancia magnética nuclear, se busca medir la frecuencia de precesión de cada núcleo químicamente distinto en la muestra. Para esto se utiliza una bobina como detector que va sensando las frecuencias de precesión en función del tiempo. A esta señal, se le aplica una

transformada de Fourier y así se obtiene la señal del espectro de resonancia para un tipo de protón específico. (Amero, 2014; Skoog *et al.*, 1997)

Tabla 3.3 Algunos de los núcleos activos en Resonancia Magnética Nuclear (Skoog, 1975).

Núcleo	Espín nuclear	Frecuencia de observación (MHz) a 14.1 Teslas	Abundancia natural (%)	Constante giromagnética $\gamma$ (C·kg <sup>-1</sup> )
<sup>1</sup> H	½	600.00	99.99	26.76
<sup>13</sup> C	½	150.86	1.10	6.73
<sup>15</sup> N	-½	60.82	0.37	-2.71
<sup>19</sup> F	½	564.62	100.00	25.18
<sup>31</sup> P	½	242.86	100.00	10.84

Un espectro de resonancia magnética nuclear muestra el desplazamiento químico asociado a un tipo de protón específico en unidades de partes por millón (ppm). Esta señal tiene una multiplicidad específica definida por el número de protones activos y vecinos a un protón específico. El área bajo la curva de cada señal permite hacer aproximaciones cuantitativas que está directamente relacionada con el número de protones activos. (Skoog *et al.*, 1997).

Como los campos son únicos o altamente característicos de los compuestos individuales, en la práctica moderna de la química orgánica, la espectroscopia de RMN es el método definitivo para identificar compuestos orgánicos monomoleculares. Además de la identificación, la espectroscopia de RMN proporciona información detallada sobre la estructura, la dinámica, el estado de reacción y el entorno químico de las moléculas. Los tipos más comunes de RMN son la espectroscopia de RMN de protones y carbono-13, pero es aplicable a cualquier tipo de muestra que contenga núcleos que posean espín. Actualmente la resonancia magnética nuclear, posee múltiples aplicaciones en campos como la industria alimenticia, la química orgánica, el estudio de moléculas bioquímicas como las proteínas y hasta en estudio de estado sólido como es el caso de sus aplicaciones para ver tejidos y órganos en medicina; por lo que

se posiciona como una técnica espectroscópica de suma importancia (Amero, 2014; Deleanu y Paré, 1997; Pebet, 2004).

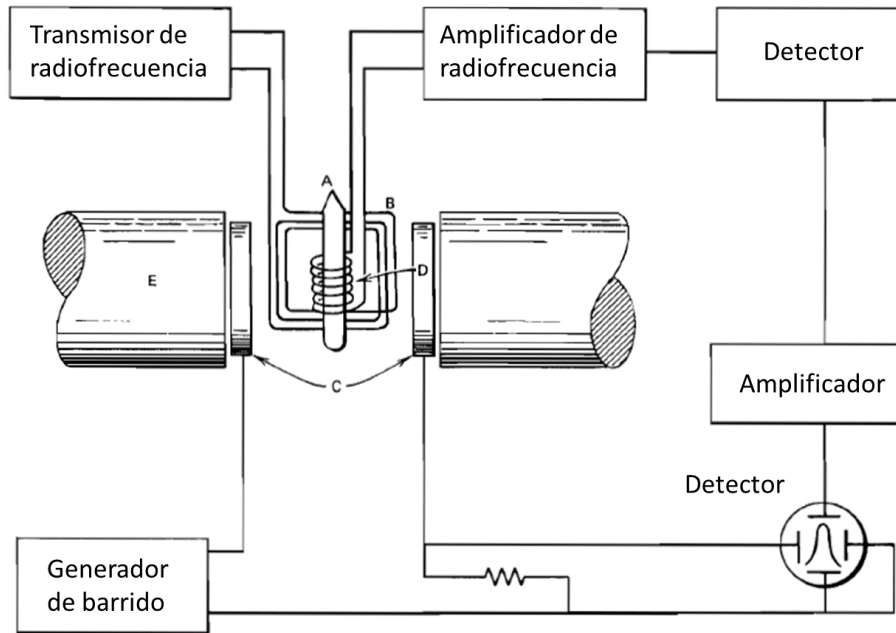


Figura 3.15. Representación de un equipo de resonancia magnética nuclear. El tubo es perpendicular al eje z del imán. A: tubo de muestra. B: bobina del transmisor. C: bobinas de barrido. D: bobina del receptor. E: imán (Silvernstein, 2005).

### 3.11.4 Métodos cromatográficos

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes que se han de separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida. Es utilizada tanto a escalas de laboratorio como industriales. Bajo el término de cromatografía se agrupan varios métodos que pueden ser clasificados atendiendo a diferentes criterios como el tipo de fase estacionaria utilizada, como por ejemplo la cromatografía de capa fina o la cromatografía en columna, el estado de agregación de las fases participantes como lo son la cromatografía gaseosa, o la cromatografía de fluidos supercríticos. En todos los casos la separación de los

analitos de interés se logra por su interacción diferenciada entre la fase estacionaria y la fase móvil (Skoog, 1975).

Algunas técnicas cromatográficas han encontrado aplicaciones en áreas como la Bioquímica, en donde interesa aislar macromoléculas como aminoácidos, lípidos, carbohidratos o proteínas. Para la separación de péptidos y de proteínas de una muestra, la técnica más utilizada es la cromatografía sólido-líquido, donde la fase estacionaria es un polímero contenido en una columna y la fase móvil es un líquido o mezcla de líquidos cuya polaridad puede ir en aumento si se trata de una cromatografía en fase reversa o puede ir disminuyendo si se trata más bien de una cromatografía en fase normal. Desde hace algunos años, este tipo de cromatografía se ha sistematizado dando origen a la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAF), incorporándole no sólo un sistema automatizado de introducción de la muestra sino también un sistema de detección que puede estar basado en la absorción o emisión de radiación ultravioleta-visible, o en la emisión de fluorescencia (Padrón, 2014; Peterson y Sober, 1956).

Entre los métodos de CLAF más comúnmente utilizados en aplicaciones bioquímicas se encuentran:

- La cromatografía de exclusión molecular, conocida también como filtración en gel. En este tipo de cromatografía la separación de los analitos de interés ocurre en función al tamaño de las moléculas presentes en la mezcla. La columna cromatográfica se rellena con partículas de gel que exhiben un intervalo de tamaño de poro, que típicamente va de 130 a 2,000 angstroms (Å). La separación ocurre porque las moléculas cuya dimensión es menor al poro del gel pueden penetrar más fácilmente en los poros y permanecer ahí durante más tiempo, mientras que las moléculas cuyo tamaño es mayor al poro tienen un acceso restringido a este y tienden a permanecer en la fase móvil y ser arrastradas por ella. Por tanto, las moléculas grandes eluyen más rápidamente respecto a las moléculas más pequeñas (Ackers, 1970; Padrón, 2014).

- La cromatografía de intercambio iónico que es otro tipo de cromatografía que utiliza como fase estacionaria un polímero conocido como intercambiador iónico, que posee grupos funcionales que pueden mantener una carga neta positiva o negativa. La separación ocurre debido a la afinidad iónica de los componentes de la muestra a separar que tienen una carga opuesta a la carga neta de la columna. Para realizar la elución de los componentes adheridos a la fase estacionaria es necesario hacer pasar una disolución salina junto con la fase móvil, que se mueve en una dirección definida y va separando la muestra mediante el desplazamiento gradual del soluto generado por el contraión presente en la fase móvil, lo cual genera la liberación del soluto y le permite su tránsito por la columna para finalmente ser recuperado.
- La cromatografía de interacciones hidrofóbicas se basa en diferencias en la naturaleza hidrofóbica de grupos localizados en la superficie de las moléculas a separar. Este método es utilizado principalmente para la purificación de macromoléculas biológicas, especialmente para proteínas. Para ello se induce la interacción hidrofóbica de las proteínas con una resina débilmente hidrofóbica, adicionando altas concentraciones de sales en una disolución amortiguadora inicial, generando una interacción reversible entre la superficie hidrofóbica de una proteína y una matriz cromatográfica con un ligando hidrofóbico a moderadamente altas concentraciones de sal, como el sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Este tipo de sales tiene alta polaridad y se unen fuertemente al agua, lo cual induce la exclusión del agua sobre la proteína y la superficie del ligando lo que promueve las interacciones hidrofóbicas y la precipitación de la proteína. El efecto es similar al que se logra cuando se tiene una disolución de proteínas y estas precipitan por adición de sales. (Padrón, 2014; Queiroz *et al.*, 2001).
- La cromatografía de afinidad que se caracteriza por una elevada especificidad de la interacción entre el compuesto que se desea separar y un ligando presente en la fase estacionaria. Puede realizarse, por ejemplo, propiciando interacciones entre un anticuerpo y su antígeno (inmunocromatografía), entre una enzima específica y su inhibidor o entre una proteína específica y su receptor. Un tipo específico de cromatografía de afinidad se basa en la interacción de algún compuesto químico capaz de formar quelatos con iones metálicos divalentes como Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y otros. Este método se utiliza

frecuentemente para separar proteínas, principalmente aquellas que poseen varias histidinas en su secuencia. En algunos casos, se puede añadir una cola de 4 o 6 histidinas en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de proteínas recombinantes incrementando considerablemente la afinidad, y por tanto, la eficacia en la separación, logrando con ello un alto grado de pureza en un solo paso (Padrón, 2014).

Estas técnicas son comúnmente utilizadas para la purificación de proteínas, lo que permite estudiar otras características de las proteínas como su estructura, actividad enzimática, respuesta a diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad, presencia de inhibidores, entre otras.

### **3.11.5 Cristalografía de rayos X**

Las proteínas son moléculas fundamentales en el funcionamiento de todos los seres vivos ya que participan en el reconocimiento molecular, en el transporte de moléculas hacia el interior de la célula, tiene una función estructural, participan en la catálisis de algunas reacciones químicas de los seres vivos, e inclusive en la regulación de la expresión de los genes. Sin embargo, debido a su alta variabilidad no se conoce aún el mecanismo de acción de la mayoría ellas. A pesar de los avances en los factores que determinan la estabilidad de la estructura nativa de las proteínas, no es posible aun predecir la estructura tridimensional de alguna proteína a partir de su secuencia primaria de aminoácidos y más aún, no es posible predecir su función de manera universal y sin ambigüedad (González *et al.*, 2005).

La cristalografía de rayos X es una técnica que permite determinar la estructura tridimensional de proteínas, ácidos nucleicos e inclusive de virus o ribosomas (McPherson, 2014) la técnica se basa en la irradiación, con rayos x, una de las regiones del espectro electromagnético, un cristal de la molécula de estudio (Smyth y Martin, 2000). La estructura de la proteína se deduce a partir del patrón de dispersión que se genera cuando existe esta interacción de los rayos X con el cristal. Esto es posible gracias a que los átomos que están formando al cristal poseen un orden específico que permite la existencia de unidades estructurales pequeñas que poseen arreglos atómicos semejantes y que se repiten ordenadamente formando una estructura tridimensional. El patrón de difracción depende de este arreglo (Lawrence, 1968).



Para hacer cristalografía de rayos X es fundamental contar con un cristal que difracte. En el caso de los cristales de proteínas, la proteína de interés puede provenir directamente del organismo que la produce o se puede obtener a partir de un proceso de generación de proteínas recombinantes. Una vez que se tiene la proteína de interés se desarrolla un protocolo de purificación que llevará a la obtención de una proteína homogénea, es decir que no se encuentre agrupada en complejos de diferente número de monómeros, y de buena calidad (Smith, 2000), con la que se puede iniciar el proceso de cristalización, la cual puede ocurrir básicamente en dos etapas. La primera es la identificación de las condiciones químicas, bioquímicas y físicas que favorezcan el proceso de cristalización de la proteína. La segunda consiste en la optimización del proceso de cristalización, la cual se logra modificando sistemáticamente aquellas condiciones en las que se obtienen cristales. En esta etapa se busca incrementar el número de cristales óptimos que puedan ser utilizados en el proceso de difracción (Mcpherson, 2014).

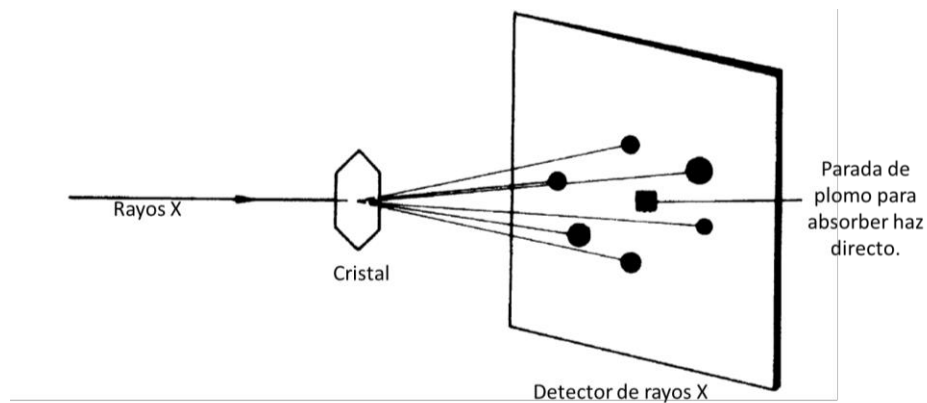


Figura 3.16. Representación de la obtención de un patrón de difracción partir de un cristal (Ladd y Palmer, 2003)

El proceso de difracción, esquematizado en la figura 3.16, consiste en exponer el cristal a una fuente de rayos X proveniente de un ánodo rotatorio o de un sincrotrón. El haz atraviesa al cristal, por lo que se difracta la radiación electromagnética. Un experimento de difracción de rayos X, involucra la medición de un gran número de reflexiones. Cada una de estas reflexiones se mide la mayor cantidad de veces posibles, con la intención de disminuir el error de la

medición. Al final se obtiene un promedio de las intensidades de cada reflexión medida. Cada reflexión se caracteriza por su amplitud y su fase.

El proceso para resolver una estructura comienza con la indexación y con la integración, es decir se asigna una posición espacial y una intensidad relativa a cada una de las reflexiones. Posteriormente se resuelven las fases, en la mayoría de los casos mediante un remplazo molecular. Este consiste en utilizar un modelo estructuralmente parecido a la proteína de estudio. Las fases de este modelo similar son usadas como fases iniciales para la reconstrucción del mapa de densidad electrónica. Una vez que se obtiene el mapa de densidad electrónica, se genera un modelo atómico basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína en el que se justifica cada una de las densidades electrónicas obtenidas. Por último, se hacen afinamientos para que el modelo tridimensional represente completamente la densidad electrónica obtenida (Ladd *et al.*, 2003; Smyth y Martin, 2000; Wlodawer *et al.*, 2013).

## 4. HIPÓTESIS

La bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* se adapta a las condiciones de estrés salino originadas por las sales sulfatadas presentes en el océano de agua líquida del satélite Europa utilizando solutos compatibles y proteínas específicas, como estrategias de haloadaptación.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Estudiar la haloadaptación de *Salinibacter ruber* ante condiciones que simulan el entorno salino del océano del satélite Europa.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de *S. ruber* en medios modificados con NaCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y con combinaciones de MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en proporciones 1:1 y 2:1 para identificar, en cada caso, la concentración de óptimo crecimiento.
- Determinar si *S. ruber* acumula al soluto compatible betaína en los medios modificados con la concentración salina de óptimo crecimiento y el papel de este soluto compatible en la velocidad específica de crecimiento.
- Generar un sistema de expresión heterólogo de la proteína GroEL de *S. ruber*, una de las principales proteínas implicadas en su proceso de haloadaptación.
- Desarrollar un protocolo de purificación para la proteína recombinante GroEL de *S. ruber*.
- Evaluar el potencial de habitabilidad del océano de agua líquida salada del satélite Europa, considerando a *S. ruber* como modelo biológico.

## 6. MÉTODOS Y MATERIALES

### 6.1. Activación de *Salinibacter ruber*

La activación se realizó a partir de una pastilla de bacteria liofilizada de la cepa 13855 (DSM No. 13855). Esta se inoculó en 100 mL del medio de cultivo nominal DSMZ 936 (195 g de NaCl, 34.6 g de  $MgCl_2 \times 6H_2O$ , 49.5 g de  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 1.25 g de  $CaCl_2 \times 2H_2O$ , 5.0 g de KCl, 0.25 g de  $NaHCO_3$ , 0.625g de NaBr y 1.0 g de extracto de levadura). La totalidad de la bacteria liofilizada se colocó en el medio de cultivo estéril y se incubó a una temperatura de 37 °C en un agitador orbital (ISO-45, Lumistell) a una velocidad de agitación de 150 rpm durante 14 días constatando visualmente y espectroscópicamente que había crecimiento bacteriano.

### 6.2. Cinéticas de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de *Salinibacter ruber* en los medios modificados con las sales de interés astrobiológico, se realizaron cinéticas de crecimiento. Se realizó un preinóculo sembrando a *S. ruber* activada en 75.0 mL del medio nominal DSMZ 936, el cual se colocó en el agitador orbital a 150 rpm y 37°C hasta alcanzar un valor de densidad óptica medida a 630 nm ( $D_{630}$ ) de 0.30, la cual corresponde a la mitad de la fase exponencial de la bacteria.

Cada uno de los medios modificados se prepararon con 34.6 g de  $MgCl_2 \times 6H_2O$ , 1.25 g  $CaCl_2 \times 2H_2O$ , 5.0 g KCl, 0.25 g  $NaHCO_3$ , 0.625g NaBr y 1.0 g de extracto de levadura y las concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) y sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ ) especificadas en la Tabla 6.1. Todos los medios modificados se prepararon en un litro de agua destilada. La Tabla 6.1 describe la concentración, de cada una de las sales mostradas, en cada medio modificado. Como puede observarse, una concentración salina se mantiene constante, mientras que al menos otra u otras dos se modifican. El término condición salina corresponde con la sal cuya concentración se modifica a partir del medio nominal. La concentración indicada corresponde con la concentración a la que se encuentra esa sal, lo mismo sucede cuando se muestran dos sales. Por ejemplo, la condición salina  $MgSO_4$  1.0 M, significa que lo único que cambia en el medio nominal es la concentración de  $MgSO_4$ , la cual se encuentra en un valor de 1.0 M. Por otro lado, la condición salina 2  $MgSO_4$ : $Na_2SO_4$  1.5 M, significa que a partir del medio nominal, solo se están modificando las concentraciones de

MgSO<sub>4</sub> y de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que en este caso se encuentran en una proporción molar 2:1 y la concentración indicada (1.5 M) implica la suma de las concentraciones molares individuales.

Tabla 6.1. Concentraciones molares (M) para cada uno de los medios modificados en los que se evaluó el crecimiento de *Salinibacter ruber*

Condición salina	NaCl (M)	MgSO <sub>4</sub> (M)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M)
NaCl 2.2 M	2.2	0.2	0
NaCl 3.3 M	3.3	0.2	0
NaCl 4.4 M	4.4	0.2	0
MgSO <sub>4</sub> 0.0 M	1.7	0	0
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	1.7	0.5	0
MgSO <sub>4</sub> 1.0 M	1.7	1.0	0
MgSO <sub>4</sub> 1.5 M	1.7	1.5	0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0 M	1.7	0	0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	1.7	0	0.5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	1.7	0	1.0
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0 M	1.7	0	0
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	1.7	0.25	0.25
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	1.7	0.5	0.5
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	1.7	0.625	0.125
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	1.7	0.75	0.25
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.5 M	1.7	1.0	0.5

Para realizar las cinéticas se utilizaron 5.0 mL de preinóculo bacteriano que se adicionaron a 100 mL de cada medio modificado, contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Las condiciones de crecimiento fueron 37 °C y 150 rpm. En todos los casos se monitorearon los cambios en la D. O.<sub>630</sub> en intervalos de 12 horas hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, identificada como el cambio mínimo o nulo en la densidad óptica de los cultivos en tres mediciones consecutivas. Las lecturas de D. O.<sub>630</sub> se realizaron con ayuda de un

espectrofotómetro UV-Vis (Cary 8454 UV-Vis, Agilent Tech). Todas las condiciones experimentales se realizaron por triplicado.

Los parámetros cinéticos utilizados para evaluar el crecimiento bacteriano son la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $T_D$ ). Para obtener el valor de  $\mu$  en cada una de las condiciones experimentales evaluadas es necesario graficar los valores de Ln D.O.<sub>630</sub> correspondientes a la fase exponencial de crecimiento, en función del tiempo. A estos datos se les realiza un ajuste lineal por el método de mínimos cuadrados, del que resulta una ecuación. La pendiente de esta ecuación corresponde a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Una vez que se conoce este parámetro, se puede calcular el tiempo de duplicación utilizando la siguiente ecuación:

$$T_D = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

A cada medio modificado se le midió el valor de actividad del agua ( $a_w$ ) utilizando un higrómetro de rocío (3TE, *Aqualab*). Además, se calculó la osmolaridad de cada medio utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Osmolaridad} = \frac{\text{Número de iones}}{\text{Moles de disolvente}} \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Los valores para el número de iones y el número de moles del disolvente se obtienen a partir de la composición de cada medio (Tabla 6.1).

Los valores de  $a_w$  y osmolaridad se encuentran en la Tabla 7.1 del capítulo de Resultados y Discusión. Los valores de  $\mu$  y  $T_D$  se muestran en la tabla 7.2 del mismo capítulo. Para determinar la concentración salina en la que *S. ruber* presenta el mejor crecimiento se aplicó un análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba Kruskal-Wallis. Con esta prueba se realizó una comparación de la velocidad específica de crecimiento encontradas en cada condición salina evaluada. En esta prueba no paramétrica, se prueba si varias muestras independientes provienen o no de la misma población, debido al bajo número de repeticiones,

fue necesario elegir una prueba no paramétrica pues estas no asumen normalidad de los datos. Este análisis estadístico compara si las medianas son diferentes, y cuando lo son, esta diferencia se representa con diferentes letras, siendo A, la mediana que presenta el mayor valor, B la que le sigue y así sucesivamente. Para este análisis se utilizó el programa R 3.3.1. Los resultados se muestran en la tabla 7.2.

### **6.3. Extracción de solutos compatibles**

La extracción de los solutos compatibles acumulados por *S. ruber* se realizó únicamente en las condiciones de óptimo crecimiento encontradas mediante la comparación estadística. Se preparó un volumen de 500.0 mL de cada medio de cultivo modificado y se permitió el crecimiento bacteriano hasta la mitad de la fase exponencial. Los medios de cultivo se centrifugaron a 4,000 rpm durante 40 minutos a 4 °C. Las pastillas obtenidas fueron lavadas 2 veces con una disolución amortiguadora de fosfatos (PBS, por phosphate buffer solution) con pH = 7.0 y centrifugadas a 4,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la biomasa sedimentada se colocó en un portaobjetos de vidrio y fue secado a 75 °C. En un mortero de ágata se homogeneizaron 150 mg de biomasa seca con 300 mg de fase C-18 para lisar a las células bacterianas. Posteriormente en un cartucho de polipropileno se empacó la mezcla homogeneizada junto con un filtro de celulosa en el fondo y en la superficie de la muestra homogenizada. Los solutos compatibles se extrajeron agregando 10.0 mL de una mezcla metanol:agua (1:1) que se hace pasar por gravedad. La mezcla de disolventes eluidos que contiene los solutos compatibles se lleva a sequedad en un baño de agua a 70 °C.

### **6.4. Identificación y cuantificación de solutos compatibles**

La identificación de los solutos compatibles presentes en la biomasa preparada como se explicó en la sección anterior se realiza utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear cuantitativa de protón (<sup>1</sup>H-RMNc). Para ello, cada muestra se coloca en un tubo para RMN al que se le adicionan 10.0 mg de biftalato de potasio (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOHCOOK), un estándar interno para fines de cuantificación y 500.0 µL de agua deuterada (D<sub>2</sub>O) que contiene al ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico (DSS) como estándar de calibración. Las muestras se analizan en un equipo de RMN de protón (<sup>1</sup>H) de 500 MHz realizando un mínimo de 128

barridos. Las señales características de cada soluto compatible se identifican con ayuda de estándares de referencia de los solutos compatibles que se tienen en el laboratorio.

La cuantificación se realiza considerando como parámetro base al área bajo la curva de una señal específica para cada soluto compatible, y el área bajo la curva del estándar de referencia, los cuales se introducen en la siguiente fórmula:

$$C_s = \frac{AN_S \times C_{ER} \times PM_S \times Vol}{AN_{ER} \times M} \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Donde:

$C_s$  = Concentración del soluto compatible de interés ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomasa)

$AN_S$  = Área normalizada de la señal del soluto compatible

$AN_{ER}$  = Área normalizada de la señal del estándar de referencia

$C_{ER}$  = Concentración el estándar de referencia ( $\text{mol}/\text{mL}$ )

$PM_S$  = Peso molecular del soluto compatible ( $\text{g}/\text{mol}$ )

$Vol$  = Volumen total en el tubo de resonancia ( $\text{mL}$ )

$M$  = Cantidad de biomasa seca ( $\text{mg}$ )

## 6.5. Cinéticas de crecimiento con adición de betaína

Para determinar si la adición de betaína tiene alguna influencia en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *S. ruber* se realizaron cinéticas de crecimiento de las concentraciones óptimas en cada condición salina a las que se les agregó la cantidad de betaína necesaria para obtener disoluciones con una concentración final de betaína de 5.0 o 10 mM en un volumen final de 100 mL de los medios modificados. Se realizó el seguimiento del crecimiento bacteriano, construyendo cinéticas de crecimiento bacteriano que permitieron calcular la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  y el tiempo de duplicación  $t_D$ , según se describió en la sección 6.2 de este mismo capítulo.

## 6.6. Generación de un sistema de expresión heterólogo de la proteína GroEL

De acuerdo a resultados previos obtenidos en el grupo de trabajo, se sabe que el complejo protéico GroEL-ES se expresa preferencialmente cuando la bacteria halófila extrema *S. ruber*



censa un estrés al encontrarse en un medio con una baja concentración de NaCl y de MgSO<sub>4</sub>. Para estudiar con mayor detalle la estructura tridimensional de esta proteína fue necesario realizar una producción masiva de la proteína GroEL. Para ello se prepararon 5 mL de un cultivo de *Salinibacter ruber* en el medio nominal de crecimiento, que se utilizó para inocular cajas de Petri que contenían medio nominal sólido. Esto se realizó para obtener colonias aisladas, a partir de las cuales se pudiera amplificar el gen groEL.

Utilizando la técnica de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por Polymerase Chain Reaction) se amplificó al gen groEL a partir de una colonia aislada de *S. ruber* usando los cebadores *forward*: 5'-CGTG**ATAT**CATATGATGGCGAAGCAGATCAAATTTGACTC-3', y *reverse*: 5'-GAT**GGATCC**TTACATCATGCCGCCCATGCCA-3'. Estos cebadores incluyen los sitios de corte de las enzimas de restricción NdeI y BamHI respectivamente, indicados en negrita en los cebadores. La presencia de estos sitios de corte permite posteriormente realizar la ligación del gen amplificado al vector de expresión en el sitio múltiple de clonación. El ADN producto de la PCR se purificó utilizando el conjunto de reactivos "*Highpure PCR Product Purification Kit*" (*Thermo Scientific*). El gen amplificado fue almacenado en el vector de mantenimiento pJET siguiendo el protocolo del conjunto de reactivos "*CloneJET PCR Cloning Kit*" (*Thermo Scientific*).

Se realizó una digestión del vector pJET adicionando las enzimas de restricción NdeI y BamHI (*New England Biolabs*), y los fragmentos obtenidos se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando 1 µg del ADN digerido. La banda de ~1600 pares de bases (pb) que corresponde al gen groEL fue cortada y se extrajo el ADN producto utilizando siguiendo el protocolo del conjunto de reactivos "*GeneJET Gel Extraction Kit*" (*Thermo Scientific*).

Para la inserción del gen groEL en el vector de expresión pET22b (*Merck*), se digirió el vector adicionándole al mismo enzimas de restricción NdeI y BamHI (*New England Biolabs*) en 10 µL de la disolución amortiguadora 3.1 que contiene 100 mM de NaCl, 50 mM de tris (hidroximetil)aminometano más ácido clorhídrico (Tris-HCl), 10 mM de cloruro de magnesio

(MgCl<sub>2</sub>) y 100 µg/ml de albumina de suero bovino a un pH de 7.9 (*New England Biolabs*) incubándolo a 37 °C durante dos horas. Al producto de esta digestión se le adicionaron 500.0 ng del gen groEL purificado a partir de banda y se realizó la ligación del inserto groEL con el vector digerido pET22b, usando la enzima T4 ligasa (*Thermo scientific*) e incubando a 4 °C durante 12 horas. El producto pET22b+groEL se purificó siguiendo el protocolo del conjunto de reactivos “*GeneJet Plasmid Miniprep*” (*Thermo Scientific*). Mediante su secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se confirmó la presencia del gen groEL.

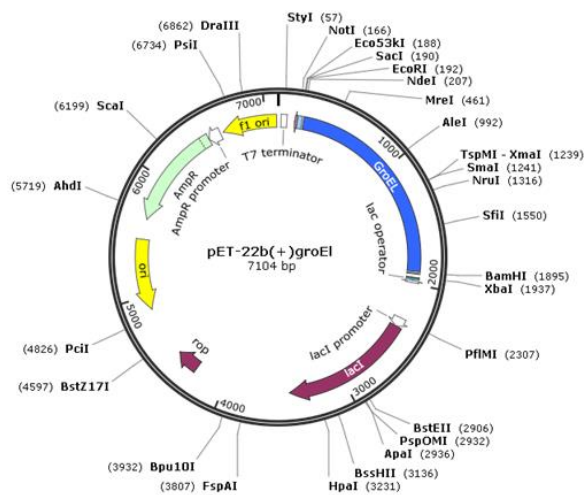


Figura 6.1. Vector de expresión pET22b + GroEL. Se observa en azul el gen Sr-groEL insertado.

El producto pET22b+groEL obtenido, representado en la Figura 6.1, se utilizó para transformar células quimiocompetentes de la cepa *E. coli* BL21 DE3 (*Merck*). Para la transformación se tomaron 50.0 µL de las células quimiocompetentes y se agregaron 300 ng del producto purificado pET22b+groEL, que se incubaron por 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo se realizó un choque térmico a 42 °C durante 90 segundos y se incubó por otros 2 minutos en hielo para promover la inserción del vector dentro de la célula.

Las células se colocaron en 1.0 mL de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C con una agitación de 300 rpm durante 1 hora. Posteriormente se colocaron volúmenes de 50.0 y 100.0 µL en cajas de cultivo de Petri que contenían medio LB adicionado con ampicilina 2 µM. La ampicilina se agrega para identificar la correcta inserción del vector pET 22b en las células de la cepa *E. coli* BL21 DE3, ya que esta cepa no puede crecer en presencia de ampicilina. El vector pET22b justamente le confiere la resistencia ante este antibiótico por lo que el crecimiento de colonias indica una correcta inserción del vector.

Posteriormente se evaluó si las colonias obtenidas expresan a la proteína GroEL. Para ello cada colonia obtenida se inoculó en 5 mL de medio LB con una concentración final de 2 µM de ampicilina. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.500 a una longitud de onda de 600 nm, se tomó una alícuota de 1 mL que se centrifugó a 10,000 rpm y la pastilla resultante se guardó a -20 °C hasta su uso. A los 4 mL de medio de cultivo restante, se les agregó IPTG suficiente para obtener una concentración final de 0.1 mM en el medio de cultivo. Esta adición se realizó para inducir la expresión del vector pET22b. Esos cultivos se dejaron crecer durante 4 horas más, y se tomó nuevamente una alícuota de 1.0 mL que se centrifugó a 10,000 rpm y se guardó la pastilla a -20 °C hasta su uso.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida para evidenciar la presencia de la banda correspondiente a la proteína GroEL recombinante en las diferentes pastillas obtenidas antes y después de inducir la expresión del vector. A partir de la clona que presentó la mejor expresión de la proteína GroEL de *S. ruber*, se inoculó un litro de medio nutritivo LB con una concentración final de 2 µM de ampicilina. Se permitió el crecimiento hasta que alcanzó un valor de D.O.<sub>600nm</sub> de 0.500. La inducción se realizó con una concentración final de 0.1 mM de IPTG durante 4 horas. Al finalizar el tiempo de inducción se realizó la cosecha de las células centrifugando durante 30 minutos a 4000 rpm y 4 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de biomasa se resuspendió en una disolución amortiguadora de MES (ácido 2-(N-morfolino) etanesulfónico) 0.02 M y sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1.5 M con pH de 5.5. La biomasa resuspendida se sonicó en hielo durante 8 minutos en secuencias de pulsos de 30

segundos con 30 segundos de descanso y se centrifugó durante 20 minutos a 10,000 rpm conservando el extracto crudo de proteínas que corresponde al sobrenadante.

### **6.7. Purificación de la proteína GroEL**

El proceso de purificación de la proteína GroEL obtenida de la etapa anterior comenzó con una cromatografía de interacciones hidrofóbicas utilizando una columna con resina butil sefarosa (HiPrep Butyl FF16/10, General Electric) equilibrada con 50 mL de una disolución amortiguadora de MES 0.02 M y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 M con pH de 5.5. En la columna previamente equilibrada se cargó el extracto crudo obtenido a partir de la sobreexpresión de las células transformadas y se realizó un lavado con 30 mL del amortiguador MES 0.02 M y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 M con pH 5.5 para eluir a las proteínas que no interactúan con la resina. Las proteínas que si interactúan con la resina se eluyen aplicando un gradiente de 100 a 0% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 M en 100 mL de una disolución amortiguadora de MES 0.02 M con pH de 5.5. El volumen eluido se recuperó en 50 fracciones de 2.0 mL utilizando un equipo cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por Fast protein liquid chromatography) ;(Akta pure, General Electric). Cada fracción se analizó mediante electroforesis SDS-Page al 12% de acrilamida para identificar cuales fracciones contenían mayoritariamente a la proteína GroEL.

Las fracciones que contenían a la proteína GroEL se reunieron y concentraron a un volumen de 3.0 mL utilizando una unidad para filtración con centrífuga (Amicon Ultra, Merck) con tamaño de filtro de 30 mil Daltones (kDa). Posteriormente se realizó una diálisis contra 100 volúmenes de MES 0.02 M con pH de 5.5 durante 12 horas para eliminar el exceso de sales. Este procedimiento se repite al final de cada separación cromatográfica.

La siguiente etapa de purificación se realizó utilizando una cromatografía de intercambio aniónico. La muestra con la proteína GroEL resultante de la etapa anterior, se cargó en una columna con resina Q-sefarosa (Q-sepharose, General electric) previamente equilibrada con 50 mL de amortiguador MES 0.02 M con pH de 5.5. Se realizó un lavado con 30 mL de MES 0.02 M con pH de 5.5 para eluir a las proteínas que no interactúan con la resina. Las proteínas retenidas por la columna son eluidas aplicando un gradiente de 0 a 100% de NaCl 1 M en 100 ml de una disolución amortiguadora de MES 0.02 M en un equipo de cromatografía líquida de baja presión (BioLogic LP, Bio-Rad). Nuevamente se colectaron fracciones de 2.0 mL. Cada

fracción se analizó mediante electroforesis SDS-Page al 12% de acrilamida para identificar las fracciones que contenían a la proteína GroEL. Las fracciones que la contenían se reunieron, concentraron y dializaron como se describió para la cromatografía de interacciones hidrofóbicas.

El paso final de la purificación consiste en una cromatografía de exclusión molecular. Para ello se utilizó una columna con resina de dextrano y agarosa (Superdex 200 16/60, General Electric) como fase estacionaria y una disolución amortiguadora de MES 0.02 M, 50 mM de NaCl a pH de 5.5 como fase móvil. Se recolectaron fracciones de 2.0 mL utilizando un equipo de FPLC (Akta Pure, General Electric). Como en las etapas anteriores, la presencia de la proteína GroEL se determinó mediante electroforesis SDS-Page al 12% de acrilamida. Las fracciones que contenían la proteína GroEL se reunieron, concentraron y dializaron como se describió para la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. Finalmente, la proteína se lleva a una concentración de 10 mg/mL utilizando una unidad para filtración con centrífuga (Amicon Ultra, Merck) con tamaño de filtro de 10 mil Daltones (kDa). La proteína pura se mantiene en refrigeración a 4 °C.

## **6.8 Pruebas de cristalización**

Para encontrar las condiciones en las que la proteína GroEL puede cristalizar se utilizó el método de mezcla directa de la proteína con el precipitante (En inglés conocida como microbatch), el cual consiste en colocar en el micropozo de una placa 1.0 µL de la proteína purificada, 1.0 µL de la condición de cristalización y 13.0 µL de parafina para evitar la evaporación. Las placas se mantienen a 18 °C, y se observan periódicamente para verificar la presencia de cristales. Las condiciones de cristalización evaluadas corresponden a las de los paquetes comerciales identificados como Index I y II, Crystal screen I y II, Natrix, Quik screen y Wizard I, II, III y IV. Cada uno de estos paquetes comerciales contenían 48 condiciones de cristalización donde se ha reportado que han cristalizado otras proteínas. La revisión periódica de las pruebas de cristalización se realizó hasta que se evidenció la presencia de cristales con ayuda de un estereomicroscopio (SZ40, Olympus).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Cinéticas de crecimiento

Se realizaron cinéticas de crecimiento en medios modificados con las concentraciones indicadas en la Tabla 6.1, de cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sales de interés astrobiológico por considerarse que son las que pueden estar disueltas en el océano de agua líquida del satélite Europa (Hibbitts *et al.*, 2019). A cada uno de estos medios modificados se les midió el valor de la actividad de agua ( $a_w$ ) y se le calculó su osmolaridad (Tabla 7.1). Estos parámetros proporcionan información sobre el estrés salino al cual fue sometido *Salinibacter ruber* en las diferentes condiciones experimentales evaluadas.

Los resultados obtenidos muestran que los medios evaluados tienen valores de actividad de agua entre 0.772 y 0.938 con osmolaridades entre 10.573 y 5.693, los organismos que son capaces de desarrollarse en estos valores bajos de actividad de agua son los denominados organismos halófilos. Como puede notarse, existe una relación inversa entre la osmolaridad y los valores de  $a_w$ , es decir el aumento de uno tiene como consecuencia la disminución del otro y viceversa. Esto es acorde a lo esperado y demuestra la correlación entre los valores medidos y calculados.

Se evaluó el crecimiento de *S. ruber* en cada uno de los medios modificados descritos anteriormente para determinar las condiciones en las que presenta crecimiento, así como los parámetros cinéticos que permitirán posteriormente, realizar comparaciones cuantitativas.

En la figura 7.1A se muestra, a modo de ejemplo, la cinética de crecimiento de *S. ruber* en el medio modificado con MgSO<sub>4</sub> 0.5 M. El resto de las cinéticas se encuentran en el Apéndice A. A partir de cinéticas como ésta, se separan los valores de densidad óptica (D.O.) correspondientes a la fase exponencial, se transforman en su valor de logaritmo natural (ln) y se grafican nuevamente en función del tiempo con lo que resulta un gráfico como el de la figura 7.1B. A este conjunto de datos se le realiza un ajuste lineal por el método de mínimos

cuadrados. La pendiente de la ecuación resultante corresponde con la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en esa condición salina. Con este valor y utilizando la ecuación 6.1, se puede calcular el tiempo de duplicación ( $t_D$ ) para esa misma condición salina. Se procede así para cada una de las condiciones salinas evaluadas. Los resultados se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.1. Actividad de agua ( $a_w$ ) y osmolaridad de los medios modificados con NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub> en los que se realizaron las cinéticas de crecimiento de *Salinibacter ruber*. Cada medio modificado se identifica como Condición salina (ver sección 6.1).

Condición salina	Actividad de agua ( $a_w$ )	Osmolaridad (osm/L)
NaCl 2.2 M	0.892	6.12
NaCl 3.3 M	0.831	8.34
NaCl 4.4 M	0.772	10.54
MgSO <sub>4</sub> 0.0 M	0.938	5.69
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	0.915	6.69
MgSO <sub>4</sub> 1.0 M	0.888	7.69
MgSO <sub>4</sub> 1.5 M	0.854	8.69
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0 M	0.938	4.69
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	0.904	6.20
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.877	7.69
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0 M	0.938	5.09
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	0.915	6.21
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.911	7.46
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	0.888	6.10
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.883	7.27
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.5 M	0.877	8.46

Para determinar si las diferencias entre los valores de la velocidad específica de crecimiento que se encuentran para las distintas concentraciones de una misma sal son significativas, se

realizó un análisis estadístico basado en la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual es análoga a la prueba paramétrica ANOVA.

Como resultado de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se le asigna una letra del alfabeto a cada valor de velocidad específica de crecimiento para una sal específica, si los valores son significativamente diferentes entre ellos. Si los valores no difieren significativamente se les asigna la misma letra. Además las primeras letras corresponden con los valores mayores. La tabla 7.2 contiene los resultados de esta evaluación estadística. La condición salina marcada con la letra "A" se considera como la de óptimo crecimiento para cada sal, lo que permite concluir entonces si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $\mu$  para las distintas concentraciones salinas evaluadas.

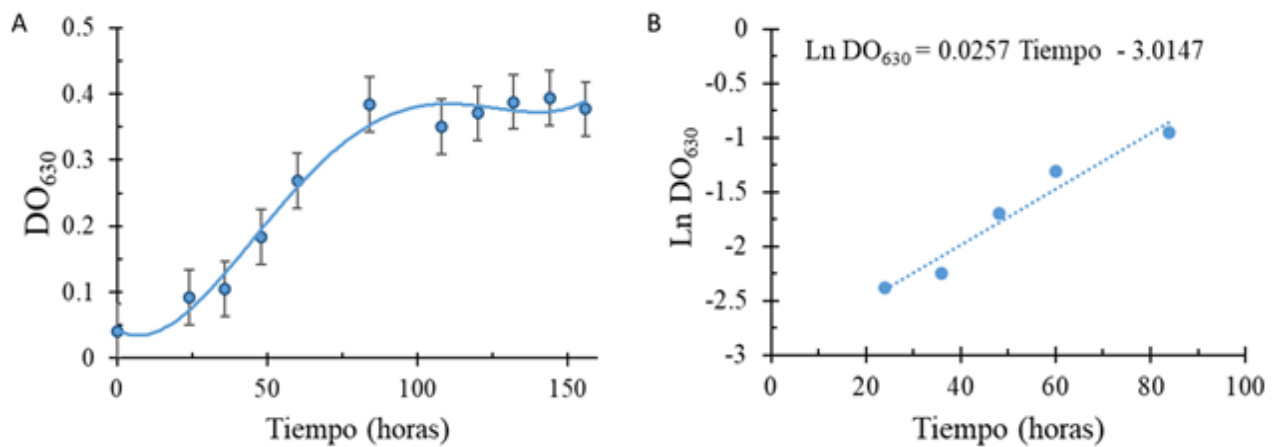


Figura 7.1. Cinética de crecimiento (A) y ajuste lineal de los valores correspondientes a la fase exponencial (B) para determinar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_D$ ) de *Salinibacter ruber* en un medio modificado con  $MgSO_4$  0.5 M.



Tabla 7.2. Parámetros cinéticos del crecimiento de *Salinibacter ruber* en las distintas condiciones salinas evaluadas. Se muestran también los resultados de la prueba estadística Kruskal-Wallis.

Condición salina	Velocidad específica de crecimiento, $\mu$ ( $h^{-1}$ )	Resultados de la prueba Kruskal-Wallis	Tiempo de duplicación $T_D$ (horas)
NaCl 2.2 M	0.0290	B	106.63
NaCl 3.3 M	0.0350	A	20.63
NaCl 4.4 M	0.0225	C	31.36
MgSO <sub>4</sub> 0.0 M	0.0065	C	23.65
MgSO <sub>4</sub> 0.5 M	0.0257	B	19.80
MgSO <sub>4</sub> 1.0 M	0.0325	A	30.80
MgSO <sub>4</sub> 1.5 M	0.0291	B	106.63
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0 M	0.0065	C	26.97
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	0.0336	A	21.32
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.0221	B	23.82
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0 M	0.0144	B	48.13
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	0.0122	B	56.81
MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.0169	B	41.01
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M	0.0146	B	47.47
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.0 M	0.0224	B	30.94
2 MgSO <sub>4</sub> : Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.5 M	0.0280	B	24.75

La condición salina en la que se presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue en NaCl 3.3 M con un valor de 0.35, seguida de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M ( $\mu= 0.34$ ) y de MgSO<sub>4</sub> 1.0 M ( $\mu= 0.32$ ). La combinación de las sales sulfatadas tanto en concentraciones equimolares como en una relación 2:1 muestra en todos los casos, una disminución en la velocidad específica de crecimiento, aunque no tan alejadas de los valores mencionados anteriormente.

Por otro lado, los medios modificados en los que se presentan los menores valores para la velocidad específica de crecimiento corresponden con aquellos que contienen un mínimo de

NaCl (1.7 M) y que no contienen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{MgSO}_4$ . En ambos casos el valor de  $\mu$  corresponde con 0.0065. Esto es un claro indicativo del carácter halófilo de *S. ruber* ya que al disminuir la cantidad de sales presentes en su medio se genera una condición de estrés para ella. El valor de  $a_w$  para este medio con 1.7 M de NaCl es de 0.938. Por esta razón se nota una disminución en la velocidad específica de crecimiento.

Las concentraciones de óptimo crecimiento encontradas en este proyecto están en concordancia con los valores reportados previamente para NaCl y  $\text{MgSO}_4$  (Antón *et al.*, 2002; Miranda, 2015). En el presente proyecto, se evaluó adicionalmente el crecimiento de *S. ruber* en medios modificados con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), en los cuales se pudo evidenciar por primera vez, la capacidad de *S. ruber* de crecer en altas concentraciones de esta sal.

Con los valores de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), así como los valores de  $a_w$  y de osmolaridad para cada condición salina, se construyeron gráficas que permiten confirmar la condición de óptimo crecimiento. En la figura 7.2 se muestran las gráficas resultantes. Los valores de mayor velocidad específica de crecimiento evidenciados en estas gráficas corresponden con los medios modificados en los que se encontró el mejor crecimiento por medio del análisis estadístico.

Para explicar la capacidad que presenta *S. ruber* para crecer en las diferentes condiciones salinas evaluadas, es necesario analizar alguno de los ambientes en los que esta bacteria se desarrolla naturalmente, por ejemplo, los estanques de evaporación. Estos estanques están dominados por altas concentraciones de NaCl, lo que explica que las mayores velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) se presenten en los medios modificados con esta sal. Un proceso que ocurre regularmente en estos estanques, es que cuando precipita el NaCl para formar al mineral conocido como halita, se genera un aumento en las concentraciones relativas de otros iones como los cationes magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de modo que los organismos que crecen en los estanques salinos saturados deben ser capaces de tolerar también altas concentraciones de estos iones (Oren, 2013a). Por lo tanto, no es extraño que *S. ruber* tenga la capacidad de crecer en presencia de sales que contienen no solo del catión sodio ( $\text{Na}^+$ ) sino también al catión magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Adicionalmente se ha reportado la presencia de bacterias

pertenecientes al género *Salinibacter* en ambientes naturales tunisios ricos en  $Mg^{2+}$ , otra evidencia de la capacidad de *S. ruber* de crecer en presencia de este catión (Baati *et al.*, 2011).

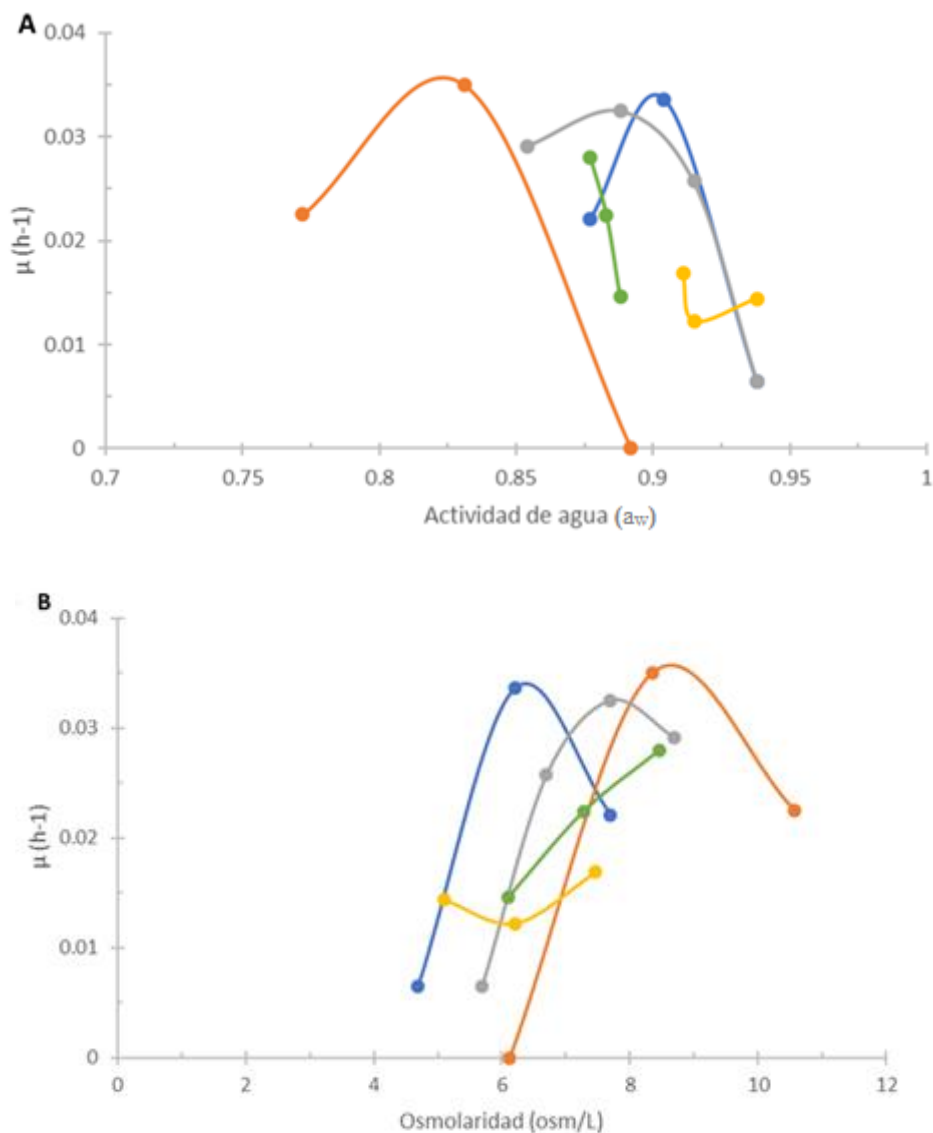


Figura 7.2. Velocidad específica de crecimiento en función de la actividad de agua (A) y en función de la osmolaridad (B) en las diferentes condiciones salinas evaluadas. Naranja: NaCl, Gris:  $MgSO_4$ , Azul:  $Na_2SO_4$ , Amarillo:  $MgSO_4 + Na_2SO_4$  (1:1), Verde:  $MgSO_4 + Na_2SO_4$  (2:1).

Otros de los procesos que ocurren de manera simultánea en los ambientes salinos en donde habita *S. ruber* es la precipitación secuencial de carbonatos y sulfatos de calcio, como resultado de la evaporación del agua de mar que van dejando estos ambientes hipersalinos saturados en NaCl (Antón *et al.*, 2008). Por lo que *S. ruber* no está expuesto naturalmente a altas concentraciones del anión sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en disolución, lo cual explica la disminución en su crecimiento al estar expuesto a este anión. Aun cuando disminuyen las velocidades específicas de crecimiento de *S. ruber* en presencia las sales sulfatadas en comparación con el NaCl, se nota que la bacteria sigue siendo capaz de crecer, lo cual podría explicarse considerando que podría estar utilizando los mismos mecanismos de adaptación que utiliza ante las altas presiones osmóticas generadas por altas concentraciones del anión cloruro, pero ahora para contrarrestar las altas presiones generadas por el anión sulfato, que además tiene un carácter más caotrópico que el cloruro (Fernandez y Müller, 2017).

Para enmarcar estos resultados en el contexto de la habitabilidad del océano de agua líquida del satélite Europa es necesario presentar los distintos escenarios reportados como posibles para la composición salina de dicho océano. Debido que la sonda Galileo detectó la presencia de  $\text{MgSO}_4$  y en menor medida de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  con sus mediciones de espectrometría de infrarrojo cercano en la superficie del hielo, el primer escenario posible describe un océano rico en estas sales sulfatadas (Kargel *et al.*, 2000). De acuerdo con las estimaciones de la concentración de  $\text{MgSO}_4$  que podría estar presente en el océano de Europa, ésta podría encontrarse entre 0.009 y 2.3 M (Figura 7.3). En el presente proyecto se estudió un amplio intervalo de concentraciones para el  $\text{MgSO}_4$ , encontrándose crecimiento bacteriano en todas ellas. De modo que si el  $\text{MgSO}_4$  fuera la sal dominante en el océano de Europa y se presentara en concentraciones menores a 1.5 M, *S. ruber* podría desarrollarse en ese océano. Entiéndase que esta aseveración se hace únicamente apelando al criterio de la salinidad del océano extraterrestre.

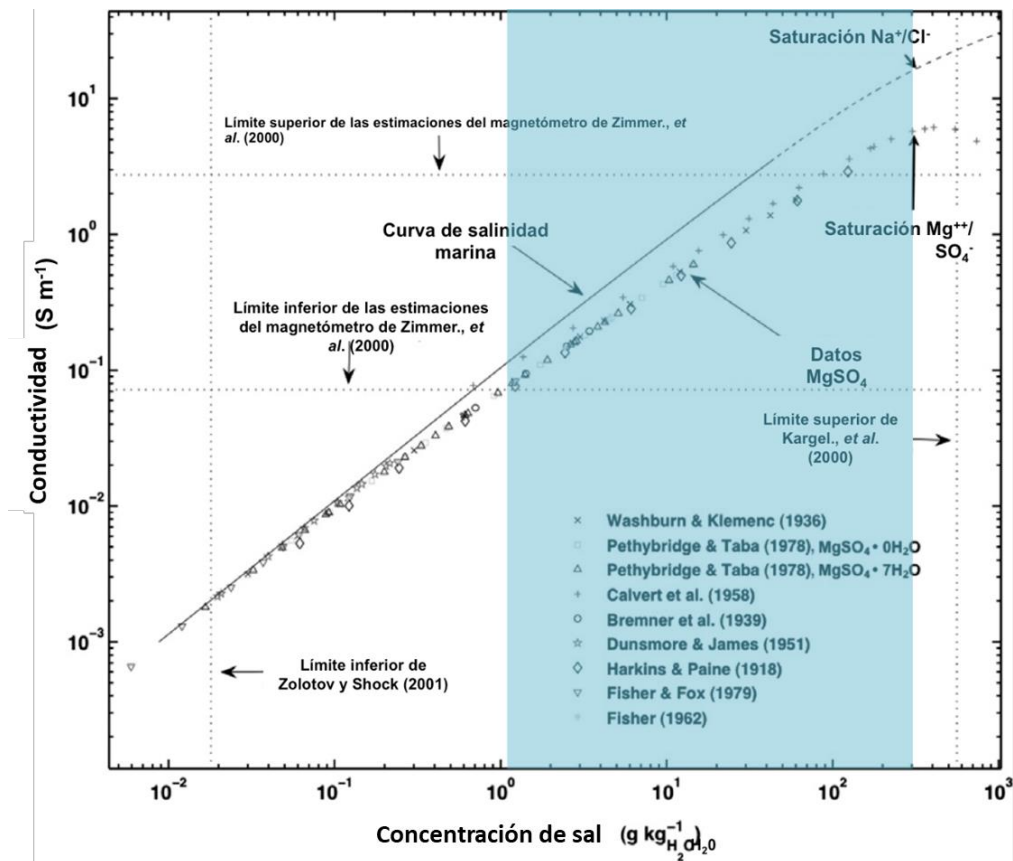


Figura 7.3. Concentración de MgSO<sub>4</sub> estimada para el océano de agua líquida del satélite Europa. El recuadro azul muestra el intervalo de concentraciones evaluado en este estudio. Modificada de Hand y Chyba, 2007.

En estudios más recientes se ha propuesto que tal vez el MgSO<sub>4</sub> no sea la sal dominante en el océano de Europa, sino más bien el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kargel *et al.*, 2000; Vu *et al.*, 2016). Los resultados de este proyecto demuestran que, si el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es la sal dominante, *S. ruber* podría desarrollarse en concentraciones de hasta 1.0 M. Nuevamente no hay que perder de vista, que esta aseveración se realiza considerando únicamente el entorno salino del océano del satélite Europa. Debido a que no existen reportes relativos a la estimación de la concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que podría estar presente en este océano, se evaluaron dos posibles escenarios. En uno se mantuvo una proporción equimolar de MgSO<sub>4</sub> y de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mientras que en el otro se mantuvo una predominancia del sulfato de magnesio, en proporción 2:1. En ambos casos se encuentra que *S. ruber* puede crecer en estas condiciones de sales sulfatadas mezcladas,

indicativo de esta bacteria halófila podría subsistir en las diferentes combinaciones salinas que pudieran estar presentes en el océano de Europa.

Estudios experimentales de las reacciones radiolíticas que podrían darse en la superficie de Europa, proponen que más bien el anión dominante en el océano de Europa es el anión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y que en el océano coexisten tanto el cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) como el cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}$ ) (Brown y Hand, 2013; Hibbitts *et al.*, 2019; Vu *et al.*, 2016). Se sabe que *S. ruber* presenta un crecimiento óptimo en cloruro de sodio (Antón *et al.*, 2002), resultado que ha sido corroborado por el grupo de investigación en el que participo y por este mismo estudio. Por lo tanto, si el océano de agua líquida de Europa estuviera enriquecido con sales cloradas tanto o más que por sales sulfatadas, sería inclusive más favorable para el crecimiento de *S. ruber*.

## 7.2. Cuantificación de solutos compatibles

Una vez que se identificaron las condiciones de óptimo crecimiento se procedió a identificar la presencia de solutos compatibles utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear cuantitativa, según lo descrito en la sección 6.4, del capítulo de Métodos y Materiales.

En todas las condiciones analizadas sólo se identificó al soluto betaína. La identificación se realizó tomando como referencia una biblioteca de estándares de solutos compatibles que existe en el grupo de trabajo. En cada uno de los espectros correspondientes a las cinco condiciones salinas identificadas como de óptimo crecimiento (Tabla 7.2) se pueden observar las dos señales características de la betaína, una con un desplazamiento químico en 3.26 ppm y la otra en 3.9 ppm. La primera corresponde a los nueve protones de los tres grupos metilo ( $\text{CH}_3$ -) resaltados en naranja en figura 7.4 y cuya multiplicidad corresponde con un singulete; mientras que la segunda corresponde a los dos protones del grupo etilo ( $-\text{CH}_2-$ ) resaltados en verde en figura 7.4 y cuya multiplicidad corresponde con un singulete.

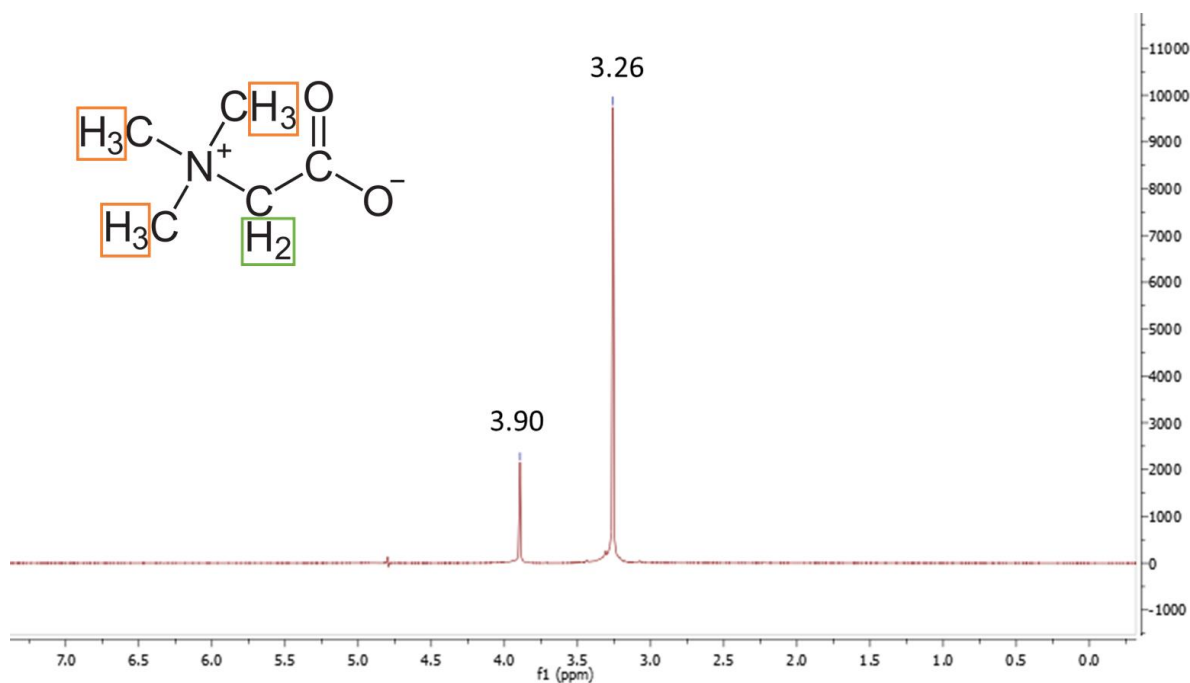


Figura 7.4. Espectro de resonancia magnética nuclear de la betaína. Se observan las señales características para este soluto compatible. En la esquina superior izquierda se representa la molécula de betaína y se resaltan en naranja los protones que originan la señal de 3.26 ppm y en verde los que originan la señal de 3.9 ppm.

Para conocer la cantidad de betaína presente en cada condición salina evaluada se utiliza la ecuación 6.3 descrita en la sección 6.4, en la cual se utiliza como parámetro principal el área bajo la curva de una señal específica del soluto compatible betaína, así como el área bajo la curva de un estándar de referencia del cual se adiciona una cantidad conocida. La cantidad calculada de betaína se divide entre la cantidad de biomasa a partir de la cual se realizó la extracción para obtener el número de microgramos ( $\mu\text{g}$ ) de betaína acumulada por miligramo (mg) de biomasa seca de *S. ruber*. Los resultados se encuentran en la Tabla 7.3.

La mayor cantidad de betaína se encuentra en el medio modificado con 3.3 M de NaCl. En esta condición se detectaron 6.28  $\mu\text{g}$  de betaína mg de biomasa seca. Esta condición además coincide con la reportada como de óptimo crecimiento (Antón *et al.*, 2002).

Tabla 7.3. Cantidad de betaína en las concentraciones de óptimo crecimiento en cada condición salina evaluada.

Condición salina	Actividad de agua ( $a_w$ )	Cantidad de betaína ( $\mu\text{g}$ de betaína/mg biomasa seca)
<b>NaCl 3.3 M</b>	0.831	6.28
<b>MgSO<sub>4</sub> 1.0 M</b>	0.888	4.57
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M</b>	0.904	3.63
<b>MgSO<sub>4</sub> : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M</b>	0.911	5.03
<b>2 MgSO<sub>4</sub> : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 M</b>	0.877	0.73

Existen reportes previos sobre la presencia de solutos compatibles en *S. ruber*. Oren y colaboradores (Oren *et al.*, 2002) encontraron concentraciones de 2, 3.5 y 4.4  $\mu\text{g}$  de betaína/mg biomasa seca cuando *S. ruber* creció en concentraciones de 2.5 M, 3.4 M y 4.2 M de NaCl respectivamente. En opinión de estos autores, las bajas concentraciones encontradas hacen difícil considerar que esta molécula pueda contribuir en el proceso de osmoadaptación de la bacteria.

En trabajos previos realizados en el grupo de investigación, se ha encontrado que *S. ruber* puede acumular hasta 9.5  $\mu\text{g}$  de betaína por mg de biomasa cuando se expone a un medio modificado con 4.4 M de NaCl y 11.54  $\mu\text{g}$  de betaína por mg de biomasa en un medio modificado con 1.5 M de MgSO<sub>4</sub>, (Sánchez, 2016). También se observó que la cantidad de betaína aumenta si aumenta la concentración salina en el medio. Estas pueden ser evidencias que permitan argumentar que *S. ruber* si utiliza a la betaína como agente osmoprotector al encontrarse en un medio con una alta presión osmótica externa provocado por la presencia de altas concentraciones salinas.

Adicionalmente, en este trabajo se reporta por primera vez la acumulación de betaína cuando *S. ruber* se expone a medios modificados sólo con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, así como con una combinación de MgSO<sub>4</sub> y de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tanto equimolar como en proporción 2:1 (Figura 7.5). Estos resultados son relevantes para el escenario del océano de agua líquida del satélite Europa debido a que *S. ruber* podría utilizar la estrategia de acumulación de solutos compatibles en las condiciones salinas de este océano.



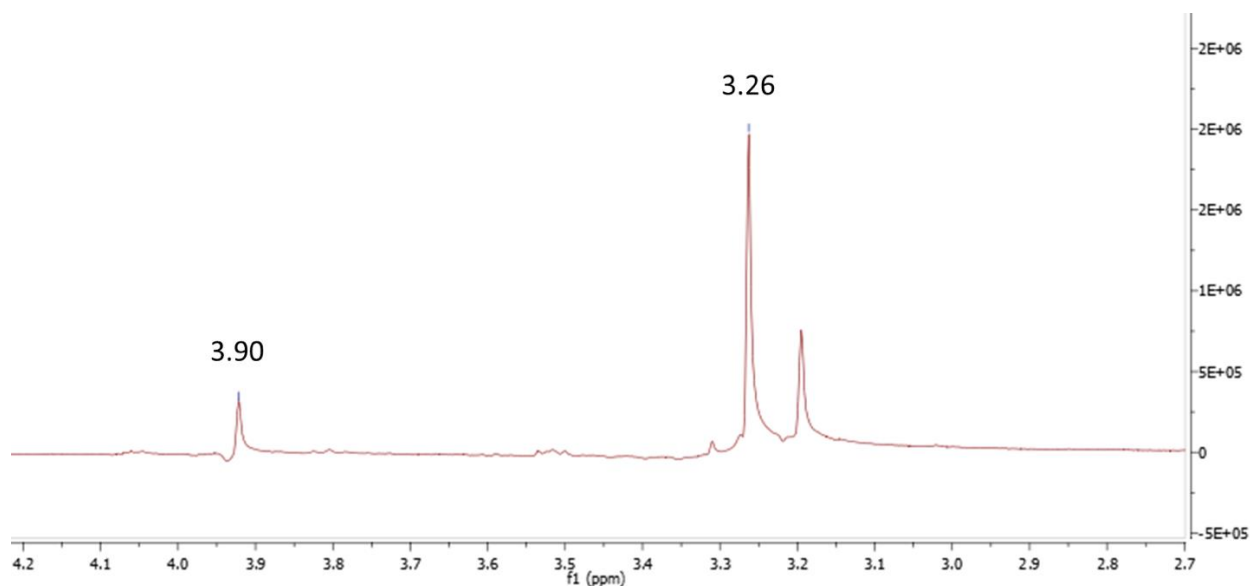


Figura 7.5. Identificación de betaína en la condición salina equimolar de  $MgSO_4$  y  $Na_2SO_4$  1.0 M Se pueden observar las dos señales correspondientes a la betaína.

### 7.3. Cinéticas de crecimiento con adición de betaína a los medios modificados

Con el conocimiento de que la betaína es el único soluto compatible acumulado por *Salinibacter ruber* se procedió a evaluar si la adición de cantidades conocidas de este soluto compatible a los medios modificados correspondientes a la condición salina de óptimo crecimiento, significaban una mejora en el crecimiento bacteriano. Para ello se prepararon cinéticas de crecimiento para las mismas condiciones salinas mostradas en la Tabla 7.3, pero a cada condición salina se le adicionó la masa de betaína necesaria que obtener, en un volumen de 100 mL de medio modificado, concentraciones finales de 5.0 y 10.0 mM de betaína. Para determinar el efecto de la betaína se calcularon los valores para la velocidad específica de crecimiento en cada caso y se realizó una comparación con los valores correspondientes a los medios sin adición de betaína. Los resultados se muestran en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4. Parámetros cinéticos del crecimiento de *Salinibacter ruber* en distintas condiciones salinas con y sin betaína añadida.

Condición salina	Concentración final de betaína (mM)	Actividad de agua, aw	Velocidad específica de crecimiento, $\mu$ (h <sup>-1</sup> )
<b>NaCl 3.3 M</b>	0	0.831	0.0350
	5	0.831	0.0246
	10	0.830	0.0250
<b>MgSO<sub>4</sub> 1.0 M</b>	0	0.888	0.0325
	5	0.886	0.0204
	10	0.882	0.0275
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M</b>	0	0.904	0.0336
	5	0.903	0.0225
	10	0.902	0.0196
<b>MgSO<sub>4</sub> : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M</b>	0	0.911	0.0169
	5	0.909	0.0280
	10	0.908	0.0206
<b>2 MgSO<sub>4</sub> : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 M</b>	0	0.877	0.0280
	5	0.877	0.0149
	10	0.875	0.0108

Los resultados indican que únicamente en la condición salina equimolar de MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M ocurre un aumento en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tanto en el medio adicionado con una concentración final de betaína de 5.0 mM como en el medio adicionado con 10.0 mM. El resto de las condiciones evaluadas muestra más bien una disminución en el valor de  $\mu$  cuando se adiciona betaína en comparación con la misma condición, pero sin betaína agregada.

Para explicar esta situación se deben analizar las estrategias de haloadaptación que se conocen para la bacteria halofila extrema *Salinibacter ruber*. Se ha reportado que la principal estrategia de haloadaptación de *S. ruber* es la acumulación de KCl en su citoplasma, pero que

también puede acumular pequeñas cantidades, del orden de los microgramos, de solutos compatibles (Miranda, 2015; Oren *et al.*, 2002). El medio reportado como nominal para *S. ruber* utiliza como fuente de carbono el extracto de levadura (Antón *et al.*, 2002), el cual contiene cantidades considerables de betaína, al menos entre 1 y 3% de peso seco (Galinsky, 1993). Por lo tanto, es posible que la betaína presente en el medio nominal sea suficiente para que de ahí *S. ruber* tome lo necesario cuando tiene que enfrentarse a alguna condición que le genera un estrés salino. Cuando se adiciona más betaína al medio, lejos de estar apoyando a *S. ruber* proporcionándole directamente el soluto compatible que utiliza, lo que se podría estar generando es un aumento en la presión osmótica de su entorno que no logra compensar, al menos no muy eficientemente y en consecuencia aun cuando se observa crecimiento bacteriano, este no es más rápido en comparación con los medios no adicionados con betaína, lo que se refleja en una disminución en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Para la condición en la que si se observaron incrementos en la velocidad específica de crecimiento ( $\text{MgSO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$  1.0 M) es importante hacer notar que al realizar la cuantificación de betaína, las cantidades calculadas (Tabla 7.5) no difieren significativamente de la cantidad calculada sin adición de betaína (Tabla 7.3).

También se observa que al agregar una concentración específica de betaína a los medios modificados, el valor de la actividad de agua ( $a_w$ ) disminuye. Esto puede significar no sólo un estrés osmótico mayor para *S. ruber*, sino también una disminución considerable de la cantidad de agua biológicamente disponible que encuentra en esos medios. Por lo que esto contribuiría también a la disminución de los valores de  $\mu$ .

#### **7.4. Cuantificación de betaína en los medios modificados adicionados con betaína**

Una vez que se determinó que la adición de cantidades definidas de betaína a los medios modificados si modifican el crecimiento de *Salinibacter ruber*, se procedió a calcular la cantidad total de betaína presente en estos medios. A partir de los medios modificados como se explicó en la sección 6.5 y siguiendo el procedimiento de cuantificación descrito en la sección 6.4 se calcularon las cantidades que se presentan en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5. Cantidad de betaína presente en las concentraciones de óptimo crecimiento adicionadas con betaína.

<b>Condición salina</b>	<b>Concentración final de betaína (mM)</b>	<b>Actividad de agua (a<sub>w</sub>)</b>	<b>Cantidad de betaína (µg de betaína /mg biomasa seca)</b>
<b>NaCl 3.3 M</b>	5.0	0.831	7.94
	10.0	0.830	14.10
<b>MgSO<sub>4</sub> 1.0 M</b>	5.0	0.886	5.22
	10.0	0.882	5.86
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M</b>	5.0	0.903	4.83
	10.0	0.902	5.97
<b>MgSO<sub>4</sub> : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M</b>	5.0	0.909	4.42
	10.0	0.908	6.99
<b>2 MgSO<sub>4</sub> : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 M</b>	5.0	0.877	1.42
	10.0	0.875	2.50

Se nota que cuando la concentración final de betaína añadida es mayor, se encuentran cantidades mayores de este soluto compatible. Además, si estos resultados se comparan con los de la Tabla 7.3 se nota que en términos generales la cantidad de betaína correspondiente a los medios adicionados es mayor que en los medios modificados sin adición de betaína. La Figura 7.6 muestra una comparación en términos del porcentaje normalizado respecto a la cantidad mayor de betaína encontrada en las distintas condiciones salinas evaluadas.

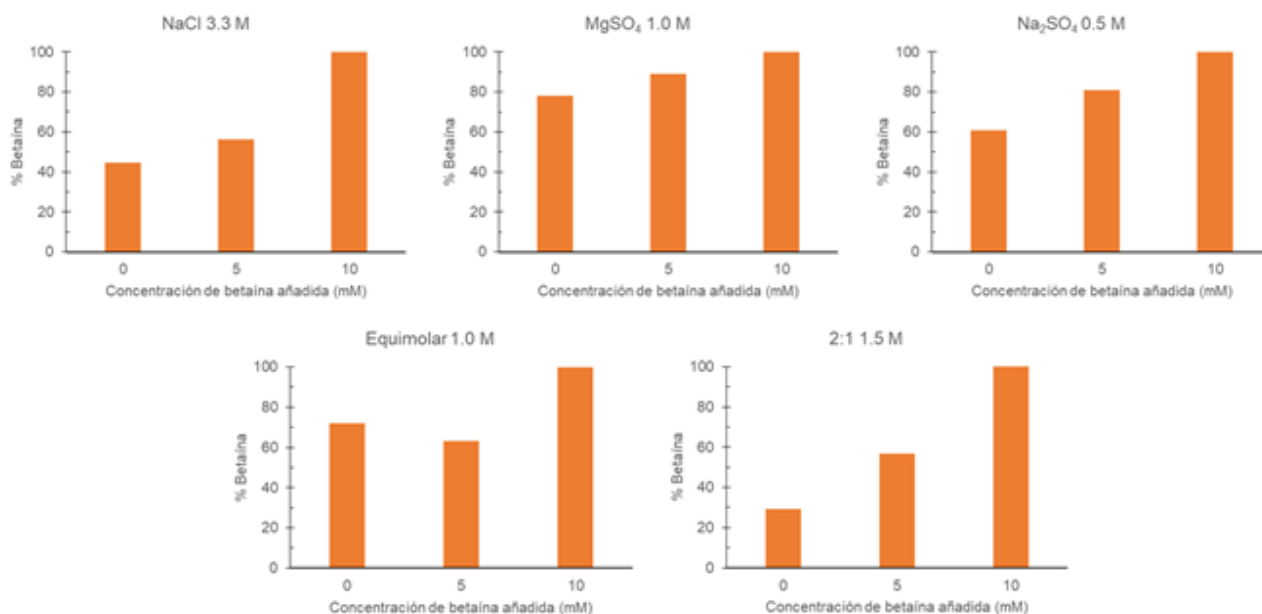


Figura 7.6. Porcentaje de betaína encontrada en función de la concentración final de betaína presente en cada condición de crecimiento óptimo

El incremento en la cantidad de betaína puede proporcionar indicios sobre el mecanismo de internalización de betaína que *Salinibacter ruber* puede estar utilizando como estrategia de haloadaptación. Ya se comentó que se observa que al existir una mayor disponibilidad de betaína en el medio, como ocurre en los medios modificados con betaína añadida, *S. ruber* tiende a internalizar a este soluto compatible para utilizarlo como osmoprotector. Realizando un análisis de la información contenida en el genoma de *S. ruber*, se encuentra que éste no posee los genes necesarios para biosintetizar a la betaína por alguna de las dos rutas metabólicas reportadas para este fin en la base de datos de vías metabólicas MetaCyc (MetaCyc Metabolic Pathway Database) Estas rutas de biosíntesis se ilustran en la Figura 7.7, La ruta A es la biosíntesis a partir de colina y requiere de dos enzimas, la colina deshidrogenasa y la betaína aldeido deshidrogenasa. Ninguna de estas enzimas está codificada en el genoma de *S. ruber*. La ruta B comienza a partir de glicina y requiere de las enzimas glicina metiltransferasa, sarcosina dimetilglicina metiltransferasa y dimetilglicina betaína metiltransferasa para transformar la glicina en glicina betaína. Del análisis del genoma de *S. Ruber* se observa que únicamente está presente la enzima glicina metiltransferasa. de las cuales, *S. ruber* solo posee la primera enzima.

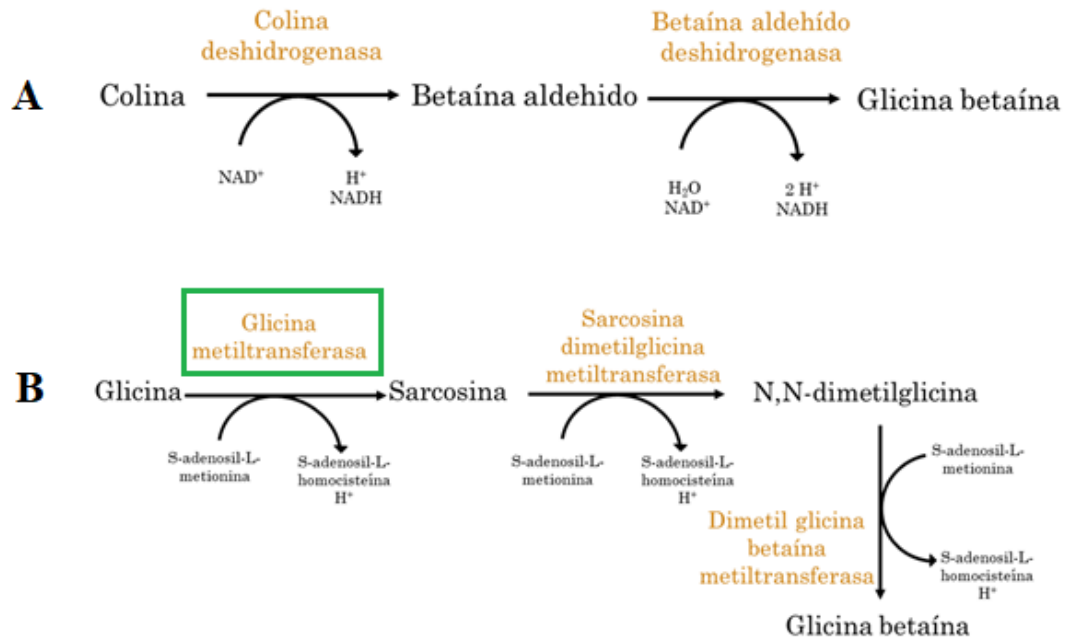


Figura 7.7. Rutas metabólicas para la biosíntesis de betaína. En el recuadro verde se resalta a la única enzima de estas rutas metabólicas que presenta *Salinibacter ruber* (Metacyc).

Por otro lado, el análisis del genoma de *S. ruber* se encontró que la bacteria si posee el transportador de membrana ProV que justamente es el que requiere para realizar la internalización del soluto compatible betaína. Hay que recordar que cuando se adiciona betaína el valor de actividad de agua ( $a_w$ ) disminuye según los datos de la Tabla 7.5, lo cual, como ya se mencionó provoca un mayor estrés osmótico en *S. ruber*, lo que probablemente motiva la internalización de una mayor cantidad de betaína.

Este conjunto de resultados permite evidenciar que *S. ruber* si acumula betaína como estrategia de haloadaptación cuando se somete a condiciones salinas que se asemejan a las pretendidas condiciones de salinidad que pueden encontrarse en el océano de agua líquida del satélite Europa. Aún cuando el genoma de *S. ruber* no contiene los genes necesarios para realizar la biosíntesis *de novo* de betaína, aspecto que le sería de mucha utilidad en el supuesto

caso de que esta bacteria pudiera llevarse al océano de Europa, podría realizar un proceso de internalización de este soluto compatible. Para ello se requeriría que en el océano de agua líquida de Europa existieran no sólo este soluto compatible, sino un conjunto amplio y variado de compuestos orgánicos, un aspecto aún desconocido para el satélite y que es materia de futuras misiones de exploración espacial.

### 7.5. Generación de un sistema de expresión heterólogo para la proteína GroEL

De acuerdo a resultados previos obtenidos en el grupo de trabajo, se sabe que el complejo proteico GroEL-GroES presenta una expresión diferenciada cuando *Salinibacter ruber* se expone a condiciones de estrés motivadas por la disminución de la concentración de NaCl y de MgSO<sub>4</sub> (Miranda, 2015).

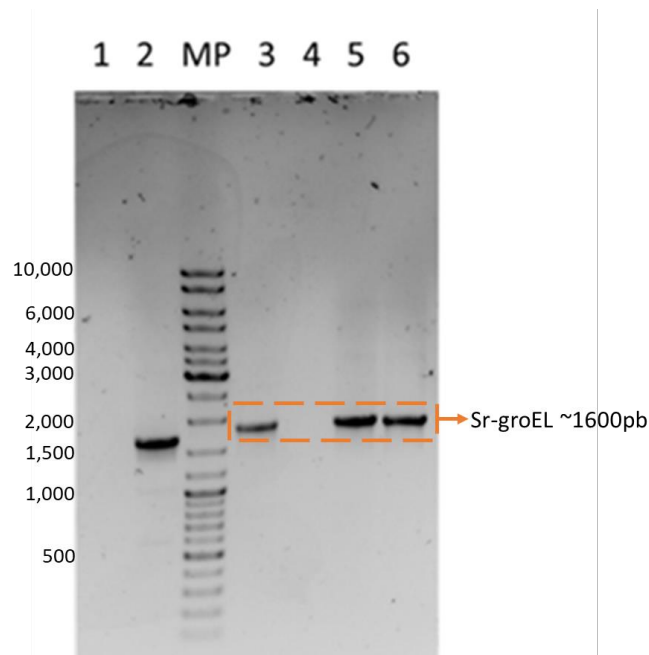


Figura 7.8. Confirmación de la amplificación del gen groEL de *Salinibacter ruber* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1: Control (-) Reacción sin ADN 2: Control (+) Gen de la lacasa de *Thermus thermophilus*, 3 a 5: Productos de la PCR, MP: Marcador de peso molecular (pares de bases)

Con la intención de encontrar una argumentación que permita explicar este hecho, se procedió a realizar un estudio de la estructura tridimensional de la proteína GroEL. Para ello es necesario realizar una producción masiva de dicha proteína a partir de un sistema de expresión heterólogo basado en la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3).

El gen groEL de *Salinibacter ruber* (Sr-groEL) se amplificó a partir de una colonia aislada de esta bacteria. En la figura 7.8 se puede observar la presencia de bandas de aproximadamente 1,600 pares de bases (pb), las cuales, según la secuencia reportada en el genoma de *S. ruber*, corresponden a este gen amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por *polymerase chain reaction*).

El gen amplificado se almacenó en el vector pJET. La existencia del fragmento de Sr-groEL en el vector pJET se comprobó mediante electroforesis SDS Page como puede observarse en la figura 7.9, en la cual se puede observar en el carril identificado con el número 2, la presencia del vector pJET de aproximadamente 3,000 pb más el fragmento de aproximadamente 1600 pb que corresponde a Sr-groEL.

Posteriormente se realizó un corte utilizando las enzimas de restricción BamHI y NdeI, en el fragmento pJET+Sr-groEL y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La banda con un peso molecular de 1,600 pb, correspondiente al gen groEL de *S. ruber* más los sitios de corte de ambas enzimas de restricción, se cortó y se utilizó para aislar al ADN del gen, mismo que se insertó en el sitio múltiple de clonación del vector pET22b. Los resultados se muestran en la Figura 7.10, en el carril identificado con el número 2 se puede observar el vector pJET de aproximadamente 3,000 pb y Sr-groEL de aproximadamente 1,600 pb y en carril identificado con el número 3, el vector pJET y la banda del fragmento cortada correspondiente a Sr-groEL.



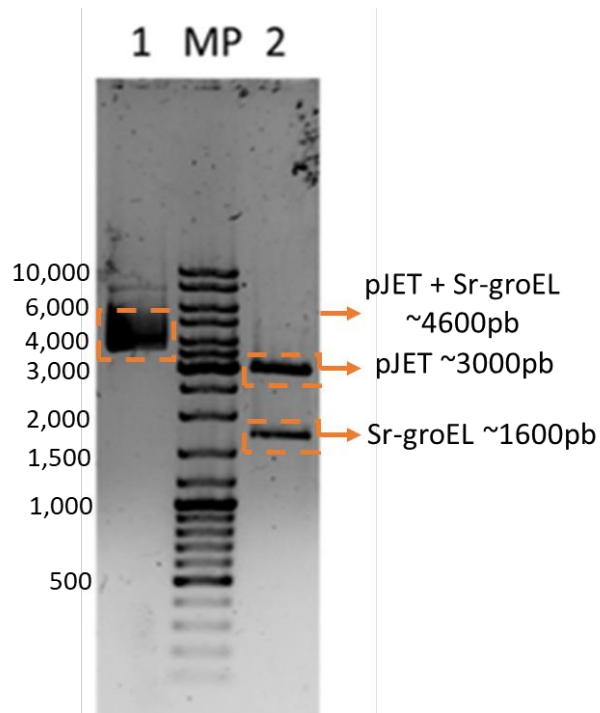


Figura 7.9. Confirmación de la ligación del gen Sr-groEL en el vector pJET mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1: Construcción pJET+Sr-groEL, MP: Marcador de peso molecular (pb), 2: Resultado de la digestión de pJET+Sr-groEL realizado con enzimas de restricción NdeI y BamHI.

Finalmente, a partir de la transformación de células competentes de la cepa *E. coli* BL21(DE3) con el vector pET22b se obtuvieron 4 colonias con resistencia a ampicilina conferida por el vector insertado. Esto es un indicativo de que las bacterias de estas colonias lograron integrar el vector.

Se purificó el ADN del vector mediante el conjunto de reactivos *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* a partir de cada una de las cuatro colonias obtenidas. Se realizó una digestión del mismo utilizando las enzimas de restricción NdeI y BamHI, lo cual permitió evidenciar que las bacterias de las colonias presentaban al gen Sr-groEL dentro del vector debido a la presencia de la banda en aproximadamente 1,600 pb en los productos de digestión (Figura 7.11).

Se evaluó la expresión de la proteína Sr-GroEL en cada una de las cuatro colonias analizando el patrón de proteínas de cada colonia antes y después de inducir la expresión del vector pET22b+Sr-groEL. Esto con la finalidad de elegir a la colonia que presentara la mayor expresión de la proteína. Se observó que en los cuatro casos ocurrió la expresión, pero se eligió la colonia 2 por ser la que presentó mejor expresión de proteína (Figura 7.12).

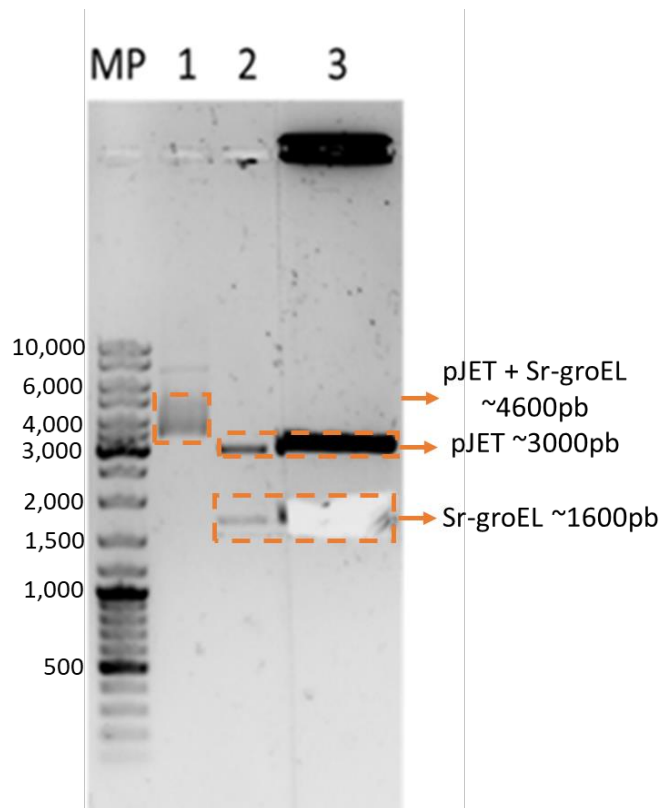


Figura 7.10. Confirmación de la ligación del gen Sr-groEL en el vector pJET mediante para corte de banda del fragmento Sr-groEL mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La banda del fragmento Sr-groEL clonado se cortó para la purificación y obtención del ADN del gen Sr.groEL, 1: Construcción pJET + Sr-groEL, 2: Digestión de pJET-Sr-groEL, 3: Digestión para purificación de banda correspondiente a gen Sr-groEL. MP: Marcador de peso molecular (pb)

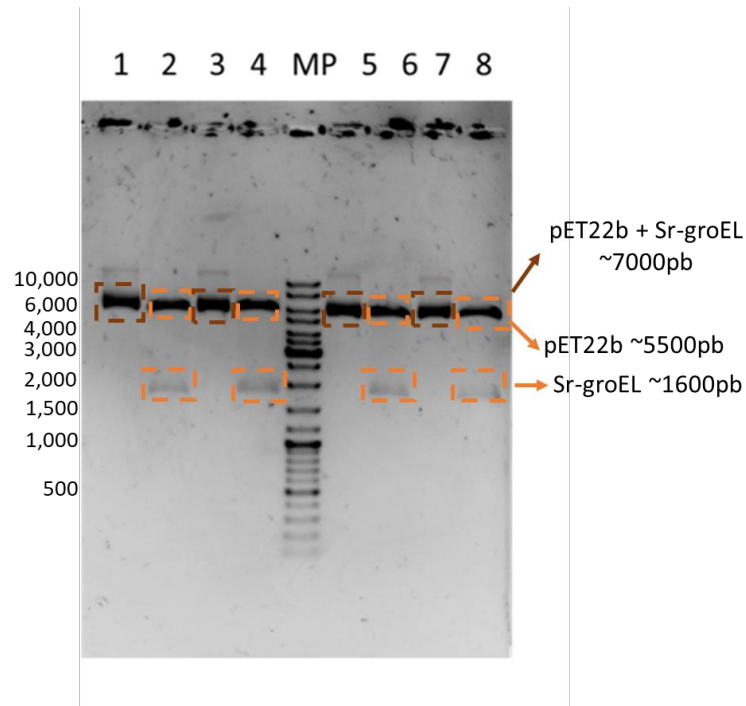


Figura 7.11. ADN de las colonias transformadas que contienen la construcción pET22b + Sr-groEL evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. 1: pET22b + Sr-groEL de la colonia 1, 2: Digestión de pET22b + Sr-groEL de la colonia 1, En los carriles 3-4, 5-6 y 7-8 se observan los mismos tratamientos, pero para las colonias 2,3 y 4 respectivamente.

Se realizó la identificación de la proteína sobreexpresada por la colonia 2 tras la inducción con IPTG del vector de expresión con IPTG, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, encontrándose mediante este análisis que corresponde a la copia 2 del gen que codifica para la proteína Sr-GroEL. Esta colonia se utilizó para inocular medio LB en volúmenes de un litro para obtener cantidades del orden de miligramos de la proteína Sr-GroEL y continuar con el protocolo de purificación.

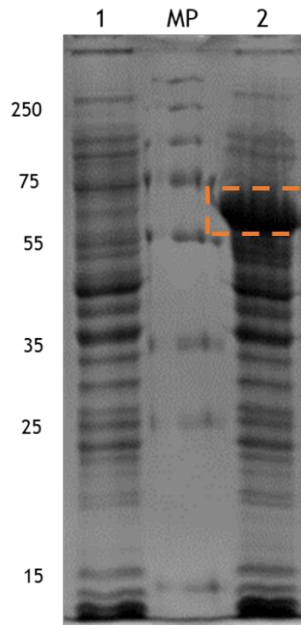


Figura 7.12. Expresión de Sr-GroEL a partir de la inducción de la colonia 2 observada en un gel de electroforesis SDS-PAGE 12 % acrilamida. 1: Antes de inducir la expresión de GroEL con IPTG. 2: Después de inducir la expresión de GroEL con IPTG. MP: Marcador de peso molecular (kDa). Se puede observar la banda de Sr-GroEL marcada en el recuadro

## 7.6. Purificación de la proteína GroEL

El protocolo utilizado para obtener a la proteína GroEL con un alto grado de pureza inició con la biomasa correspondiente a 1 litro de medio de cultivo con la bacteria transformada y consistió fundamentalmente en el uso de tres tipos de separaciones cromatográficas.

La proteína GroEL no contiene triptófanos en su secuencia primaria y por lo tanto no presenta una señal observable por espectrofotometría UV-Vis, que es la técnica con la que conumente se detecta el avance en la purificación de este tipo de biomoléculas. Por este motivo no se presentan en esta sección los cromatogramas resultantes de las etapas de purificación y sólo se muestran los resultados obtenidos mediante electroforesis, que en este caso se convierte en la técnica de seguimiento de las distintas fracciones cromatográficas. En el Apéndice D se muestran los cromatogramas obtenidos.

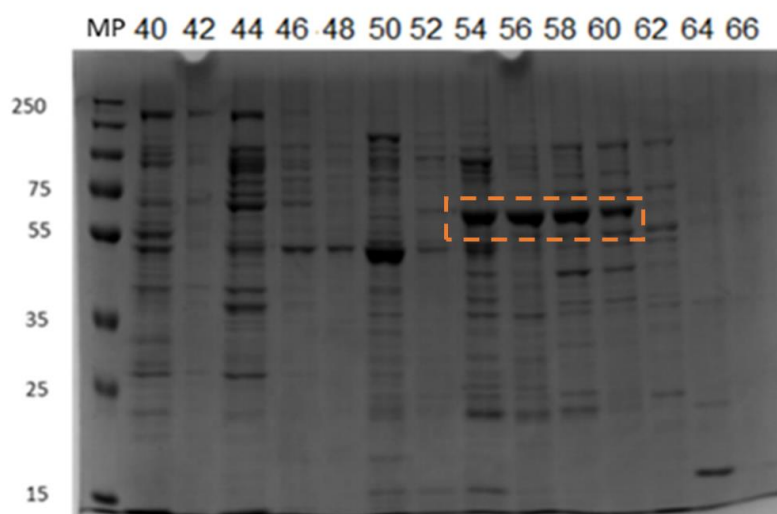


Figura 7.13. Fracciones resultantes del primer paso del proceso de purificación de la proteína GroEL mediante cromatografía de interacciones hidrofóbicas. El primer carril (MP) muestra el marcador de peso molecular (kDa). El número sobre cada uno de los siguientes carriles corresponde a la fracción cromatográfica analizada. Se puede observar a la proteína de 60 kDa en las fracciones 54 a la 60 marcadas en el recuadro, Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida.

La cromatografía de interacciones hidrofóbicas permitió separar a las proteínas cuyos residuos hidrofóbicos interactúan con la resina, entre la que se encuentra GroEL, de aquellas cuyos residuos no interactúan con la resina. Para identificar a las fracciones que mayoritariamente contienen a la proteína GroEL se prepararon geles de electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida de cada una de las fracciones cromatográficas resultantes. En la figura 7.13 se muestran los resultados correspondientes a las fracciones 40 a 66. Los resultados de la electroforesis muestran que la proteína se encuentra entre las fracciones 53 a 60. Estas fracciones se colectaron, se concentraron hasta un volumen de 3.0 mL y se dializaron para retirar el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  presente en la muestra que podría interferir en el proceso de purificación.

En la segunda etapa de purificación se utilizó la cromatografía de intercambio aniónico a un pH de 5.5, un valor que es superior al punto isoelectrico teórico de la proteína GroEL que es de 4.15. En esta etapa se encontró a la proteína GroEL en las fracciones 29 a 37 como se evidencia en la figura 7.14, en la que se muestra la separación mediante electroforesis de las fracciones 30 a 36. Como en la etapa anterior, las fracciones que contienen mayoritariamente a la proteína se concentraron hasta 3.0 mL y se dializaron para retirar el exceso de NaCl para el siguiente paso de purificación.

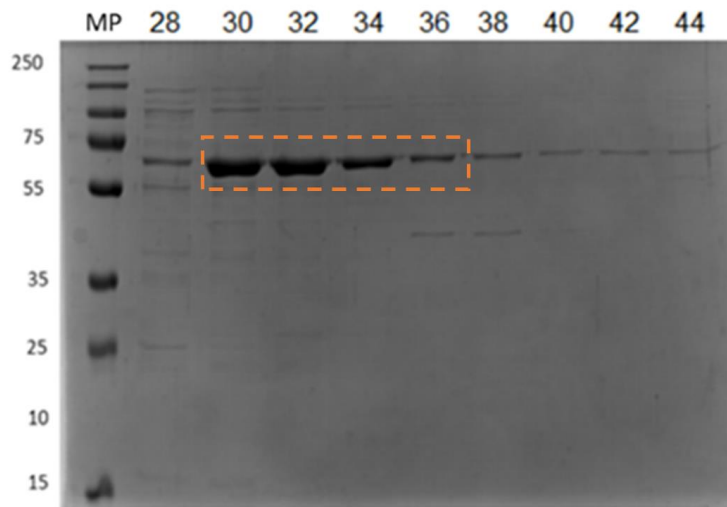


Figura 7.14. Fracciones resultantes del proceso de purificación de la proteína GroEL mediante cromatografía de intercambio aniónico. El primer carril (MP) se muestra el marcador de peso molecular (kDa). El número sobre cada uno de los siguientes carriles corresponde a la fracción cromatográfica analizada. Se puede observar a la proteína de 60 kDa en las fracciones 30 a la 36 marcadas en el recuadro. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida.

Para la última etapa del protocolo de purificación se utilizó la cromatografía de exclusión molecular en la que se utilizó una malla molecular con un tamaño de poro de 200 kilo Daltones (kDa). Se eligió este tipo de cromatografía para separar a las proteínas que pudieran estar

presentes aún después de haber realizado las etapas anteriores de purificación, pero que por su tamaño molecular fueran distintas a la proteína de interés. De esta manera se estaría obteniendo una muestra homogénea, en términos de tamaño, de la proteína GroEL. Este es un aspecto indispensable para el último objetivo del presente proyecto, lograr la cristalización de la proteína GroEL pura.

Para la última etapa del protocolo de purificación se utilizó la cromatografía de exclusión molecular en la que se utilizó una malla molecular con un tamaño de poro de 200 kilo Daltones (kDa). Se eligió este tipo de cromatografía para separar a las proteínas que pudieran estar presentes aún después de haber realizado las etapas anteriores de purificación, pero que por su tamaño molecular fueran distintas a la proteína de interés. De esta manera se estaría obteniendo una muestra homogénea, en términos de tamaño, de la proteína GroEL. Este es un aspecto indispensable para el último objetivo del presente proyecto, lograr la cristalización de la proteína GroEL pura.

La figura 7.15 muestra los resultados correspondientes a las fracciones 24 a 32, encontrándose a la proteína GroEL pura en las fracciones 26 a 29. Esto significa que se está recuperando una biomolécula que tiene un peso molecular superior a los 200 kDa, lo cual en este caso podría significar que la proteína GroEL se encontraría al menos en una conformación trimérica. Hay que recordar que en su forma nativa GroEL está formada por dos anillos cada uno de los cuales contiene siete monómeros de GroEL. Cada monómero tiene un peso molecular de 60 kDa, por lo tanto, una estructura mayor a 200 kDa correspondería con tres de estos monómeros o más. La proteína purificada se concentró a 10 mg/mL y se conservó a 4 °C.

El hecho de contar con la proteína GroEL pura permite realizar estudios más detallados como es intentar cristalizarla para estar en posibilidades de estudiar su estructura tridimensional y con la información obtenida poder argumentar sobre su papel en la haloadaptación de la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber*.

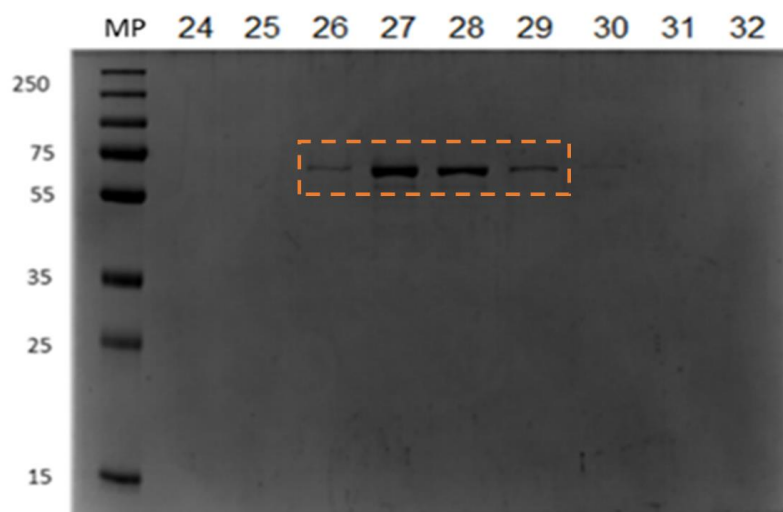


Figura 7.15. Fracciones resultantes del proceso de purificación de la proteína GroEL mediante cromatografía de exclusión molecular. El primer carril (MP) se muestra el marcador de peso molecular (KDa). El número sobre cada uno de los siguientes carriles corresponde a la fracción cromatográfica analizada. Se puede observar a la proteína de 60 kDa en las fracciones 26 a la 29 marcadas en el recuadro. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida.

### 7.7. Cristalización de la proteína GroEL

Con la proteína GroEL purificada se probaron las condiciones de cristalización que ofrecían los paquetes comerciales descritos en la sección 6.8. Se utilizó la técnica de mezcla directa de la proteína con el precipitante (*microbatch*), a una temperatura 18 °C. Se probaron un total de 418 pruebas de cristalización encontrándose que en 18 de ellas crecieron cristales. En la mayoría de estas 18 condiciones los cristales son muy pequeños, con un alto grado de nucleación y con forma de agujas. Estas características corresponden con cristales de baja calidad. En el Apéndice E se muestran imágenes del tipo de cristales obtenidos. Afortunadamente también se encontraron cristales con características, formas y tamaños adecuados para ser difractados como los que se muestran en la figura 7.16, los cuales serán difractados en un sincrotrón para poder obtener el patrón de difracción con la mayor resolución posible. Las estructuras de complejos de GroEL reportadas en la base de datos del *Protein*



*Data Bank* (PDB) presentan resoluciones inferiores a 2.7 Å de resolución, que representa una baja resolución.

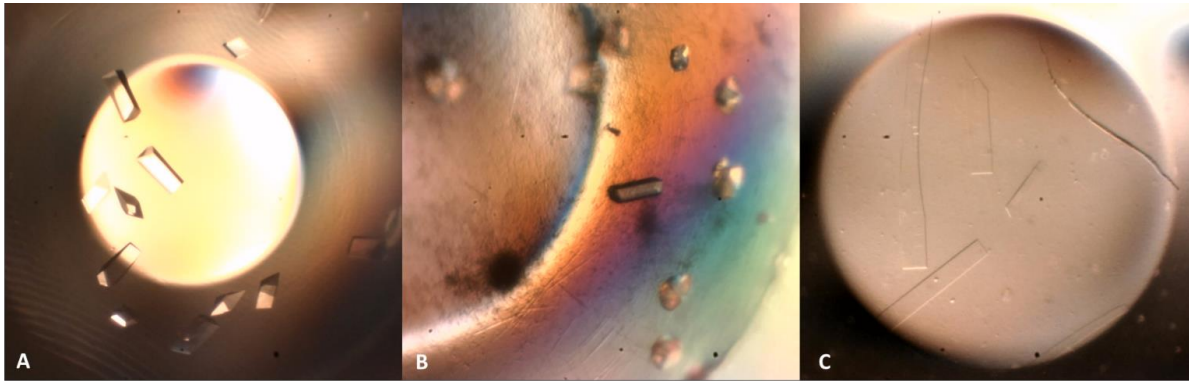


Figura 7.16. Cristales obtenidos en la condición 30 del paquete comercial Wizard II (A), la condición 3 del paquete comercial Wizard III (B) y la condición 11 del paquete comercial Index II (C).

Las mejores condiciones de cristalización (Figura 7.16) encontradas corresponden con la condición 30 del paquete comercial Index 30 que contiene 20% de 1,4-butanediol, 100 mM de imidazol a un pH de 8.0 y 200 mM de acetato de zinc, con la condición 3 del paquete comercial Wizard II que contiene 3,350 de polietilenglicol y 200 mM de formiato de magnesio, y por último con la condición 11 del paquete comercial Index II que contiene 0.2 M de cloruro de magnesio hexahidratado, 0.1 M de HEPES a un pH de 7.5 y 22% de ácido poliacrílico sal de sodio 5,100.

El interés de estudiar estructuralmente a la proteína GroEL surgió cuando se encontró que esta proteína se sobreexpresa al someter a *Salinibacter ruber* a condiciones de estrés osmótico originadas por una disminución de NaCl, cuya concentración se llevó a la mínima de crecimiento (1.7 M) y al medio no se le agregó MgSO<sub>4</sub>. Dado que *S. ruber* es una bacteria halófila extrema, su condición de óptimo crecimiento es 3.3 M de NaCl. En el mencionado estudio se compararon las secuencias de aminoácidos de las proteínas GroEL de la halófila

moderada *Cobetia marina*, de la bacteria mesófila *Escherichia coli* y de la bacteria halófila extrema *S. ruber*, encontrándose en ésta última un fragmento de 10 aminoácidos adicionales en el carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína (Miranda, 2015). Hasta el momento, existen reportes en la literatura en los que se propone que el fragmento C-terminal está implicado en los procesos de interacción y de plegamiento de la proteína con su sustrato (Weaver 2014). También se ha reportado que esta región puede modificar la estabilidad de la proteína en condiciones de baja temperatura (Nakamura 2004). Por lo tanto, es de nuestro interés conocer si este fragmento pudiera tener algún efecto en la haloadaptación de *S. ruber* ante condiciones de estrés.

*Salinibacter ruber* posee dos copias de la proteína GroEL en su genoma. Si se compara la secuencia mediante un alineamiento realizado en la plataforma *T-coffee* a partir de las secuencias de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por National Center for Biotechnology Information) de la proteína GroEL de *S. ruber* con la GroEL de otras bacterias cercanas filogenéticamente, además de GroEL de *Escherichia coli*, un organismo mesófilo, *Deinococcus radiodurans* y *Thermus thermophilus*, bacterias extremófilas, se encuentra que este fragmento adicional del C-terminal solo se presenta en los miembros cercanos a *S. ruber*, en los que además se presenta un porcentaje mayor al 90% de identidad entre sus secuencias como se puede evidenciar en los alineamientos presentados en la figura 7.17, lo que hace además suponer que este cambio en la secuencia es, al parecer, único en este linaje de bacterias halófilas extremas.

El interés en lograr la cristalización de la proteína GroEL y con ello el patrón de difracción de su estructura permitirá estudiar con detalle las modificaciones estructurales que le están permitiendo contender con las condiciones experimentales de estrés a las que es expuesta. En el caso específico del presente proyecto, a las condiciones de estrés que pueden asociarse con las sales sulfatadas que están presentes en el océano de agua líquida del satélite Europa.

260 270 280 290 300 310 320 330 340  
S.ruber LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
S.ruber2 LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
S.altiplanensis LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
S.lutea LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
S.iranica LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
C.tepidum LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
C.amphilecti LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
M.xanthus LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
E.coli LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
T.thermophilus LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
G.stearothermophilus LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
A.capsulatum LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
D.radiodurans LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE  
consensus>70 LLI IAE DVE GEALATLVVN KMRG LK S AVKAPGGDRR QSMIEDI A VLTGGT VISEE KGYR LENATLDY LGQADRVTT DQDNTTI GCE

350 360 370 380 390 400 410 420 430  
S.ruber GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
S.ruber2 GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
S.altiplanensis GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
S.lutea GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
S.iranica GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
C.tepidum GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
C.amphilecti GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
M.xanthus GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
E.coli GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
T.thermophilus GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
G.stearothermophilus GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
A.capsulatum GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
D.radiodurans GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT  
consensus>70 GSEEEIEARNVQIRQIANSSTSDYDQEKLQERLAKLAGGVAVNVGANTPEMKAQKALVEDASATRAAVDEGLVPPGGVAYLRALESIT

440 450 460 470 480 490 500 510 520  
S.ruber EEV.E.VEEDQEIIGSIVREALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
S.ruber2 EEV.E.VEEDQEIIGSIVREALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
S.altiplanensis EEV.E.VEEDQEIIGSIVREALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
S.lutea EDV.D.VEEDQEIIGSIVREALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
S.iranica EDV.D.VEEDQEIIGSIVREALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
C.tepidum AKV.A.DVEEDQKTHGAIIRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
C.amphilecti VDK.G.DNEEDQTHGAIIRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
M.xanthus DGQ.Q.LSGGKFGVDIIRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
E.coli AGK.G.VEEDQNHGQIIRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
T.thermophilus EEI.IKKLEEDQATGKIVRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
G.stearothermophilus AAJ.E.AEGDEATGKIVRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
A.capsulatum DEI.IKTLGDEKIGQIIRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
D.radiodurans RKAAESLGGDEATGKIVRRALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG  
consensus>70 EEV.E.VEEDQEIIGSIVREALAPRRIAEVTEGH.EGSIIVQKVR DG.EDGFENARTEE G.DLLDQGLIDPTKVRSAFENASVVG

1 10 20 30 40 50 60 70 80  
S.ruber MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
S.ruber2 MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
S.altiplanensis MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
S.lutea MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
S.iranica MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
C.tepidum MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
C.amphilecti MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
M.xanthus MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
E.coli MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
T.thermophilus MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
G.stearothermophilus MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
A.capsulatum MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
D.radiodurans MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA  
consensus>70 MSKNPPDLSGGEVKAQKIFDSDARSALQEGVDQMAEAVKVTLGGPGRNVVLEKSGFAPTIKDGVTVAKEIEERLPLNGAQLKKA

90 100 110 120 130 140 150 160  
S.ruber ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
S.ruber2 ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
S.altiplanensis ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
S.lutea ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
S.iranica ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
C.tepidum ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
C.amphilecti ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
M.xanthus ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
E.coli ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
T.thermophilus ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
G.stearothermophilus ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
A.capsulatum ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
D.radiodurans ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD  
consensus>70 ASKTNDDGDCSTTATVLAQSVINAGKMSVTSGANPMDVKRGTIAAAEVVTH...LRNQSDVVEGKDRISVAITSAINDD

170 180 190 200 210 220 230 240 250  
S.ruber AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
S.ruber2 AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
S.altiplanensis AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
S.lutea AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
S.iranica AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
C.tepidum AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
C.amphilecti AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
M.xanthus AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
E.coli AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
T.thermophilus AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
G.stearothermophilus AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
A.capsulatum AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
D.radiodurans AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP  
consensus>70 AICDLIADAFERVQDGVITVEARGIETYLDDVVEGMQFDRGLSPYFVDSSEMEAVLEDAILLYDDEGNMQLLPLLEKVSQSNP

	530	540	550	560	570
<i>S. ruber</i>	GMLLTTEAVIADLEDEDDDDGGG.G...GGGGMPA	GGA	GMG	GM	GGM
<i>S. ruber2</i>	GMLLTTEAVIADLEDEDDDDGGG.G...GGGGMPA	GGA	GMG	GM	GGM
<i>S. altiplanensis</i>	GMLLTTEAVIADLEDEDDDDGGG.G...GGGGMPA	GGA	GMG	GM	GGM
<i>S. lutea</i>	GMLLTTEAVIADLSEDDDDGGGGGAAGAGGGMPA	GA	GMG	GM	GGM
<i>S. iranica</i>	GMLLTTEAVIADLSEDDDDGGGGGAAGAGGGMPA	GA	GMG	GM	GGM
<i>C. tepidum</i>	SILLTTEAAITDVKEDKA.....D.MPA	M	FP	G	GM
<i>C. amphilecti</i>	GLMLTTECMIAEDPEDKA.....AA.G	G	DMG	GM	GGMGGM
<i>M. xanthus</i>	SLMLTTEAMVAERPKKEK.....D.LPA	G	GMG	GM	GGMGGM
<i>E. coli</i>	GLMLTTEAMVAEAPKKKE.....P.MPA	G	GMG	GM	GGMDF
<i>T. thermophilus</i>	ALLILTTEAVVAEKPEKKE.....S.TPA	S	A	CA	CDM
<i>G. stearothermophilus</i>	AMFLTTEAVVADKPEENK.....GGNPG	M	P	DM	GGM
<i>A. capsulatum</i>	GLMLTTEAMVAEIQEPKA.....APA	A	PHG	GM	EGM
<i>D. radiodurans</i>	ALLILTTEAVVSDKPEKAA.....P.MPQ	G	DMG	GM	GGM
<i>consensus&gt;70</i>	.mlLTTEa.la#.....pa.....g.....gm.....ggm..				

Figura 7.17. Comparación de la proteína GroEL de *S. ruber* contra el de otras bacterias tanto mesófilas como extremófilas. Se puede observar en el grupo carboxilo terminal las diferencias en los aminoácidos.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente proyecto de investigación se evaluó el crecimiento de la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* en diferentes condiciones que recrean los posibles escenarios salinos del océano de agua líquida propuesto para el satélite Europa, se identificó y cuantificó al soluto compatible betaína que la bacteria utiliza como una estrategia de haloadaptación y se buscaron las condiciones de cristalización de la proteína GroEL que se expresa de manera distinta en las condiciones nominales de crecimiento y cuando la bacteria se somete a alguna condición de estrés salino.

Se encontró que *S. ruber* crece en los medios modificados con NaCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y combinaciones 1:1 y 2:1 de estas dos últimas sales sulfatadas. Las condiciones de óptimo crecimiento se encontraron en 3.3 M de NaCl, 1.5 M de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 M de MgSO<sub>4</sub>:Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1 y 1.5 M de MgSO<sub>4</sub>:Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2:1. Basados en la información observacional y experimental de la composición salina del océano de agua líquida del satélite Europa y en las condiciones salinas en las que *S. ruber* presenta crecimiento se puede concluir que ésta bacteria halófila extrema tendría la capacidad de desarrollarse en el océano de Europa apelando únicamente a las condiciones de salinidad propuestas. Esta capacidad de adaptación es de sumo interés, ya que permite entender las posibilidades de que la vida terrestre pueda adaptarse a escenarios de interés astrobiológico fuera de la Tierra, como lo es justamente el océano salado de agua líquida del satélite Europa.

Se profundizó en el estudio de las estrategias de haloadaptación que utiliza *S. ruber* para contender contra el estrés que le generan las diferentes condiciones salinas evaluadas. Este estudio se concentró en las condiciones salinas de óptimo crecimiento. Se encontró que *S. ruber* acumula cantidades específicas de betaína en función del tipo de sal con que se modifique el medio nominal. La mayor cantidad de betaína fue de 6.28 µg de betaína por mg biomasa seca en la condición correspondiente a 3.3 M de NaCl, seguida de 5.03 µg de betaína por mg biomasa seca en la condición correspondiente a 1.0 M de MgSO<sub>4</sub>:Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:1. La menor cantidad de betaína fue de 0.73 µg de betaína por mg biomasa seca en la condición

correspondiente a 1.5 M de  $\text{MgSO}_4:\text{Na}_2\text{SO}_4$  2:1. Se encontró que la presencia de betaína en el medio no tiene un efecto favorecedor en el crecimiento de *S. ruber*, ya que la adición de las concentraciones finales de 5.0 y 10.0 mM de betaína a los medios de cultivo con las condiciones salinas de óptimo crecimiento genera un aumento en la presión osmótica, por lo tanto, una disminución en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), lo que significa que esta adición no ayuda a mejorar el crecimiento bacteriano. Se observó también que al adicionar betaína a los medios modificados, se encuentra una mayor cantidad de betaína acumulada.

Este aumento en la cantidad de betaína acumulada cuando el soluto compatible se encuentra más disponible en el medio, en conjunto con la ausencia de los genes necesarios para la síntesis *de novo* del soluto compatible, indican que *S. ruber* utiliza como mecanismo de acumulación a la internalización del soluto compatible que encuentre disponible en el exterior de su citoplasma.

Se detectó también que *S. ruber* presenta una expresión diferencial de proteínas, específicamente del complejo proteico GroEL-GroES, cuando se somete a diferentes condiciones salinas, lo cual corresponde con otra estrategia de haloadaptación. Se desarrolló un sistema de expresión heterólogo y un protocolo de purificación de la proteína GroEL, basado en técnicas cromatográficas. Esto permitió explorar diferentes condiciones de cristalización para obtener cristales de GroEL. Estos cristales, en conjunto con la técnica de difracción de rayos X, permitirán identificar cambios estructurales que permitan explicar cómo es que GroEL puede estar asociada a los procesos de haloadaptación en *S. ruber*, además de proporcionar más evidencias de la importancia de una secuencia adicional de aminoácidos presente en el carboxilo terminal de la proteína GroEL de *S. ruber*.

Los resultados del presente proyecto de investigación demuestran que *S. ruber* posee la habilidad y mecanismos para adaptarse a las condiciones salinas simuladas del océano de Europa. Los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con propuestas de temperaturas de hasta 4 °C en algunos ambientes en el interior del océano, presencia de oxígeno disuelto cerca de la superficie, y estimaciones de la entrada de aproximadamente  $10^{12}$  Kg de carbono

al año proveniente de cometas y meteoritos (Chyba y Phillips, 2002; Hand y Chyba, 2007), posicionan al océano salado de Europa como un ambiente donde podría subsistir alguna forma de vida.

## 8. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente proyecto se pueden proponer algunos temas que permitirían ampliar el conocimiento sobre la capacidad de las bacterias halófilas para adaptarse a escenarios con condiciones salinas impuestas por sales distintas al NaCl, mismos que pueden encontrarse en la Tierra o fuera de ella como es el caso de por ejemplo los océanos de los satélites helados o la superficie del planeta Marte.

Se sugiere estudiar con más detalle lo relativo a la acumulación de solutos compatibles, para determinar, por ejemplo, si existe una cantidad límite que algunas bacterias halófilas puedan acumular, así como evaluar cómo es que la acumulación de los solutos compatibles compite con la acumulación de KCl desde el punto de vista del gasto energético y del de la capacidad bacteriana para soportar altas concentraciones de solutos compatibles en su citoplasma.

Con respecto a la proteína GroEL, la perspectiva inmediata es la obtención de cristales de buena calidad para obtener los patrones de difracción que permitan determinar la estructura protéica. Este resultado en conjunto con el análisis del papel del fragmento adicional de aminoácidos en el C-terminal de Sr-GroEL permitirán encontrar evidencias sustantivas del rol de esta proteína en la adaptación bacteriana al estrés salino.

Se propone también estudiar los cambios en el proteoma de *S. ruber* cuando se hace crecer en diferentes condiciones salinas, con la intención de identificar que otras proteínas, diferentes a GroEL, pueden estar implicadas en su proceso de haloadaptación. Esto se puede realizar mediante análisis del proteoma de *S. ruber* cuando se somete a diferentes sales y concentraciones de estas.



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackers, G. B. 1970. Analytical gel chromatography of proteins. *Advances in protein chemistry*, 24, 343–466.
- Amero, C. 2014. *Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear de Proteínas*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Editorial Prado.
- Anderson, J. D., Schubert, G., Jacobson, R. A., Lau, E. L., Moore, W. B., y Sjogren, W. L. 1998 Europa's Differentiated Internal Structure: Inferences from Four Galileo Encounters. *Science*, 281(September 1998), 2019–2023.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez, F., Amann, R., y Rosselló-Mora, R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 485–491.
- Antón, J., Peña, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-kopplin, P., y Rosselló-mora, R. 2008. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline systems*, 4(15), 1–10.
- Baati, H., Gharsallah, N., Ammar, E., Sghir, A., y Jarboui, R. 2011. Molecular community analysis of magnesium-rich bittern brine recovered from a Tunisian solar saltern. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(12), 975–981.
- Barker, S. A. 2007. Matrix solid phase dispersion (MSPD) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (70), 151–162.
- Beegle, L. W., Wilson, M. G., Abilleira, F., Jordan, J. F., y Wilson, G. R. 2007. A concept for NASA's Mars 2016 Astrobiology Field Laboratory. *Astrobiology*, 7(4), 545–577.
- Blumberg, B. S. 2003. The NASA Astrobiology Institute: Early History and Organization. *Astrobiology*, 3(3), 463–470.
- Botcharova, M. 1974. Earth's Extremophiles and Astrobiological Implications. *CoMPLEX Case Essay*, 1–19.
- Brown, M. E., y Hand, K. P. 2013. Salts and radiation products on the surface of Europa, *The Astronomical Journal*, (145), 110-117.
- Carlson, R. W. 2012. Sulfuric Acid on Europa and the Radiolytic Sulfur Cycle, *Science*, (286) 97-99.
- Carr, M. H., Belton, M. J., Chapman, C. R., Davies, M. E., Geissler, P., Greenberg, R., y Veverka, J. 1998. Evidence for a subsurface ocean on Europa. *Nature*, 391, 363–365.
- Cavicchioli, R. 2002. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2(3), 281–292.
- Chyba, C. F., y Hand, K. P. 2005. Astrobiology: The Study of the Living Universe. *Annual Review of Astronomy and Astrophysics*, 43(1), 31–74.
- Chyba, C. F., y Phillips, C. B. 2002. Europa as an Abode of Life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 32, 47–68.

- Cockell, C. S., Bush, T., Bryce, C., Direito, S., Fox-Powell, M., Harrison, J., Zorzano, M. 2016. Habitability: A Review. *Astrobiology*, 16(1), 89–117. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1295>
- DasSarma, S., y DasSarma, P. 2012. Halophiles. *eLS*. 1-11
- DasSarma, S., y DasSarma, P. 2015. Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 120–126.
- del Río Portilla, J. F. 2003. Resonancia Magnética Nuclear. *Mensaje Bioquímico*, XXVII, 65–83.
- Deleanu, C., y Paré, J. R. J. 1997. Chapter 6 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR): Principles and Applications. *Instrumental Methods in Food Analysis*. 179-237
- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F., y Cassidy, C. S. 2001. Enzymes from extremophiles, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 30, 397-420.
- Des Marais, D. J., Nuth, J. A., Allamandola, L. J., Boss, A. P., Farmer, J. D., Hoehler, T. M., y Spormann, A. M. 2008. The NASA Astrobiology Roadmap. *Astrobiology*, 8(4), 715–730.
- Des Marais, D. J., y Walter, M. R. 1999. Astrobiology: exploring the origins, evolution, and distribution of life in the Universe. *Annual review of ecology and systematics*, 30, 397–420.
- Domagal-Goldman, S. D., Wright, K. E., Anderson, R., Arney, G., y Walker, S. I. 2016. The Astrobiology Primer v2.0. *Astrobiology*, 16(8), 561–653.
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., y Huyop, F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 1–23.
- Empadinhas, N., y Da Costa, M. S. 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11(3), 151–161.
- Fernandez, B., y Müller, A. 2017. Serie inversa de Hofmeister en poliuretano catiónico y diversos aniones monovalentes. *Revista iberoamericana de polímeros*, 18(1), 9–20.
- Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources, *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(6), 518–525.
- Galinski, E. 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 49, 487–496.
- González, M., Silva, D., Hernández, I., Vázquez, E., y Sosa, A. 2005. La Estructura y la Visualización Molecular de Proteínas. *Mensaje Bioquímico*, XXIX, 157–180.
- Grant, W. D. 2004. Life at low water activity, *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 94 (6), 518-525.
- Hand, K. P., Carlson, R. W., y Chyba, C. F. 2007. Energy, Chemical Disequilibrium, and Geological Constraints on Europa. *Astrobiology*, 7(6), 1006–1022.
- Hand, K. P., y Chyba, C. F. 2007. Empirical constraints on the salinity of the europa ocean and implications for a thin ice shell. *Icarus*, 189, 424–438.

- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., y Hartl, F. U. 2016. The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62–76.
- Hibbitts, C. A., Wing, B., y Paranicas, C. 2019. Color centers in salts - Evidence for the presence of sulfates on Europa. *Icarus*.
- Izquierdo, R. 2019. Estudio de la adaptación de bacterias halófilas en presencia de cloratos y percloratos identificados en la superficie del planeta Marte. (Tesis de Licenciatura), Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Javaux, E. J. 2006. Extreme life on Earth — past, present and possibly beyond, *Research in Microbiology* 157, 37–48.
- Kargel, J. S., Kaye, J. Z., Head, J. W., Marion, G. M., Sassen, R., Crowley, J. K., y Hogenboom, D. L. 2000. Europa's Crust and Ocean: Origin, Composition, and the Prospects for Life. *Icarus*, 148, 226–265.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., y Hartl, F. U. 2013. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 82).
- Kogej, T., Gorbushina, A. A., y Gunde-Cimerman, N. 2006. Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research*, 110(6), 713–724.
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., y Gunde-Cimerman, N. 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 153(12), 4261–4273.
- Kuiper, K. F., Deino, A., Hilgen, F. J., Krijgsman, W., Renne, P. R., y Wijbrans, J. R. 2008. Synchronizing Rock Clocks, 320(April), 500–504.
- Kunčič, M. K., Kogej, T., Drobne, D., y Gunde-Cimerman, N. (2010). Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 329–337.
- Küppers, M., y Schneider, M. (2000). Discovery of chlorine in the Io torus, 27 *Geophysical Research Letters*, 27 (4), 513–516.
- Ladd, M. F. C., Marcus F. C., y Palmer, R. A., Rex A. 2003. Structure determination by X-ray crystallography.
- Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., y Hartl, F. U. 1992. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *The EMBO Journal*, 11(13), 4757–4765.
- Lawrence, B. (1968). X-Ray crystallography. *Scientific American*, 219(1), 58–74.
- Ligier, N., Poulet, F., Carter, J., Brunetto, R., y Gourgéot, F. (2016). VLT / SINFONI Observations of Europa: New Insights Into the Surface Composition. *The Astronomical Journal*, 151(6).
- Madern, D., Ebel, C., y Zaccai, G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 4(2), 91–98.

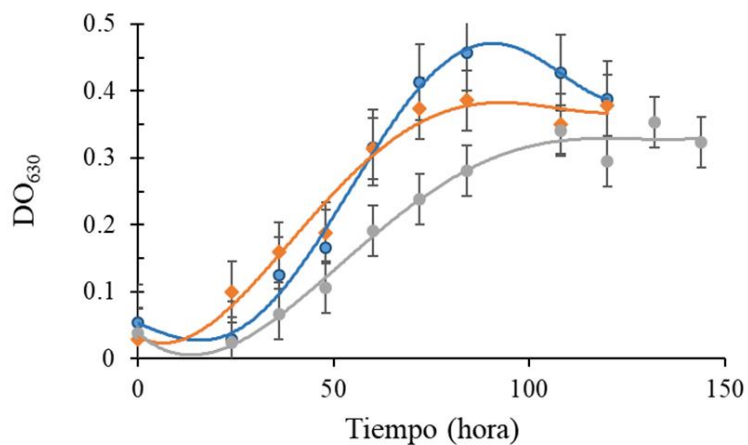
- McCord, T. B., Hansen, G. B., Fanale, F. P., Carlson, R. W., Matson, D. L., Johnson, T. V., NIMS, T. team. 1998. Salts on Europa's Surface Detected by Galileo's Near Infrared Mapping Spectrometer. *Science*, 280, 1242–1245.
- Mcperson, A. 2014. Introduction to protein crystallization IYCr crystallization series. *Acta crystallographica*, 2–20.
- Menou, K., Tabachnik, S., y Fellow, C. 2003. Dynamical habitability of known extrasolar planetary systems. *The astrophysical journal*, 583, 473–488.
- Miranda, R. (2015). Estudio de las estrategias de *Salinibacter ruber* en escenarios de interés astrobiológico (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mitri, G., y Showman, A. P. 2008. A model for the temperature-dependence of tidal dissipation in convective plumes on icy satellites: Implications for Europa and Enceladus, *Icarus*, 195, 758–764.
- Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Daugherty, S., Deboy, R. T., Wister, J., Khouri, H., Walsh, D. A. 2005. The genome of *Salinibacter ruber*: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 18147–18152.
- Morrison, D. 2001. The NASA Astrobiology Program, *Astrobiology*, 1(1), 3–15.
- Munoz, R., Rosselló-Móra, R., y Amann, R. 2016. Revised phylogeny of Bacteroidetes and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including *Rhodothermaeota* phyl. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(5), 281–296.
- Niemetz, R., Kärcher, U., Kandler, O., Tindall, B. J., y König, H. 1997. The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *European Journal of Biochemistry*, 249(3), 905–911.
- Nutman, A., Bennett, V. C., Friend, C. R. L., Kranendonk, M. J. Van, y Chivas, A. R. 2016. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*, 537(7621), 535–538.
- Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications, *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology* 28, 56–63.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity, 13, 1–13.
- Oren, A. 2013a. Life in Magnesium- And Calcium-Rich Hypersaline Environments: Salt Stress by Chaotropic Ions. En: *Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* (p. 215–232).
- Oren, A. 2013b. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *Federation of European Microbiological Societies*, 342, 1-9.
- Oren, A., Haldal, M., Norland, S., y Galinski, E. A. 2002. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 6, 491–498.
- Orosei, R., Lauro, S., Pettinelli, E., Cicchetti, A., Cosciotti, B., Di Paolo, F., y Seu, R. 2018. Radar evidence of subglacial liquid water on Mars. *Science*, 361, 490–493.

- Padrón Palomares, G. (2014). Cromatografía. Análisis y separación de Péptidos y Proteínas. En Manual de proteómica (pp. 33–55).
- Pebet, N. (2004). Resonancia Nuclear Magnética, XIII Seminario de Ing. Biomédica 2004. 1–5.
- Peterson, E., y Sober, H. A. 1956. Chromatography of Proteins. Cellulose Ion-exchange Adsorbents, *Journal of the American Chemical Society*, 78 (4), pp 751–755
- Pflüger, K., y Müller, V. 2004. Transport of Compatible Solutes in Extremophiles. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(1), 17–24.
- Pikuta, E. V, Hoover, R. B., y Tang, J. 2007. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33, 183–209.
- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., y Cabral, J. M. S. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins, 87, 143–159.
- Ramírez, S. I. 2010. Las fronteras de la vida desde la perspectiva de los extremófilos. *Inventio*, 11, 57–66.
- Rampelotto, P. H. 2013. Extremophiles and extreme environments. *Life*, 3(3), 482–485.
- Roberts, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Saline Systems*, 30, 1–30.
- Russell, M. J., Barge, L. M., Bhartia, R., Bocanegra, D., Bracher, P. J., Branscomb, E., y White, L. 2014. The Drive to Life on Wet and Icy Worlds, *Astrobiology* 14(4), 308–345.
- Schulze-Makuch, D., y Irwin, L. N. 2002. Energy Cycling and Hypothetical Organisms in Europa' s Ocean, *Astrobiology*, 2(1), 105–121.
- Showman, A. P., y Malhotra, R. 2003. The Galilean Satellites, *Science*, 286, 77–85.
- Skoog, Holler y Nieman. Fundamentos de Química Analítica. 5ª Ed. Mc Graw Hill, 2001.
- Smithies, W. R., Gibbons, N. E., y Bayley, S. T. 2010). The Chemical Composition of the Cell and Cell Wall of Some Halophilic Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1(8), 605–613.
- Smyth, M. S., y Martin, J. H. J. 2000. X Ray crystallography. *Journal of clinical pathology*, 53, 8–14.
- Spencer, J. R., y Nimmo, F. 2013. Enceladus: An Active Ice World in the Saturn System. *Annual review of Planet Science*, 41, 693–717.
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., y Pace, N. R. 1985. Characterization of a Yellowstone Hot Spring Microbial Community by 5S rRNA Sequences, *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1379–1384.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. I., y Painter, P. R. 1992. Microbiología. Editorial Reverté.
- Stern, J. C., Sutter, B., Jackson, W. A., Navarro, R., McKay, C. P., Ming, Douglas, Archer, P. D., y Mahaffy, P. R. 2017. Nitrogen on Mars: Insights from Curiosity. *Lunar and planetary Science*, XLVIII, 8–9.
- Sterner, R., y Liebl, W. 2001. Thermophilic adaptation of proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 39–106.

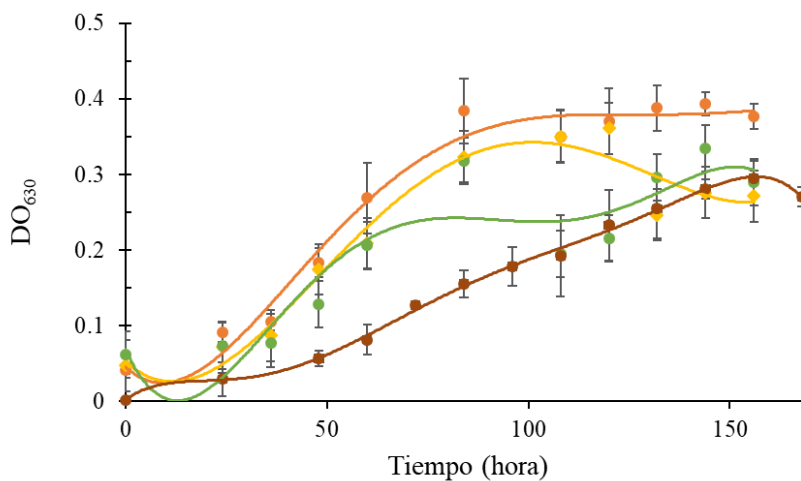
- Stevenson, A., Cray, J. A., Williams, J. P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N., y Hallsworth, J. E. 2015. Is there a common water-activity limit for the three domains of life?, 1333–1351.
- Tarter, J. 2001. The Search for Extraterrestrial Intelligence (SETI). *Annual Review of Astronomy and Astrophysics*, 39, 511–548.
- Tosca, N. J., Knoll, A. H., y McLennan, S. M. 2008. Water Activity and the Challenge for Life on Early Mars. *Science*, 320, 1204–1207.
- Trent, J. D. 2000. Extremophiles in astrobiology: per Ardua ad Astra. *Gravitational and space biology bulletin*, 13(2), 5–11.
- Vásquez, J. (2015). Caracterización química de los solutos compatibles utilizados *por Bacillus pumilus* y *Cobetia marina* mediante dispersión de matriz en fase sólida y resonancia magnética nuclear cuantitativa. Tesis de Licenciatura).
- Ventosa, A., Nieto, J. J., y Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 504–544.
- Ventosa, A., Oren, A., y Ma, Y. (2011). Halophiles and Hypersaline Environments. *Halophiles and Hypersaline Environments: Current Research and Future Trends*.
- Viver, T., Orellana, L., González-Torres, P., Díaz, S., Urdiain, M., Farías, M. E., y Rosselló-Móra, R. (2018). Genomic comparison between members of the *Salinibacteraceae* family, and description of a new species of *Salinibacter* (*Salinibacter altiplanensis* sp. nov.) isolated from high altitude hypersaline environments of the Argentinian Altiplano. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(3), 198–212.
- Vreeland, R. H., Anderson, R., y Murray, R. G. E. 1984. Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *Journal of Bacteriology*, 160(3), 879–883.
- Vu, T. H., Hodyss, R., Choukroun, M., y Johnson, P. V. 2016 Chemistry of Frozen Sodium – Magnesium – Sulfate – Chloride Brines: Implications for Surface Expression of Europa 's Ocean Composition. *The Astrophysical Journal Letters*, 816(2), 1–6.
- Weaver, J., y Rye, H. S. 2014. The C-terminal tails of the bacterial chaperonin GroEL stimulate protein folding by directly altering the conformation of a substrate protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33), 23219–23232.
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., y Jaskolski, M. 2013. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS Journal*, 280(22), 5705–5736.
- Zelenyi, L., Korablev, O., Vorobyova, E., Martynov, M., Akim, E. L., y Zakahrov, A. 2010. Europa Lander Mission: A Challenge to Find Traces of Alien Life, *Proceedings IAU Symposium*, (269), 115–129.
- Zolotov, M. Y., y Shock, E. L. (2001). Composition and stability of salts on the surface of Europa and their oceanic origin, *Journal of Geophysical research*, (106), 32815-32827.

# 10. Apéndices

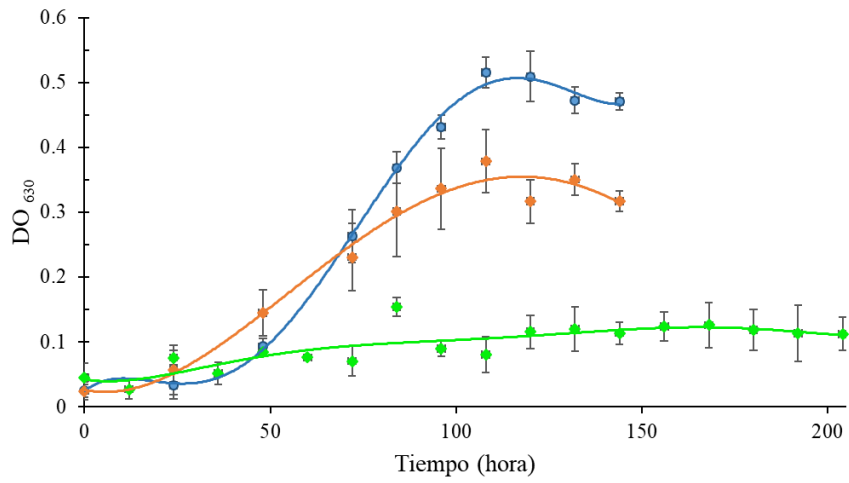
## Apéndice A: Cinéticas de crecimiento bacteriano



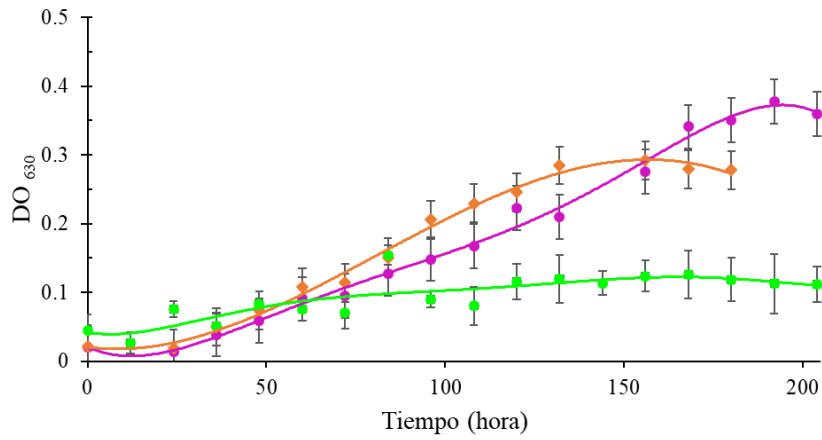
**Figura 11.1.** Cinética de crecimiento de la condición salina con NaCl. Azul: 2.2 M, Naranja: 3.3 M, Gris: 4.4 M.



**Figura 11.2.** Cinética de crecimiento de la condición salina con MgSO<sub>4</sub>. Marrón: 0 M, Naranja: 0.5 M, Amarillo: 1.0 M, Verde: 1.5 M.

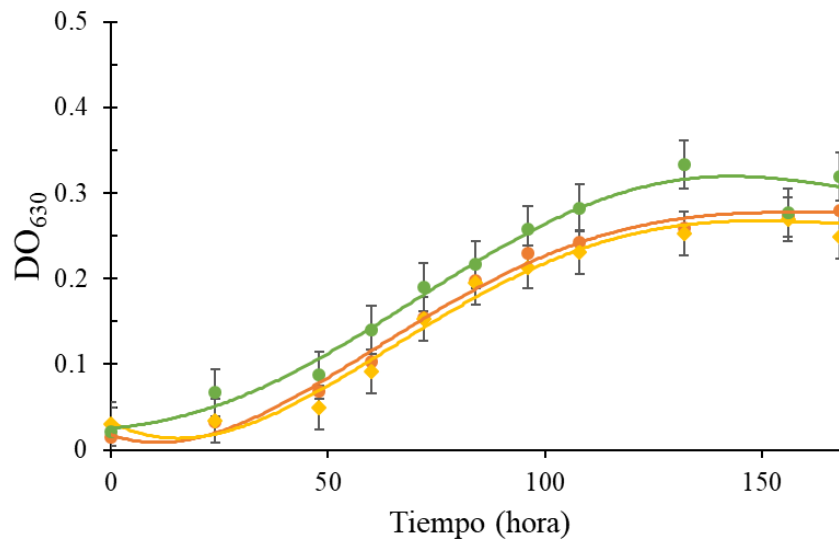


**Figura 11.3.** Cinética de crecimiento de la condición salina con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Verde: 0 M, Azul: 0.5 M, Naranja: 1.0 M.

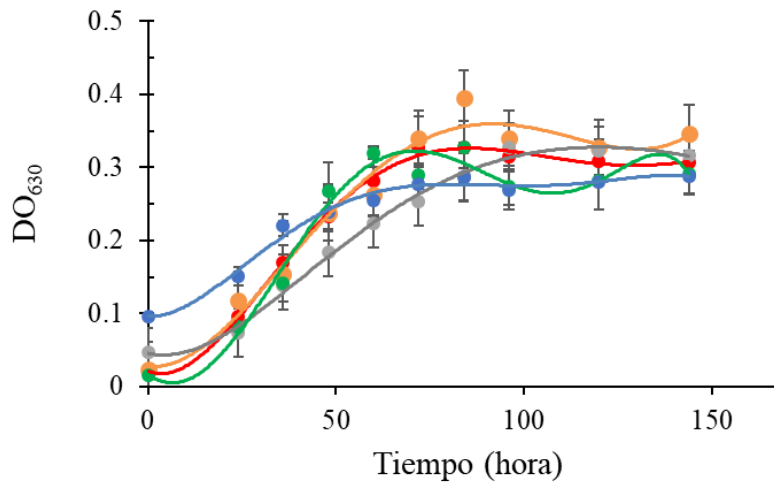


**Figura 11.4.** Cinética de crecimiento de la condición salina equimolar de MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Azul: 0.5 M, Naranja: 1.0 M, Verde: 1.5 M.

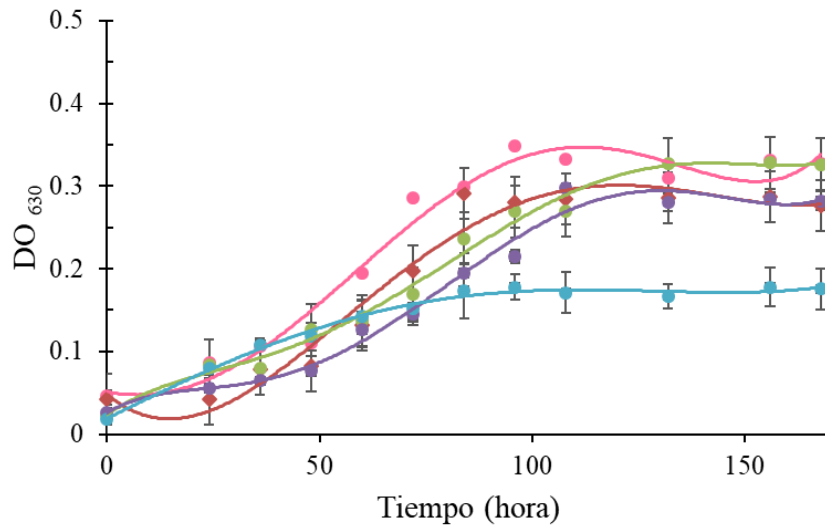




**Figura 11.5.** Cinética de crecimiento de la condición salina 2:1 de  $MgSO_4$  y  $Na_2SO_4$ . Azul: 0.5 M, Naranja: 1.0 M, Verde: 1.5 M.



**Figura 11.6.** Cinéticas de crecimiento de las condiciones de óptimo crecimiento adicionando 5 mM de betaína. Rosa: NaCl 3.3 M, Rojo:  $MgSO_4$  1.0 M. Verde:  $Na_2SO_4$  0.5 M, Morado: equimolar de  $MgSO_4$  y  $Na_2SO_4$  1.0 M. Azul: 2:1 de  $MgSO_4$  y  $Na_2SO_4$  1.5 M.



**Figura 11.7.** Cinéticas de crecimiento de las condiciones de óptimo crecimiento adicionando 10 mM de betaína. Rosa: NaCl 3.3 M, Rojo: MgSO<sub>4</sub> 1.0 M. Verde: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M, Morado: equimolar de MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M. Azul: 2:1 de MgSO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 M.

## Apéndice B: Espectros de resonancia magnética nuclear

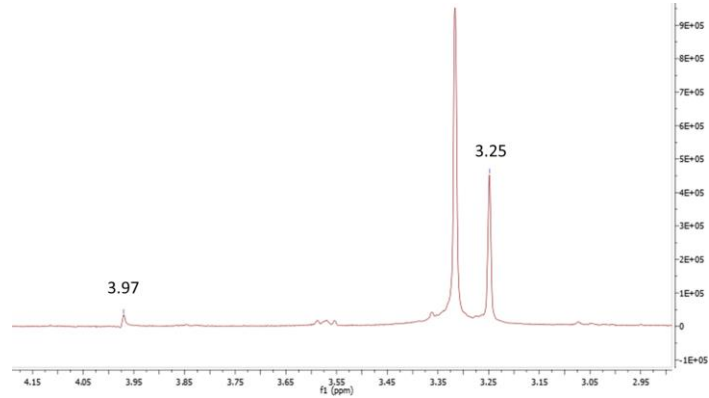


Figura 11.8. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina de NaCl 3.3 M. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

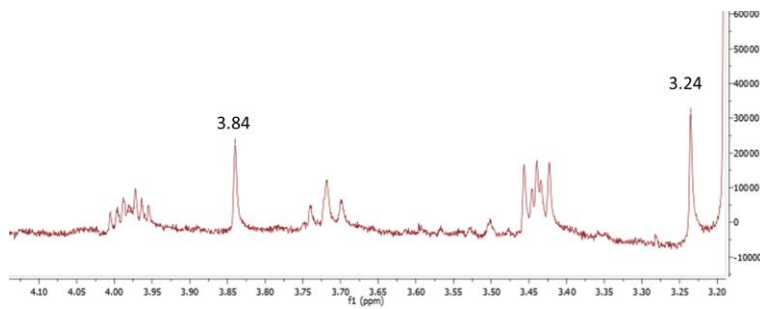


Figura 11.9. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina de MgSO<sub>4</sub> 1.0 M. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

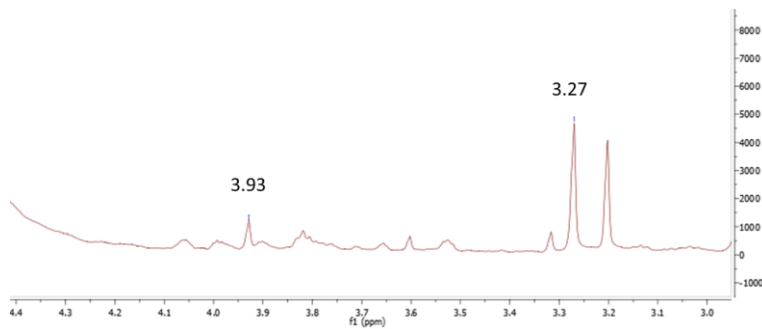


Figura 11.10. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

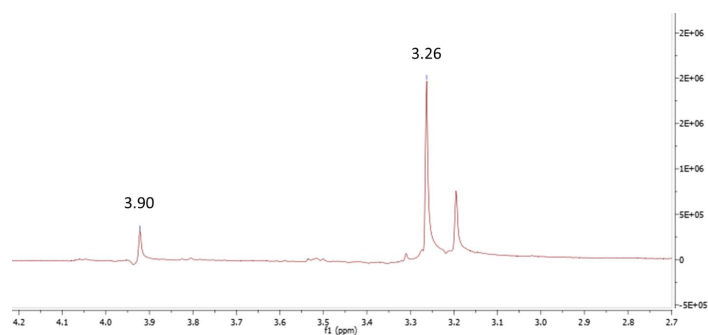


Figura 11.11. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina equimolar de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.0 M. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

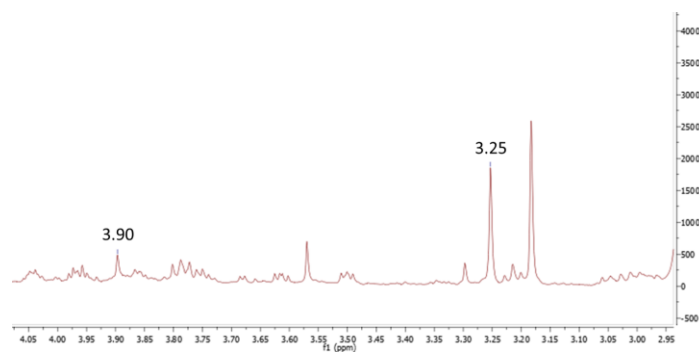


Figura 11.12. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina 2:1 de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.5 M. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

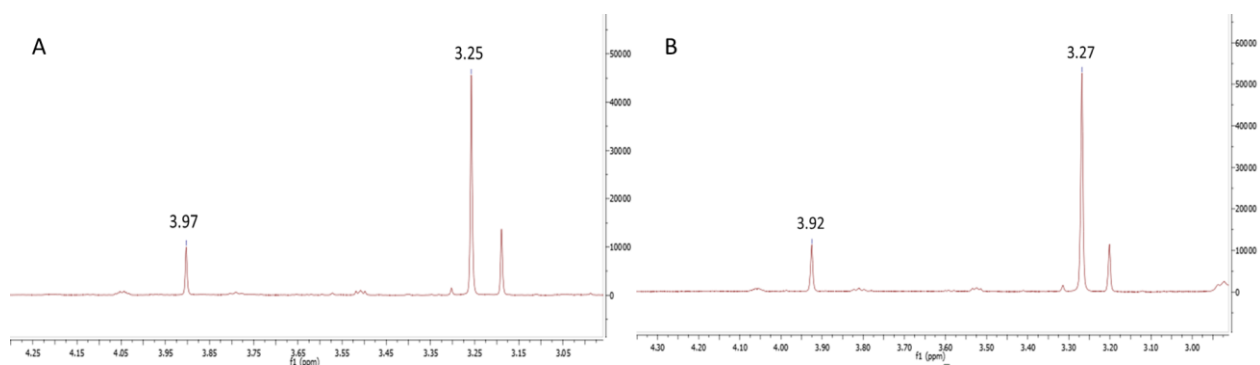


Figura 11.13. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina de  $\text{NaCl}$  3.3 M con una adición de A: 5 mM de betaína y B: 10 mM de betaína. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

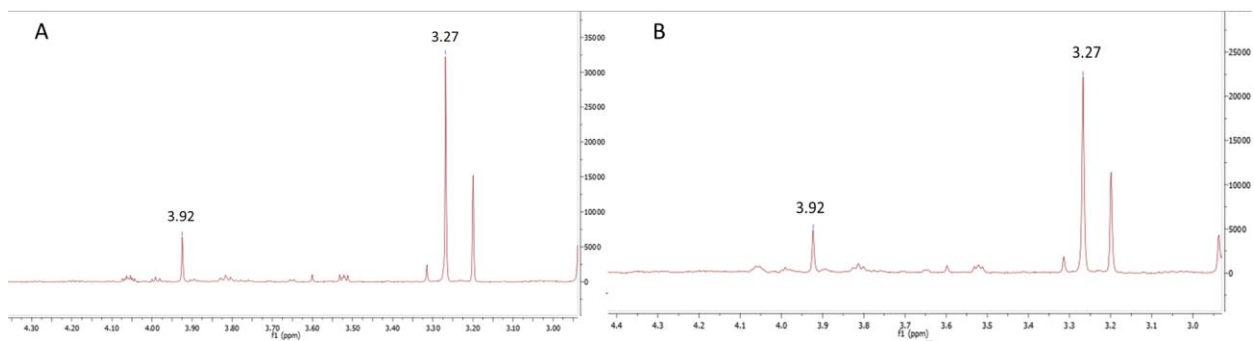


Figura 11.14. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina de  $\text{MgSO}_4$  1.0 M con una adición de A: 5 mM de betaína y B: 10 mM de betaína. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

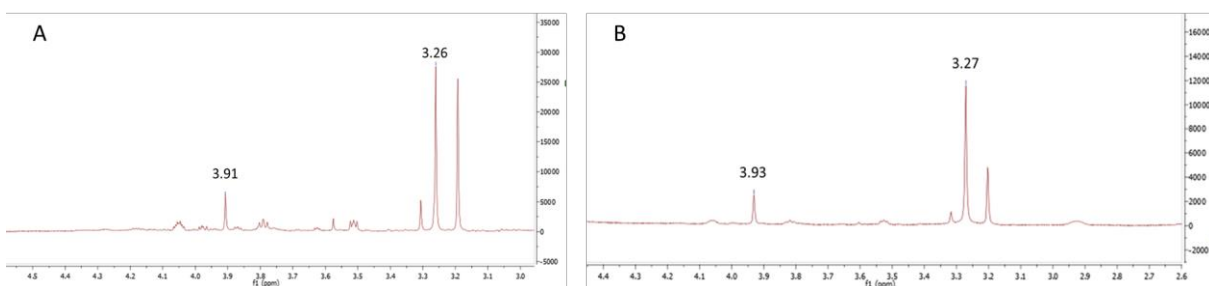


Figura 11.15. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M con una adición de A: 5 mM de betaína y B: 10 mM de betaína. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

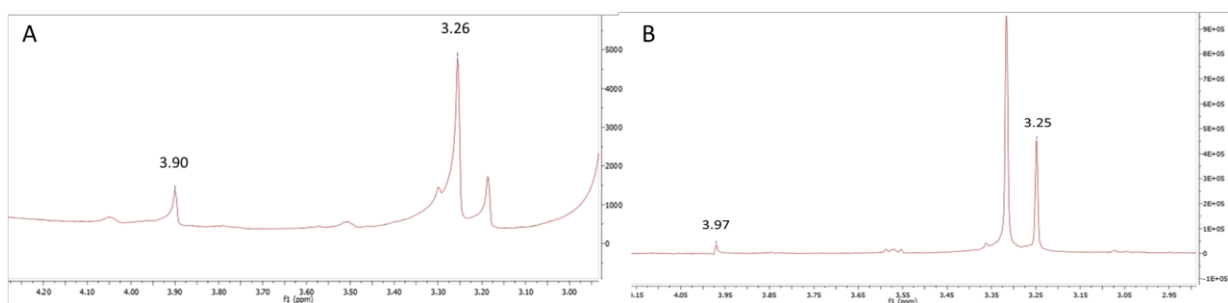


Figura 11.16. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina equimolar de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.0 M con una adición de A: 5 mM de betaína y B: 10 mM de betaína. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

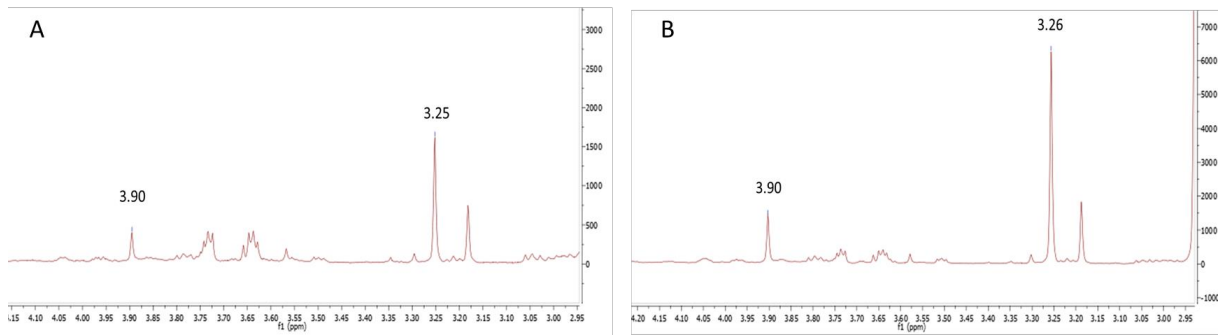


Figura 11.17. Espectro de resonancia de la extracción de solutos compatibles de la condición salina 2:1 de  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1.5 M con una adición de A: 5 mM de betaína y B: 10 mM de betaína. Se pueden observar las dos señales características de la betaína.

## Apéndice C: Cromatogramas de purificación

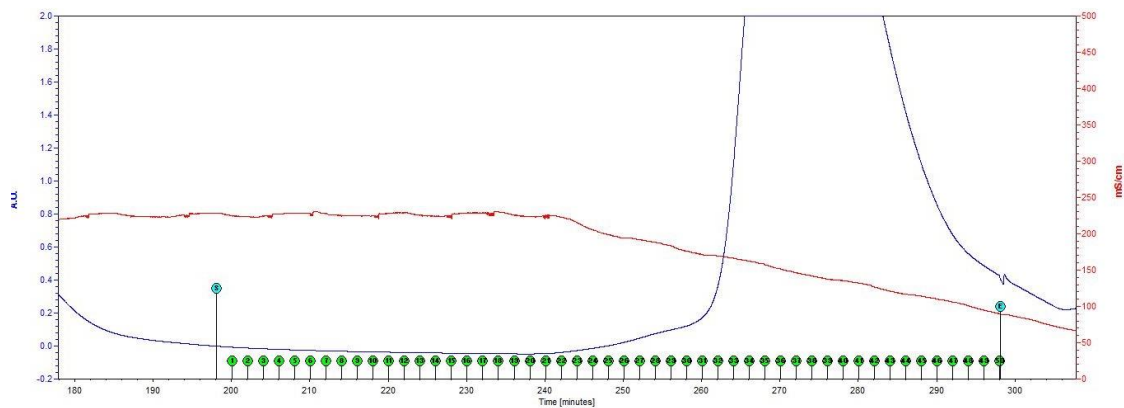


Figura 11.18. Cromatograma de intercambio hidrofóbico.

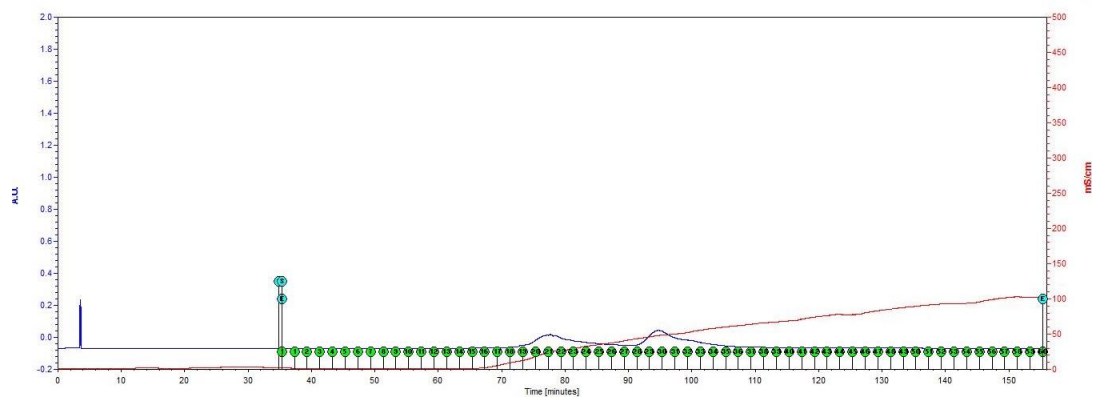


Figura 11.19. Cromatograma de intercambio hidrofóbico.

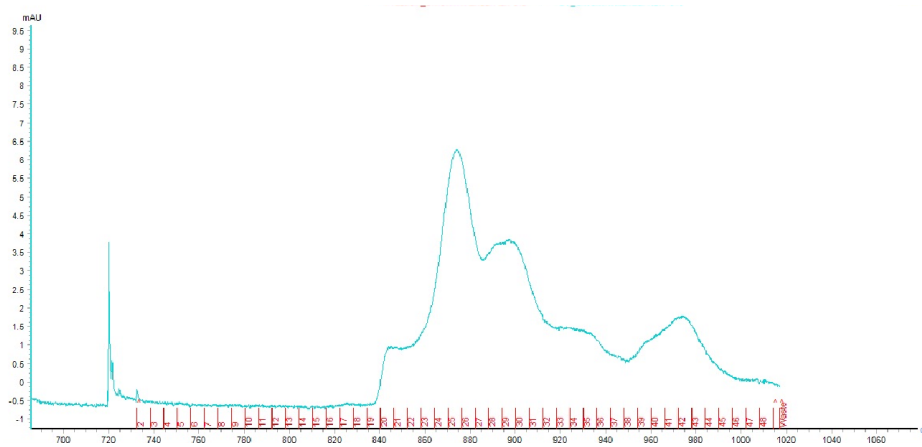
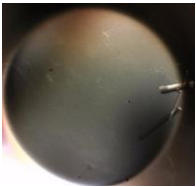


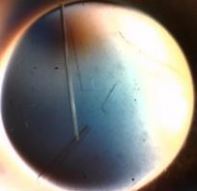
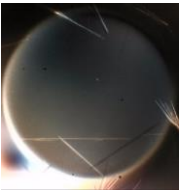
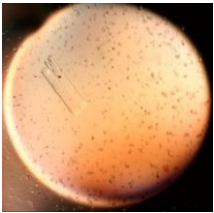
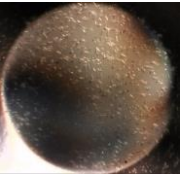
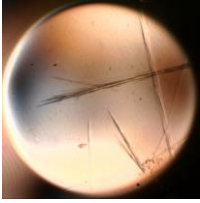

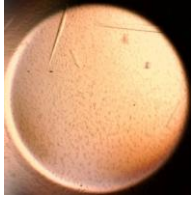
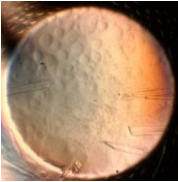
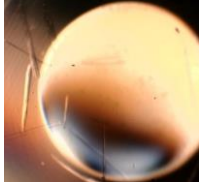
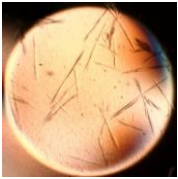


Figura 11.20. Cromatograma de exclusión molecular.

## Apéndice D: Condiciones donde se encontraron cristales

Kit	Condición	Composición	Imagen	Kit	Condición	Composición	Imagen
Wizard III	3	20 % PEG 3350 200 mM Formiato de Magnesio		Index II	8	0.2 M Cloruro de potasio 0.05 M HEPES pH 7.5 35 % Pentaeritriol propoxilato	
Wizard III	4	20 % PEG 3350 200 mM Formiato de Magnesio		Index II	11	0.2 M Cloruro de magnesio hexahidratado 0.05 M HEPES pH 7.5 35 % Ácido poliacrílico sal de sodio 5100	
Wizard III	14	20 % PEG 6000 200 mM Ácido cítrico/ Hidróxido de sodio pH 5		Index II	15	5 % Tacsimato 0.1 M HEPES pH 7.5 10 % PEG Metil eter 5000	
Wizard III	23	10 % PEG 20000 200 mM Bicina/ Hidróxido de sodio pH 9 2 % 1,4 dioxano		Index II	19	0.2 M Sulfato de magnesio 0.1 M Bis-Tris pH 6.5 25 % PEG 3350	



Wizard IV	44	8 % PEG 3350 200 mM Tris Base/ Ácido clorhídrico pH 8.5 500 mM NaCl 30 % 2-metil- 2,4- pentanodiol		Index II	21	0.2 M Sulfato de amonio 0.1 M Tris pH 8.5 25 % PEG 3350	
Crystal Screen I	40	0.1 M Citrato de sodio tribásico dihidratado pH 6.5 20 % 2- propanol 20 % PRG 4000		Index II	24	0.2 M Cloruro de sodio 0.1 M HEPES pH 7.5 25 % PEG 3350	
Crystal Screen I	41	100 mM HEPES-sodio pH 7.5 10 % Isopropanol 20% PEG 4000		Index II	32	0.2 M Acetato de amonio 0.1 M HEPES pH 7.5 25 % PEG 3350	