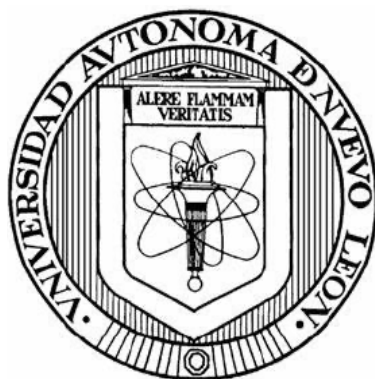


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE DE AMBIENTES
EXTREMOS EN CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA

POR

JOSUÉ MANUEL CORONA GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2023

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA
CULTIVABLE DE AMBIENTES EXTREMOS
EN CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA**

Comité de Tesis



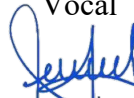
Dra. Susana De la Torre Zavala
Presidenta



Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Secretario



Dra. Irene Ruvalcaba Ortega
Vocal



Dra. María Julissa Ek Ramos
Vocal

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández
Vocal




SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirectora de Posgrado

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA
CULTIVABLE DE AMBIENTES EXTREMOS
EN CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA**

Dirección de Tesis



Dra. Susana De la Torre Zavala
Directora



Dra. Gabriela Olmedo Álvarez
Directora Externa

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL. Agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada a título del estudiante de maestría Josué Manuel Corona García con No. CVU 1151199.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Manuel Corona y Ma. del Rocio García, que me han apoyado en todos mis sueños y aspiraciones, y me han mostrado cómo es ser excelentes padres.

A mi hermana, Perla Corona, por compartir la aventura de la vida conmigo desde el principio, y darme ánimos en los momentos que más lo necesitaba.

A mi asesora, la Dra. Susana De la Torre, por adoptarme como hijo académico y formarme para la escuela y para la vida, gracias por siempre apoyar mis proyectos y mis ilusiones.

A mi asesora externa, la Dra. Gabriela Olmedo, por abrirme las puertas de su laboratorio y embarcarse en esta aventura con nosotros.

A la M.C. Cynthia Correa, por guiarme cada que me siento perdido, levantarme en cada tropiezo, y darme un buen zape en los momentos que de verdad era necesario, tu amistad es de las cosas que me dio el L9 que más agradezco en la vida.

A la Dra. Mercedes “Meche” Cortés, por llevarme de la mano, alimentarme moral y literalmente, compartiendo como dos países sin fronteras, y ser un apoyo muy grande en mi vida personal y académica, no tienes idea de cuánto te aprecio.

A Paola Benavides, la Dra. Karina López y la Dra. Janneth Escudero, amigas que en su doctorado me ayudaron ampliamente, así como al resto de mis compañeros del Laboratorio 9, Lucía Aquino, Marisol Cortés, Miguel Mendoza y Liliana Garza, con quienes he compartido esta aventura académica.

A Ricardo González, Alejandra Griffith, José Ochoa, Sandra Castillo, Linda Ortega, Emmanuel García, Pablo Reyes, Katia Ríos, compañeros del laboratorio que me apoyaron durante su servicio social, en especial a Iza Ramírez, que se quedó un tiempo más para que juntos lleváramos su proyecto de titulación de licenciatura.

Al Dr. Héctor Arocha, por su amistad, su apoyo y por permitirme acceder al laboratorio del Museo Génesis.

A la M.C. África Islas, por enseñarme a sobrellevar el trabajo en el laboratorio y apoyarme día con día mientras estuve en Irapuato, y aún después de ello.

A Guadalupe, quien me enseñó que cada momento es un cuadrado que no debemos dejar que se desperdicie.

A la Dra. Adriana Martínez, quien, aunque se integró a la familia L9 recientemente, nos ha dado nuevas perspectivas e incluso me hizo ver de forma sencilla cosas a las que yo ni sentido les encontraba.

Al Dr. Hamlet Avilés, por su paciencia y sus consejos, que tanto me han servido.

A mis compañeros del Laboratorio 2, Leonardo Meléndez, Patricia Soria, Iván Anguiano, y el M.C. Bernardo Aguilar, por las dichas y desventuras que compartimos acudiendo a CINVESTAV en pandemia, y especialmente al M.C. Norberto García, porque sin él los árboles filogenéticos no hubieran llegado a la calidad deseada.

A la Dra. Julissa Ek, por haberle encontrado el hilo a la historia que estaba tratando de contar.

A la Dra. Irene Ruvalcaba, quien me ayudó a ver los análisis de biodiversidad con una sencillez que no me hubiera imaginado.

A mis amigas Anai Amaral, Valeria Medina y Marissa Bracamontes, por acompañarme en este camino y empatizar conmigo cada que me sentía frustrado.

A mi amigo Alonso Carrillo, quien, dentro de su gran benevolencia y amistad, me sacaba de los apuros informáticos que más me quebraban la cabeza.

A mis amigos Erick Barreto, Alejandro Montoya, Azael Castillo, Javier Sámano y Daniel Martínez, quienes se han convertido en mi confort emocional y me muestran la vida desde otros ojos.

A los amigos que la facultad me dio: Carlos Álvarez, David Reding, Alexa Peña, Pamela Dorantes y Sofía De Alba, porque, aunque hemos tomado distintos caminos, siempre buscamos como sacarnos una sonrisa.

A mis amigas Fátima Villarreal y Marycarmen Leos, por darme cabida en su hogar y darme ánimos cuando lo necesitaba.

A mis amigas Ambar Rodríguez, Flor Saucedo, Jocelyn Chávez, Tsitsiqui Arteaga, Ivonne Soto, Jessica Sánchez y Maritza Ayala, quienes a pesar de la distancia me siguen apoyando en mis aventuras.

A mi psicóloga, Andrea San Vicente, por ayudarme a conocerme mejor, y a identificar dónde necesitaba trabajar más.

A mis amigos deportistas, Dina Rodríguez, Carlos Garza, Lorena Del Valle, Julio Gómez, Nelly Orozco, Karla Luna, Perla Hernández, Álvaro Márquez, Isadora Rivas, Azul Miranda y Alejandra Flores, por acompañarme en esas largas tardes saliendo del laboratorio.

A mis tíos, Silvia García y German Medina, que junto con mis primas, Cynthia Medina, Itzel Medina y Carolina Medina, me acogieron en Irapuato y me apoyaron con todo lo que necesitara.

A Mónica “Moni” Delgado, por responder a mis interminables preguntas y estar al pendiente de mis trámites administrativos.

Y por último, a Alexandra Elbakyan, Mikael Böök, Michael Hart, Anil Jason, Rohan Gupta y Dave Silin, sin los cuales jamás hubiera sido capaz de escribir el documento con la calidad debida.

DEDICATORIAS

*A mis padres, Rocio y Manuel, y mi hermana, Perla
Que me apoyan incondicionalmente*

*A María, Angel y Aurora
A quienes siempre llevo conmigo*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XV
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 EL CÁLCULO DE LA DIVERSIDAD ECOLÓGICA.....	3
2.1.1 Medición de la diversidad	3
2.1.2 Métodos alternos para el cálculo de la riqueza	5
2.2 DIVERSIDAD FILOGENÉTICA BACTERIANA	7
2.2.1 Dominancia de los phyla bacterianos.....	9
2.2.2 La Familia Bacillaceae.....	10
2.2.3 Los actinomicetos.....	12
2.3 LOS HABITANTES DE LOS AMBIENTES EXTREMOS E INEXPLORADOS	15
2.3.1 Distribución de las extremofilias en el árbol de la vida	17
2.3.2 El potencial biotecnológico de los microorganismos extremófilos	18
2.4 LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	20
2.4.1 Planes de acción para combatir la contingencia.....	21
2.4.2 Los actores de la crisis	22
2.4.3 Búsqueda de estrategias para combatir la resistencia a antibióticos	23
2.5 CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA, COMO CUNA DE LOS NUEVOS ANTIBIÓTICOS.....	25
2.5.1 La diversidad microbiana en el Valle de Cuatro Ciénegas	26

3.	JUSTIFICACIÓN	29
4.	HIPÓTESIS.....	30
5.	OBJETIVO DEL TRABAJO.....	31
	5.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
	5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
	6.1 ÁREAS DE ESTUDIO.....	32
	6.2 MUESTREO.....	34
	6.2.1 Muestreo 2020.....	34
	6.2.2 Muestreo 2021.....	34
	6.2.3 Muestreo 2022.....	37
	6.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	42
	6.4 PRETRATAMIENTOS	43
	6.5 AISLAMIENTO PRIMARIO	44
	6.5.1 Aislamiento primario de mesófilos	45
	6.5.2 Aislamiento primario de extremófilos	45
	6.6 AISLAMIENTO SECUNDARIO	48
	6.6.1 Aislamiento secundario de mesófilos.....	48
	6.6.2 Aislamiento secundario de actinobacterias extremófilas	48
	6.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE MESÓFILOS	49
	6.7.1 Extracción de ADN	49
	6.7.2 Identificación molecular.....	50
	6.7.3 Elaboración de árboles filogenéticos	50
	6.8 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD ECOLÓGICA.....	51
	6.9 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACTINOBACTERIAS	52
	6.9.1 Caracterización microscópica	52
	6.9.2 Caracterización macroscópica.....	52
	6.10 RANGOS DE EXTREMOTOLERANCIA DE ACTINOBACTERIAS	52
	6.10.1 Ensayo de rangos de pH.....	52
	6.10.2 Ensayo de tolerancia a NaCl	53

6.11 IDENTIFICACIÓN DE ACTINOBACTERIAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	54
6.11.1 Material biológico	54
6.11.2 Ensayos de estría perpendicular	55
7. RESULTADOS.....	56
7.1 AISLAMIENTO CON ENFOQUE MESÓFILO DE BACTERIAS DE LA POZA AZUL.....	56
7.2 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE LA POZA AZUL.....	58
7.2.1 Morfología colonial de los aislados PA	58
7.2.2 Curva de rarefacción del punto de muestreo.....	58
7.3 EVALUACIÓN DE LA DIFERENCIA EN DIVERSIDAD DE SECUENCIAS DEL GEN 16S OBTENIDAS DE LA POZA AZUL Y LOS DOMOS DEL ARQUEANO.....	59
7.3.1 Identificación molecular de los aislados PA	59
7.3.2 Análisis de las secuencias AD.....	62
7.3.3 Diversidad taxonómica encontrada y en PA y AD	64
7.3.4 Cálculo de la diversidad de secuencias	67
7.3.5 Análisis filogenético.....	69
7.4 AISLAMIENTO SELECTIVO CON ENFOQUE EXTREMÓFILO DE ACTINOMICETOS.....	70
7.5 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE ACTINOMICETOS OBTENIDOS A PARTIR DE MEDIOS ESPECÍFICOS.....	75
7.5.1 Fenotipos de los actinomicetos aislados	75
7.5.2 Cálculo de la diversidad de actinomicetos	75
7.6 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	76
7.7 EVALUACIÓN DE LOS RANGOS DE EXTREMOFILIA DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS	82
7.7.1 Rangos de crecimiento en la escala de pH.....	82
7.7.2 Rangos de crecimiento en gradiente de concentración de cloruro de sodio ...	83
7.7 ENSAYOS DE ANTAGONISMO DE LOS ACTINOMICETOS AISLADOS CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS POR EL MÉTODO DE ESTRÍA PERPENDICULAR	85
8. DISCUSIÓN	87
8.1 LA DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DE LA POZA AZUL	87

8.2 DIVERSIDAD TAXONÓMICA DE PA Y AD	89
8.3 AISLAMIENTO SELECTIVO DE ACTINOBACTERIAS EN CONDICIONES DE EXTREMOFILIA	92
8.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ACTINOBACTERIAS	95
8.5 CAPACIDAD EXTREMÓFILA DE LAS ACTINOBACTERIAS	96
8.6 CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LAS ACTINOBACTERIAS EXTREMOTOLERANTES CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	98
9. CONCLUSIONES	99
10. PERSPECTIVAS	100
11. BIBLIOGRAFÍA.....	101
12. ANEXOS.....	131
ANEXO 1. FENOTIPOS PA.....	131
ANEXO 2. FENOTIPOS CON PRETRATAMIENTO	134
ANEXO 3. FENOTIPOS POR PUNTO	134
ANEXO 4. SECUENCIAS PA.....	137
ANEXO 5. SECUENCIAS AD	139
ANEXO 6. AISLAMIENTO CON ENFOQUE EXTREMÓFILO	143
ANEXO 7. FENOTIPOS DE ACTINOBACTERIAS.....	143
ANEXO 8. ACTINOBACTERIAS DE CUATRO CIÉNEGAS.....	145
ANEXO 9. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACTINOBACTERIAS EN ISP2.....	146
ANEXO 10. DENSIDAD ÓPTICA A DIFERENTES VALORES DE pH.....	149
ANEXO 11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	151
ANEXO 12. RAL.....	152
ANEXO 13. ÁRBOL NEIGHBOR-JOINING EXTENDIDO	154
ANEXO 14. ÁRBOL MAXIMUM-LIKELIHOOD EXTENDIDO.....	158

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de extremofilia en microorganismos.....	16
Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos extremófilos más comunes.....	19
Tabla 3. Coordenadas de las pozas del Valle de Cuatro Ciénegas a partir de las cuales se obtuvieron las muestras.....	32
Tabla 4. Puntos del muestreo realizado en septiembre del 2021.	35
Tabla 5. Puntos del muestreo realizado en marzo del 2022.....	37
Tabla 6. Puntos del muestreo realizado en septiembre del 2022.	40
Tabla 7. Pretratamientos aplicados para la obtención selectiva de microorganismos.	43
Tabla 8. Medios de cultivo utilizados durante el aislamiento.	44
Tabla 9. Número de aislados con morfologías distintas identificados en cada punto de muestreo realizado en la Poza Azul (octubre 2020).....	56
Tabla 10. Número de secuencias con coincidencia con algún miembro del phylum Bacillota, obtenidas a partir de los aislados de la Poza Azul (octubre 2020), identificadas en cada punto de muestreo.	62
Tabla 11. Índices de diversidad de las OTUs correspondientes a las pozas Poza Azul (PA) y Domos de Arqueano (AD), Cuatro Ciénegas, Coahuila.	67
Tabla 12. Aislados obtenidos en función de los muestreos realizados.	71
Tabla 13. Aislados obtenidos en función de las pozas muestreadas.	71
Tabla 14. Clasificación de los aislados de actinomicetos en las diferentes categorías de extremofilia en las que fueron caracterizados de acuerdo con los criterios establecidos en la metodología.	85
Tabla 15. Resumen de los aislamientos con enfoque extremófilo exitosos para la obtención de actinobacterias.	143
Tabla 16. Fenotipos observados en las actinobacterias aisladas del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	143
Tabla 17. Información completa de las actinobacterias extremotolerantes aisladas del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.	145

Tabla 18. Descripción morfológica de las actinobacterias aisladas, evaluada en medio ISP2 los días 2, 5 y 12 de incubación a 27° C.	146
Tabla 19. Promedio y desviación estándar de la densidad óptica corregida del medio a diferentes valores de pH, la cual fue medida a una longitud de onda de 600 nm, después de diez días de haber sido inoculado con los aislados de actinomicetos.	149
Tabla 20. Promedio y desviación estándar de los milímetros de la inhibición que tuvieron las actinobacterias aisladas frente a las bacterias patógenas MDR.	151
Tabla 21. Colores referenciados en el presente trabajo y su código correspondiente al sistema europeo de colores RAL Clásico 2017 (Kelly, 1964).	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de las curvas de rarefacción y acumulación que contemplan muestras e individuos contra el número de especies (Loreau, 2010).....	7
Figura 2. Esquemmatización actualizada a febrero de 2023 del Árbol de la Vida (Gribaldo, 2023).	9
Figura 3. Porcentaje de aislados totales de cada phylum contenido en las bases de datos. Modificada de Rinke <i>et al.</i> (2013) y con los nombres actualizados por Oren y Garrity (2021).....	9
Figura 4. Tinción de Schaffer-Fulton de <i>Bacillus</i> sp. en la que se observan las endosporas en verde y las células en rojo. Imagen por Gronstal y Tambe (2019).	11
Figura 5. Morfología de aislados de actinomicetos: (a) colonias crecidas en medio ISP2, (B) micrografía SEM (Maiti y Mandal, 2019).....	12
Figura 6. Diagrama que muestra por medio de círculos concéntricos los esfuerzos en el aislamiento de actinomicetos en la búsqueda de antibióticos. Modificada de las originales (Baltz, 2006; Müller y Wink, 2014; Hamedi <i>et al.</i> , 2017).....	14
Figura 7. Árbol filogenético que identifica con el código de colores a los extremófilos y las características de resistencia que aparezcan por lo menos en una especie de cada género (Leal Dalmaso <i>et al.</i> , 2015).....	17
Figura 8. Patógenos bacterianos identificados por la WHO que son prioridad para encontrar nuevos tratamientos para sus infecciones (WHO, 2017c).	21
Figura 9. Número de muertes a nivel global atribuidas a bacterias resistentes a antimicrobianos en el 2019 (Murray et al., 2022).....	23
Figura 10. Seis de los lugares que aún cuentan con estromatolitos vivos: Cuatro Ciénegas (Pérez Ortega, 2020), Atacama (Poch, 2018), Alexandria (Aref y Taj, 2012), Shark Bay (BME, 2018), Bacalar (Sandoval Villalbazo, 2016), Exuma Cays (BME, 2018).	26
Figura 11. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas evaluadas, capaces de inhibir a aislados clínicos hospitalarios con multirresistencia a antibióticos (Correa Oviedo, 2023).....	28
Figura 12. Mapa del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, ubicando de manera representativa cada una de las pozas en las que se realizó el muestreo, así como la vista aérea de la poza y su vista peatonal.	33

Figura 13. Imagen satelital de la Poza Azul en el Rancho Pozas Azules..	34
Figura 14. Puntos muestreados en septiembre del 2021..	35
Figura 15. Puntos muestreados en marzo del 2022..	38
Figura 16. Puntos muestreados en septiembre del 2022..	41
Figura 17. Diseño experimental para el aislamiento primario de las muestras obtenidas en septiembre del 2021.	46
Figura 18. Diseño experimental para el aislamiento primario de las muestras obtenidas en marzo del 2022.	47
Figura 19. Diseño experimental para el aislamiento primario de las muestras obtenidas en septiembre del 2022.	47
Figura 20. Diseño experimental del ensayo de tolerancia a NaCl en placa de 6 pozos. ...	53
Figura 21. Acomodo de los microorganismos en el ensayo de estría perpendicular.	55
Figura 22. Fotografías de los 124 aislados axénicos originarios de la Poza Azul y sembrados en Medio Marino.....	57
Figura 23. Curva de rarefacción (línea continua) con intervalos de confianza del 95% (líneas discontinuas) de la Poza Azul a partir de los datos obtenidos de las 10 muestras tomadas.	59
Figura 24. Géneros con los que las secuencias PA tuvieron coincidencia, por cantidad y porcentaje de aislados.	60
Figura 25. Países de origen y tipo de muestra de las que se obtuvieron las secuencias de NCBI con las que hubo coincidencia con los aislados PA.....	61
Figura 26. Géneros con los que las secuencias AD tuvieron coincidencia, por cantidad y porcentaje de aislados.	63
Figura 27. Países de origen y tipo de muestra de las que se obtuvieron las secuencias de NCBI con las que hubo coincidencia con las secuencias AD.....	64
Figura 28. Géneros a los que pertenecen las secuencias de NCBI con las que aquellas de PA y AD tuvieron coincidencia por medio de BLASTn.....	65
Figura 29. Proporción con que se distribuyeron las secuencias de PA y AD en las 5 clases bacterianas encontradas.....	66
Figura 30. Diagrama que muestra los géneros con los que tuvieron coincidencia las secuencias de PA y AD.	67

Figura 31. Números efectivos de especies (OTUs) para Poza Azul (PA) y Domos de Arqueano (AD) obtenidos a partir de los índices de diversidad. El N_0 (S) presenta la riqueza observada, el $N1$ ($e^{H'}$) a la diversidad en función de las especies comunes, y el $N2$ ($1/D$) en función de las abundantes.	68
Figura 32. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias del gen 16S obtenidas de PA y AD	69
Figura 33. Árbol Maximum-Likelihood de las secuencias del gen 16S obtenidas de PA (azul) y AD (amarillo), junto con secuencias de referencia descargadas de NCBI.	70
Figura 34. Aislados obtenidos en función de los medios de cultivo, los valores de pH de los mismos, y los pretratamientos empleados.	72
Figura 35. Resumen gráfico de los aislamientos realizados en el Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila.	73
Figura 36. Actinomicetos aislados del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, con enfoque de extremotolerancia.	74
Figura 37. Distribución de los fenotipos observados con base en el pH y medio de aislamiento.	75
Figura 38. Porcentaje de aislados obtenidos en función del medio de cultivo utilizado y su valor de pH.	76
Figura 39. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 1 al 8.	77
Figura 40. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 9 al 16.	78
Figura 41. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 17 al 24.	79
Figura 42. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 25 al 31.	80
Figura 43. Densidad óptica corregida del medio después de diez días de haber sido inoculado con los aislados de actinomicetos, a una longitud de onda de 600 nm.	83
Figura 44. A) Crecimiento de los aislados en medio MTS a diferentes concentraciones de NaCl, tras 10 días de incubación. B) Esporulación presentada en el crecimiento observado	84

Figura 45. Mapa de calor que muestra la cantidad de inhibición que tuvo cada uno de los aislados contra los patógenos MDR *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* 20-499, *Staphylococcus epidermidis* 17-1758, *Staphylococcus aureus* 20-402, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus epidermidis* 16-1928 en medio ISP2.86

Figura 46. Árbol Neighbor-Joining extendido a la forma rectangular para poder apreciarse más a detalle.....154

Figura 47 Árbol Maximum-Likelihood extendido a la forma rectangular para poder apreciarse más a detalle.....158

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%ID	Porcentaje de identidad
AD	Los Domos del Arqueano
ADH	Arqueano Húmedo
ADS	Arqueano Seco
AQ	El Arqueanito
BLASTn	Herramienta básica de búsqueda por alineamiento local de nucleótidos
CH	El Churince
CPR	Radiación de phyla candidatos
D	Índice de Simpson
DOF	Diario Oficial de la Federación
EMBL	Laboratorio Europeo de Biología Molecular
ESKAPE	Acrónimo de <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , y <i>Enterobacter</i> spp.
F	Pretratamiento de Fenol
Fn	Fenotipo
H	Pretratamiento de calor
H'	Índice de Shannon-Wiever
HAK1	Medio Halófilos y Alcalinos 1
HU	Los Hundidos
HV	Medio ácidos húmicos y vitaminas
ISP	International Streptomyces Project
ITFAR	Fuerza Interagencial para la Resistencia Microbiana
iTOL	Árbol de la Vida Interactivo
J'	Índice de Equitabilidad de Pielou
LPSN	Lista de Nombres Procarióticos con Posición en la Nomenclatura
LUCA	Primer ancestro común universal
MA	Micelio aéreo
MDR	Multirresistente

MEGA	Análisis genético de evolución molecular
MHA	Agar Mueller Hinton
MM	Medio marino
MQ	Medio de quitina
MRSA	Staphylococcus aureus resistente a meticilina
MTS	Medio de Tolerancia a la Sal
N	Pretratamiento de Nistatina
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
OTU	Unidad taxonómica operacional
P	Pretratamiento de Polimixina B
PA	La Poza Azul
PB	Poza La Becerra
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pdm	Punto de muestreo
PDR	Panresistente
pH	Potencial de Hidrógeno
PR	Las Pozas Rojas
PS	Pigmento soluble
Pt	Pretratamiento
PV	La Poza Verde
R2A	Agar 2A de Reasoner
S	Riqueza
SFM	Medio de harina de soya y manitol
U	Radiación Ultravioleta
UFC	Unidades formadoras de colonia
WHO	Organización Mundial de la Salud
XDR	De resistencia extendida

RESUMEN

La alta diversidad bacteriana aumenta las probabilidades de encontrar microorganismos pertenecientes a linajes nuevos, y productores de moléculas desconocidas que pudiesen tener potencial biotecnológico. Los actinomicetos son productores por excelencia de metabolitos secundarios, con múltiples usos para la vida cotidiana, y han sido explotados desde el siglo pasado para la obtención de moléculas antimicrobianas. En los últimos años, los esfuerzos han sido en vano, al no lograr encontrar nuevas especies ni sustancias potenciales. Por ello, una de las estrategias que se ha implementado es la búsqueda del potencial biotecnológico a partir de los actinomicetos que habitan en ambientes con condiciones extremas.

El Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, tiene una gran variedad de ecosistemas desérticos, una historia geológica única y condiciones climáticas que lo hacen inigualable. El agua de sus pozas, aunque pudiera parecer común, tiene en realidad una muy baja concentración de nutrientes, y niveles de pH que cambian con la más mínima alteración climatológica. Esto lo vuelve el sitio perfecto para el aislamiento de nuevas especies de actinomicetos extremotolerantes, productores de sustancias antimicrobianas.

En este trabajo se realizó un estudio de la diversidad bacteriana cultivable del Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila, a partir de dos sitios con características físicas diferentes: la Poza Azul y la poza hipersalina de los Domos del Arqueano. Los números de Hill mostraron que en ambos sitios la diversidad es alta, lo que dio precedente a la búsqueda de microorganismos extremófilos en distintos sitios a lo largo del Valle. Se aislaron exitosamente 31 cepas de actinobacterias con características asociadas al género *Streptomyces* y a posibles géneros raros. Se comprobó que 28 de ellas podían crecer en condiciones haloalcalitolerantes y 3 en ambientes sintéticos con altas concentraciones de sal. Finalmente, 22 de los aislados mostraron actividad antimicrobiana contra al menos una cepa MDR de origen clínico. Esto da pie a que el Valle de Cuatro Ciénegas se siga explorando para la obtención de nuevos antibióticos.

ABSTRACT

High bacterial diversity increases the chances of finding microorganisms belonging to new lineages, which could be producers of unknown molecules with biotechnological potential. Actinomycetes are excellent producers of secondary metabolites, with multiple uses for everyday life, and have been exploited since the last century to obtain antimicrobial molecules. In recent years, efforts to discover new species or substances have failed tremendously. Therefore, one of the most recently implemented strategies has been the search for biotechnological potential of actinomycetes that inhabit environments with extreme conditions.

The Cuatro Ciénegas Basin in the Mexican state of Coahuila, beholds a wide variety of desert ecosystems with a unique geological history and climatic conditions that have made it unmatched. The water in its pools, although it may seem ordinary, actually has a very low nutrient concentration, and pH levels that change with the slightest climatic alteration. This makes it the perfect location for the isolation of new extremotolerant actinomycete species with antimicrobial-substance-producing capability.

A study of the cultivable bacterial diversity from two sites with different physical characteristics, the Poza Azul and the hypersaline Archaean Domes in the Cuatro Ciénegas Basin, was carried out. Hill numbers showed that microbial diversity from both sites is high, which gave precedent to the search for extremophile microorganisms in different sites throughout the Valley. Thirty-one actinobacteria strains with characteristics associated with the genus *Streptomyces* and possible rare genera were successfully isolated. 28 of them were able to grow in haloalkaline conditions and 3 more in synthetic environments with high concentrations of salt. Finally, 22 of the isolates showed antimicrobial activity against at least one MDR strain of clinical origin. This gives rise to the Cuatro Ciénegas Basin exploration that could lead to the discovery of new antibiotics.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que la cantidad de especies que se conoce a la fecha es insignificante comparada con lo que potencialmente se pudiera llegar a identificar. Los estudios de diversidad se han realizado con el fin de preservar a las formas de vida que habitan el planeta, e identificar el papel del que se encargan para mantener el equilibrio de la biosfera en su totalidad.

A la adquisición de este conocimiento incluso se le puede dar un carácter aplicativo. Tener una noción sobre los microorganismos, que forman parte de los ecosistemas y generan redes tróficas para el transporte de los nutrientes y la energía es fundamental para llegar a descubrir nuevas sustancias que sean útiles para el uso humano.

Los antibióticos son moléculas sintetizadas por microorganismos, que han sido capaces de hacer frente a las infecciones bacterianas, ya sea al eliminar al huésped o al evitar que se siga multiplicando. El primer compuesto de origen microbiano que se asoció con la inhibición del crecimiento de otras especies fue la penicilina, y ésta sentó las bases para la búsqueda de productos naturales con actividad antimicrobiana.

No obstante, la expansión de la multidrogorresistencia va a pasos agigantados, pues las bacterias son capaces de evolucionar en periodos muy cortos, adquiriendo así recursos genéticos que les ayudan a evadir los efectos de los antibióticos. El factor humano ha contribuido a que esta resistencia se extienda aún más rápidamente, debido a la falta de responsabilidad en cuanto al uso de fármacos de forma terapéutica o dentro de la industria ganadera.

La alternativa poco práctica de intentar controlar el uso entre la población, junto con los pocos nuevos antibióticos efectivos que se han encontrado, además de que los costos para su desarrollo han aumentado, pintan en conjunto un panorama desalentador para la resolución del problema de la resistencia a antibióticos. A este panorama hay que sumarle que el aislamiento de actinobacterias filamentosas o actinomicetos se halla en un bucle, en el cual los aislamientos están recuperando especies ya conocidas, que producen metabolitos ya

caracterizados, para algunos de los cuales ya se reporta resistencia por parte de los patógenos de importancia clínica.

Las actinobacterias filamentosas han sido objeto de amplio estudio debido a que tienen la facultad de producir tanto compuestos que inhiben a bacterias como sustancias activas contra hongos, virus y parásitos. Repetir las mismas técnicas una y otra vez solo está llevando al redescubrimiento de especies y compuestos que ya se conocían, representando una pérdida importante de tiempo y de recursos.

Por ello se está aprovechando la capacidad de tolerancia a ambientes extremos que tienen algunas de estas bacterias, lo que ha conducido los esfuerzos exploratorios a encontrar nuevos linajes con metabolismos nunca antes descritos, que pudieran tener la clave para erradicar la pandemia silenciosa de la resistencia a antibióticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 El cálculo de la diversidad ecológica

La diversidad biológica se define como la cantidad de formas de vida distintas que se pueden encontrar en cada uno de los niveles organizacionales del ecosistema, yendo desde moléculas pequeñas hasta especies, en conjunto con sus procesos metabólicas y su relación con el ecosistema (DeLong, 1996). Puede considerarse a nivel taxonómico, genético, filogenético, funcional o incluso químico, dependiendo de las herramientas con que sea medida (Daly *et al.*, 2018).

La biodiversidad se considera uno de los aspectos que sostiene la viabilidad de un ecosistema y determina su productividad, en gran parte debido a que una gran variedad de organismos encontrados en un lugar implica que estos tendrán distintos sistemas metabólicos, muchos de los cuales podrían complementarse entre sí, propiciando una mayor dinámica de los nutrientes (Tilman *et al.*, 2014). Esto determina la importancia de las redes tróficas, con lo que una degradación del ecosistema por pérdida de biodiversidad puede conducir a un colapso total del mismo y extinciones en masa por efecto dominó, también llamadas extinciones secundarias (Dunne y Williams, 2009).

2.1.1 Medición de la diversidad

Para comenzar a medir la diversidad de un ecosistema, se deben considerar primero las tres propiedades generales identificadas por Stirling (2007): variedad, balance y disparidad. La variedad se entiende como la cantidad de categorías en las que se pueden acomodar los elementos del sistema, conocida en ecología como la riqueza de especies (McIntosh, 1967). El balance o uniformidad se refiere a cómo se distribuye la proporción de elementos entre las categorías, o dicho de manera más simple, la igualdad o no del número de elementos de cada categoría distinta (Pielou, 1969). En cambio, la disparidad es qué tan distintas entre sí son las categorías o los elementos que se están evaluando (Runnegar, 1987). Esta última propiedad es a la que menos atención se ha puesto, pero es la que nos permite afirmar que, por ejemplo, en el supuesto de una comunidad de seis especies, si ésta se compone por una especie de

salamandra, dos de peces y tres de tortugas, sería más diversa que si fueran seis especies de paloma silvestre (Daly *et al.*, 2018).

La diversidad se puede estimar a través de tres niveles: α diversidad, que considera la riqueza de una región interior más pequeña; β diversidad, que implica el cambio de riqueza entre un punto y otro de la región; y la γ diversidad, que toma la riqueza de la región entera (Haynes, 2008; Moore, 2013).

Ya tratándose de su cuantificación, usualmente se recurre a los índices de diversidad, siendo los más populares el de riqueza (S), el índice de Shannon-Wievers (H') y el índice de Simpson (D; Chao *et al.*, 2010).

La riqueza (S) está dada por el número de especies. El índice de Shannon es una medida de la entropía en la comunidad, y se calcula con la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log p_i$$

Donde S es la riqueza de especies y p_i es la proporción relativa dada por i (Shannon, 1948).

El índice de Simpson cuantifica la probabilidad de que dos individuos dentro de la comunidad pertenezcan a la misma especie, también es nombrada dominancia de especies, y sigue la ecuación:

$$D = -\log \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde S y p_i también son riqueza y proporción relativa (Simpson, 1949). Su valor va de 0 a 1 y en ocasiones el número obtenido en D se le resta a 1 para interpretar que el valor del índice aumenta conforme a una mayor diversidad (Moore, 2013).

No obstante, los índices de Shannon y Simpson no son medidas de la diversidad en sí mismos sino de incertidumbre (Jost, 2006). A partir de éstos es necesario obtener los números de Hill, calculados con las ecuaciones:

$$N_0 = S \quad N_1 = e^{H'} \quad N_3 = \frac{1}{D}$$

Éstas se conocen como el número efectivo de especies (Hill, 1973). El orden 0 da el máximo peso a las especies raras, es decir, da el mismo peso o valor a todas las especies, el de orden 1 considera más a las especies comunes, y el de orden 2 da más importancia a las especies abundantes (Hsieh *et al.*, 2016). Gracias a ellos ha sido posible encontrar coherencia y lógica matemática al comparar entre distintos estudios, puesto que siguen el principio de duplicación: “si tenemos N grupos igualmente grandes e igualmente diversos sin especies en común, la diversidad de los grupos combinados debe ser N veces la diversidad de un solo grupo” (Chao *et al.*, 2010).

Un complemento a estos números es el índice de equitabilidad (equitatividad o equidad) de Pielou (J'), la cual cuantifica la uniformidad y se calcula a partir de H' (índice de Shannon) y S (riqueza). Está dado por la fórmula:

$$J' = \frac{H'}{H_{m\acute{a}xima}} = \frac{H'}{\ln(S)} = \frac{\ln(N_1)}{\ln(N_0)}$$

Relaciona la proporción de la entropía observada con la máxima esperada, donde 1 implica una perfecta uniformidad u homogeneidad, y 0 la ausencia de ésta (Pielou, 1966).

2.1.2 Métodos alternos para el cálculo de la riqueza

La unidad con la que se mide la riqueza generalmente es el número de especies, que en aproximaciones moleculares se han definido como unidades taxonómicas operacionales (OTUs), dando a entender que una secuencia será su propia OTU si tiene un cierto porcentaje de divergencia con respecto a las demás (Gilliland *et al.*, 2012). Por ello las OTUs no sólo se manejan a nivel de especie, sino que también pueden ser a nivel de individuo, género o hasta clase, dependiendo del número de marcadores moleculares y su efectividad (He *et al.*, 2015).

No obstante, no siempre se cuenta con el presupuesto para recurrir a técnicas moleculares. Por esta razón, la unidad de medida de más fácil acceso es el de la morfoespecie, que se obtiene al diferenciar a los individuos analizados por su morfología (Doerder y Brunk, 2012). Es ampliamente utilizado a nivel microbiano en organismos eucariotas como los hongos y protozoos (Bargues *et al.*, 2017; Chauhan *et al.*, 2019).

El caso de las bacterias es más complejo, puesto que por el tamaño que éstas tienen y la rigurosidad necesaria para el análisis de sus diferencias celulares, la variación en la forma celular es poco apreciada y estudiada (van Teeseling *et al.*, 2017). No así, la estructura que forman en comunidad, conocida como colonias, se ha descrito muy extensamente, al punto de que se han desarrollado programas bioinformáticos especiales como TAMMiCol para el análisis de la morfología colonial bacteriana (Tronolone, 2018). De este modo, en las bacterias, cada morfología colonial única puede considerarse una morfoespecie (Simon *et al.*, 2022).

Además, para evaluar la calidad de la cuantificación de la riqueza se desarrolló un método conocido como la curva de acumulación de especies, la curva se construye graficando en el eje x el número de muestras y en el eje y el número de categorías que se están utilizando para definir la riqueza (e.g. especies, OTUs). Cuando un esfuerzo ha capturado la mayor parte de la riqueza, esta curva se asintotiza.

La curva de rarefacción es una versión basada en un modelo numérico que permite la estimación intervalos de confianza del 95% y la comparación de la riqueza con un mismo esfuerzo, basado en el número de individuos o de muestras (Fig. 1; Sanders, 1968; Willis, 2019).

De esta manera, se ha establecido que el límite superior del intervalo de confianza de una curva de rarefacción es una representación directa de la riqueza máxima posible (Loreau, 2010).

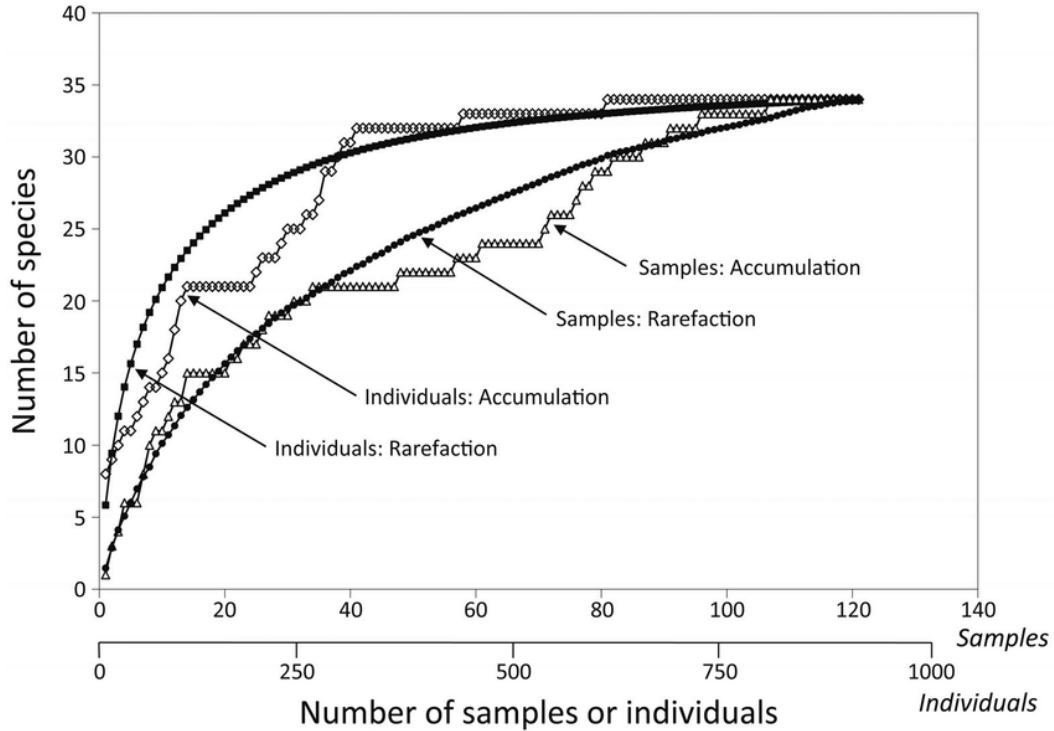


Figura 1. Ejemplo de las curvas de rarefacción y acumulación que contemplan muestras e individuos contra el número de especies (Loreau, 2010).

Asimismo, existe un modelo no paramétrico para la estimación de la riqueza llamado Chao2, que se basa en la incidencia y se expresa como:

$$S_{estimada} = S_{observada} + \frac{L^2}{2M}$$

donde L es el número de especies que se encuentran en una sola muestra (singletons) y M es el número de especies que se observan en exactamente dos muestras (doubletons; Chao 1984, 1987). La ventaja de utilizar un modelo no paramétrico es que son más sencillos de comprender y utilizar, y tienen relativa efectividad (Escalante Espinosa, 2003).

2.2 Diversidad filogenética bacteriana

El estudio taxonómico de las bacterias ha sufrido cambios importantes con el desarrollo de las estrategias genómicas, ya que el número de taxa identificados se encuentra en constante expansión y cambio en las estrategias para definirlos, por lo que las bases de datos han

desarrollado sus propios criterios para definir qué grupos taxonómicos incluir en sus clasificaciones (Glöckner *et al.*, 2017).

NCBI Taxonomy contiene 69 categorías clasificadas como *phylum* dentro del superreino Bacteria (Schoch *et al.*, 2020). EMBL-EBI nombra a 88 *phyla* bacterianos para la clasificación de sus secuencias (Madeira *et al.*, 2022). Por su parte, SILVA define 89 grupos a este nivel a partir de la subunidad pequeña del RNA y 65 a partir de la subunidad grande (Quast *et al.*, 2013).

Empero, el análisis directo de las secuencias del gen 16S ribosomal contenidas en SILVA arroja números más altos. Yarza *et al.* (2014) compararon las secuencias contenidas en esta base de datos y, tomando un punto de corte de 75% de identidad para contemplar que dos secuencias pertenecían al mismo *phylum*, alcanzaron así un número de 1481 *phyla* bacterianos diferentes.

Esta complejidad en la clasificación taxonómica, sumado al hecho de que, de varios de los grupos bacterianos identificados, el único registro que se tiene son secuencias genómicas, ha vuelto la clasificación de los organismos procariontes una tarea casi imposible (Castelle y Banfield, 2018). Una de las estimaciones más recientes identifica alrededor de 92 *phyla* bacterianos con nombres asignados, de los cuales 44 aún no tienen representantes cultivables (Figura 2; Megrian *et al.*, 2022; Witwinowski *et al.*, 2022).

Además, existe un grupo de bacterias principalmente no cultivables conocido como radiación de *phyla* candidatos (CPR), las cuales tienen genomas muy pequeños que se separan filogenéticamente del resto de bacterias, y se cree que podrían contener hasta el 50% de toda la diversidad bacteriana en sus 74 *phyla* (Hug *et al.*, 2016; Méheust *et al.*, 2019; Tsurumaki *et al.*, 2022). Este grupo es bastante variado y apenas fue descrito en el 2015, y agregado al Árbol de la Vida en el 2016 (Brown *et al.*, 2015, Hug *et al.*, 2016).

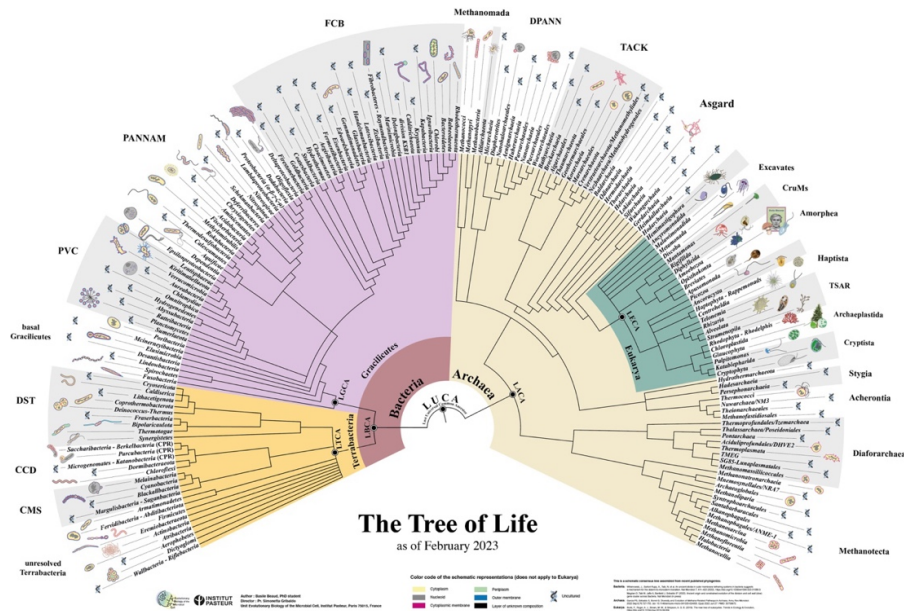


Figura 2. Esquemática actualizada a febrero de 2023 del Árbol de la Vida (Gribaldo, 2023).

2.2.1 Dominancia de los *phyla* bacterianos

A pesar la gran variedad de categorías ya mencionada, el 95.9% de los aislados bacterianos pertenece únicamente a seis *phyla*: Pseudomonadota, Actinomycetota, Bacillota, Bacteroidota, Mycoplasmata y Spirochaetota (Figura 3; Rinke *et al.*, 2013). Anteriormente estos *phyla* eran conocidos como Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes y Spirochetes, hasta la reciente corrección realizada por Oren y Garrity (2021).

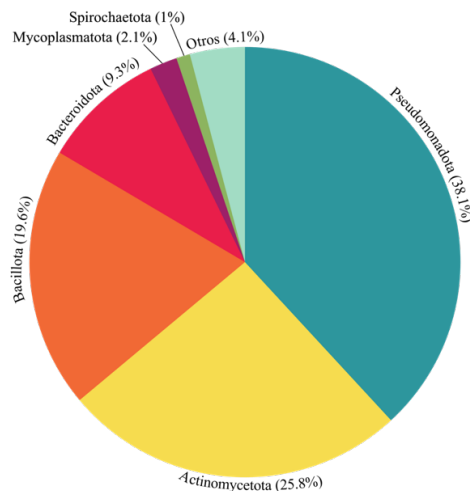


Figura 3. Porcentaje de aislados totales de cada *phylum* contenido en las bases de datos. Modificada de Rinke *et al.* (2013) y con los nombres actualizados por Oren y Garrity (2021).

También es importante tomar en cuenta que la distribución de los grupos bacterianos cambia dependiendo del ecosistema. En suelos boscosos, los *phyla* más abundantes suelen ser Pseudomonadota y Acidobacteriota (Wei *et al.*, 2018). En sistemas de cuevas, a estos dos grupos se les suma Actinomycetota y Verrucomicrobiota (De Mandal *et al.*, 2017). Y aunque Pseudomonadota y Actinomycetota también dominan los ecosistemas marinos, son igualmente abundantes Bacteroidota, Planctomycetota y Cyanobacteriota (Chen *et al.*, 2021).

De esta manera, destaca el grupo Terrabacteria, el cual es un *superphylum* que contiene a gran parte de las bacterias conocidas, y fue nombrado así porque a las actinobacterias, las cianobacterias y al género *Deinococcus* se les puede relacionar con el inicio de la colonización de los ambientes terrestres (Battistuzzi *et al.*, 2004).

El *phylum* Bacillota pudo haber divergido tiempo después, y es en conjunto con Actinomycetota el mayor exponente de organismos gram-positivos esporulados dentro del grupo (Köberl *et al.*, 2013). La capacidad de esporulación es una de las características que han permitido que estos microorganismos en particular sean capaces de prosperar en ambientes adversos (Mandic-Mulec *et al.*, 2015; Bobek *et al.*, 2017).

2.2.2 La Familia Bacillaceae

La familia Bacillaceae es un grupo taxonómico que contiene principalmente a bacterias aerobias o facultativas gram-positivas con forma de bastón, que en su mayoría son capaces de formar una estructura interior llamada endospora (Mandic-Mulec *et al.*, 2015). La endospora es una estructura de protección compuesta por más de 70 proteínas, la cual permite que la bacteria entre a un estado de letargo mientras las condiciones del medio cambian y son favorables a su crecimiento (Figura 4; McKenney *et al.*, 2012).

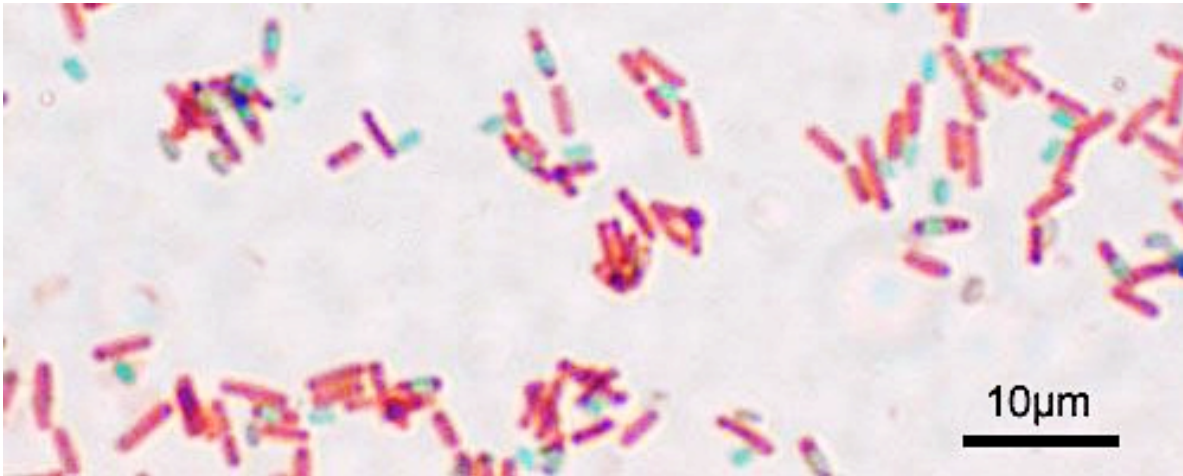


Figura 4. Tinción de Schaffer-Fulton de *Bacillus* sp. en la que se observan las endosporas en verde y las células en rojo. Imagen por Gronstal y Tambe (2019).

De acuerdo con la Lista de Nombres Procarióticos con Posición en la Nomenclatura (LPSN), esta familia tiene 118 géneros nombrados (Parte *et al.*, 2020). No obstante, la gran mayoría de éstos solo cuenta con uno o unos pocos representantes, siendo que anteriormente formaban parte del género *Bacillus*, el cual contiene a la mayor proporción de las especies conocidas de esta familia (Márquez *et al.*, 2011). El continuo desarrollo de las estrategias moleculares es el que ha permitido diferenciar a los miembros que pertenecen o alguna vez pertenecieron a este género, pues anteriormente servía como refugio para colocar a cualquier bacteria aerobia formadora de endospora (Maayer *et al.*, 2019).

Las especies de *Bacillus* tienen gran importancia en los ciclos biogeoquímicos y las redes tróficas, lo cual ha dado pie a su aplicación biotecnológica (Mandic-Mulec *et al.*, 2015). Dentro de la industria farmacéutica, su rol radica en producen bacteriocinas, que son sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica con un amplio espectro de actividad bactericida (Lajis, 2020). Algunas especies capaces de sintetizarlas son *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus laterosporus* (Hatcher y Moon, 2015; Hanafy *et al.*, 2016; Salazar-Marroquín *et al.*, 2016; Somsap *et al.*, 2016; Kurata *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2019).

2.2.3 Los actinomicetos

Las características que distinguen a los actinomicetos son las siguientes: son bacterias gram-positivas con estructura de micelio (Figura 5b); la mayoría forma colonias que se cubren con esporas y le dan un aspecto lanudo a su superficie (Figura 5a). Se los distingue por producir compuestos como geosmina y 2-metilisoborneol, que generan olores terregosos, además de la alta producción y diversidad de otros metabolitos secundarios, entre los que se encuentran antibióticos, fungicidas, herbicidas, quimioterapéuticos e inmunosupresores (Ortenberg y Telsch, 2003; Kodzius y Gojobori, 2015).

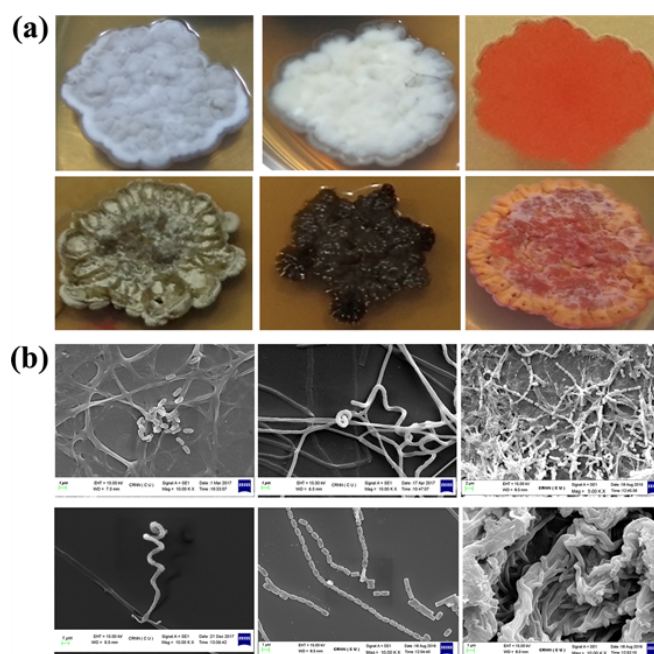


Figura 5. Morfología de aislados de actinomicetos: (a) colonias crecidas en medio ISP2, (B) micrografía SEM (Maiti y Mandal, 2019).

Los actinomicetos son capaces de producir una extensa variedad de antibióticos, en especial dentro de los miembros del género *Streptomyces*, como por ejemplo *Streptomyces orchidaceus*, que produce la cicloserina; *Streptomyces aureofaciens*, la tetraciclina; *Streptomyces venezuelae*, el cloranfenicol; *Streptomyces kanamyceticus*, la kanamicina; *Streptomyces niveus*, la novobiocina; *Streptomyces griseus*, la estreptomicina; y *Saccaropolyspora erythraea*, la eritromicina (Gebreyohannes *et al.*, 2013; Lo Grasso *et al.*, 2016).

De manera general, los actinomicetos se clasifican en estreptomicetos y actinomicetos raros, siendo los estreptomicetos aquellos pertenecientes al género *Streptomyces*, mientras que el resto se consideran los géneros raros, como *Nocardiosis*, *Saccharopolyspora*, *Prauserella*, *Amycolatopsis* y *Promicromonospora* (Zothanpuia *et al.*, 2018). Además, otro criterio para ser llamados actinomicetos raros es que su abundancia en el ecosistema sea muy baja, o que sean difíciles de aislar, de modo que incluso algunas especies del género *Streptomyces* pueden entrar en esta clasificación (Amin *et al.*, 2020).

Hace ya tiempo que los actinomicetos raros se han convertido en los nuevos blancos para expandir la búsqueda de los antibióticos (Lazzarini *et al.*, 2000). El diagrama representado en la Figura 6 intenta explicar el esfuerzo que ha sido necesario para encontrar los antibióticos conocidos, y lo que será necesario hacer para hallar nuevas moléculas.

El círculo rojo del centro indica que para el descubrimiento de los primeros antibióticos como la estreptomicina y la tetraciclina, solo se necesitó aislar y caracterizar de diez a mil actinomicetos. Conforme se obtenían más aislados, más antimicrobianos eran sumados a la lista. En la Figura 6, los círculos rosas evocan a que para lograr llegar a todas las moléculas conocidas, se tuvieron que aislar diez millones de actinomicetos, muchos de los cuales no se han caracterizado en su totalidad (Baltz, 2006; Müller y Wink, 2014).

El problema radica precisamente en que no habrá salida de los círculos rosas si se siguen aplicando los mismos protocolos, por lo que para llegar a los círculos verdes, donde seguramente están los nuevos antimicrobianos, se deberá priorizar la bioprospección de ambientes marinos, ecosistemas inexplorados y territorios con condiciones de vida extremas, pues condiciones así propiciarían la diversidad genética y metabólica (Hamedi *et al.*, 2017).

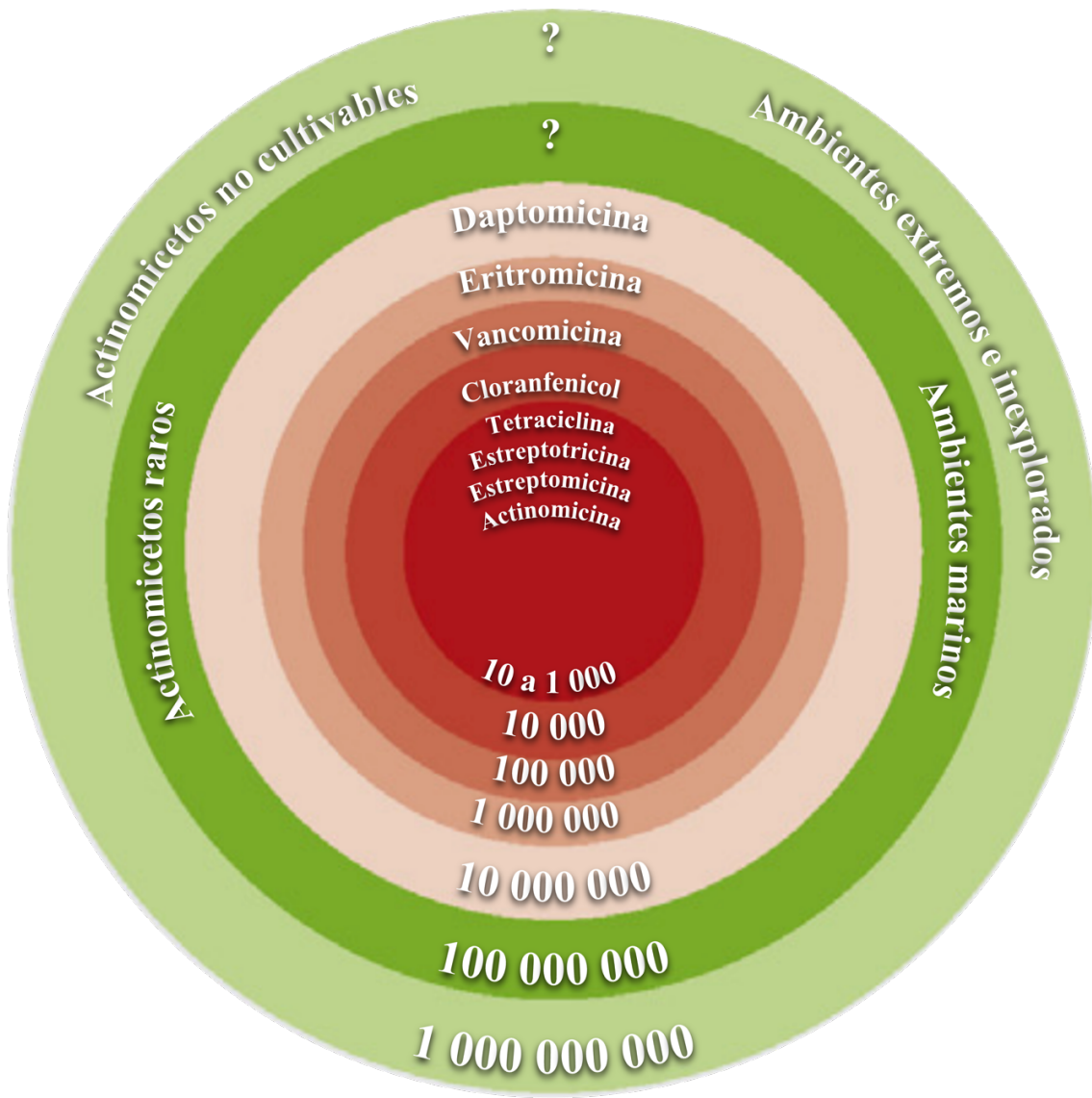


Figura 6. Diagrama que muestra por medio de círculos concéntricos los esfuerzos en el aislamiento de actinomicetos en la búsqueda de antibióticos. Modificada de las originales (Baltz, 2006; Müller y Wink, 2014; Hamedi *et al.*, 2017).

Los actinomicetos habitan cientos de ambientes, como tierra alcalina, sedimento marino, plantas medicinales, intestinos de animales terrestres y el interior de esponjas de mar, y últimamente se ha enfocado la atención a los productos naturales de aquellos que se desarrollan en ambientes extremos, como los desiertos, chimeneas submarinas, cuevas volcánicas y mares altamente salinos (Qin *et al.*, 2016).

2.3 Los habitantes de los ambientes extremos e inexplorados

Cuando se habla de las condiciones ideales para la vida, existe un sesgo muy marcado para declarar como extremo a todo aquello que difiere de los rangos en los que se desarrolla el ser humano, es decir, si las condiciones de temperatura, presión o humedad llegan a impedir o complicar la colonización humana, el ambiente se considera desafiante, aun cuando más del 80% de la superficie terrestre entraría dentro de dicha clasificación (Cavicchioli *et al.*, 2011).

Es así que hay que liberarse del pensamiento de que es sorprendente encontrar organismos vivos en parámetros alejados de lo antropocéntrico, y comenzar a aceptar que quizás la mayor parte de la vida en la Tierra requiere estar por encima de los 90° C, o a 110 Mpa en el fondo marino (Singh *et al.*, 2018).

A los organismos que se desarrollan en ambientes extremos se les da el nombre de extremófilos, y dependiendo de sus requerimientos se subclasifican como extremófilos verdaderos y extremotolerantes. Los extremófilos propiamente dichos son los que necesitan de una o más condiciones extremas para su desarrollo, mientras que los extremotolerantes pueden crecer perfectamente ya sea exponiéndose a estos parámetros o no (Rampelotto, 2013).

Así, podemos nombrar a los termófilos como aquellos organismos que crecen idealmente a altas temperaturas y a los psicrófilos en el extremo contrario, siendo los que prefieren temperaturas bajas; los halófilos habitan ambientes con altas concentraciones de sal; los acidófilos prefieren entornos ácidos; mientras que los alcalífilos los ambientes de pH alto; los barófilos se encuentran en lugares con presiones altas; y finalmente los xerófilos están en áreas áridas (Hui *et al.*, 2021). Muchos de los ambientes en que habitan estos organismos incluso cuentan con más de una condición extrema, por lo que a éstos se les ha dado el nombre de organismos poliextremófilos (Capece *et al.*, 2013). El estudio de los poliextremófilos incluso ha dado pie al avance de ciencias como la astrobiología, que con apoyo de la biología sintética, intenta explicar e imitar cómo podría darse la vida fuera de la Tierra, especialmente en Marte (Galhardo y Rosenberg, 2009; Changela *et al.*, 2021). En la Tabla 1 se enlistan los tipos de extremófilos más estudiados y los rangos que los identifican, con algunos ejemplos.

Tabla 1. Tipos de extremofilia en microorganismos.

Parámetro	Tipo	Condiciones	Ejemplos	Referencias
pH	Acidófilo	pH ≤ 3	<i>Picrophilus oshimae</i>	Rothschild y Mancinelli, 2001; Unterlass, 2017
	Alcalífilo	pH ≥ 9	<i>Natronobacterium gregoryi</i>	
Temperatura	Psicrófilo	< 15° C	<i>Psychromonas ingrahamii</i>	Rothschild y Mancinelli, 2001; Unterlass, 2017; Singh <i>et al.</i> , 2018
	Termófilo	60-80° C	<i>Desulfurobacterium thermolithotrophum</i>	
	Hipertermófilo	> 80° C	<i>Pyrolobus fumarii</i>	
Salinidad	Halófilo ligero	2-5% NaCl	<i>Sporosarcina halophila</i>	Irshad <i>et al.</i> , 2014; Unterlass, 2017
	Halófilo moderado	5-20% NaCl	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	
	Halófilo extremo	20-30% NaCl	<i>Halobacterium salinarum</i>	
Presión osmótica	Osmófilo	30-50% azúcar ^a	<i>Candida pelliculosa</i>	Singh <i>et al.</i> , 2018; Suhartatik <i>et al.</i> , 2018
Presión	Piezófilo	40-110 MPa	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Irwin, 2020; Sarma <i>et al.</i> , 2023
Disponibilidad de agua	Xerófilo	< 0.85 a _w	<i>Aspergillus penicilloides</i>	Irwin, 2020
Radiación UV	Radiotolerante	> 1 kGy	<i>Deinococcus radiodurans</i>	Matusiak, 2016
Nutrientes	Oligotrófico	< 15 mg/L C ^{ab}	<i>Arthrobacter</i> spp.	Poindexter, 2009; Nimonkar <i>et al.</i> , 2022
Tensión oxigénica	Anaerobio	Sin O ₂	<i>Clostridium botulinum</i>	Rothschild y Mancinelli, 2001; Irwin, 2020
Metales pesados	Metalotolerante	> 0.003 mg/L Cd > 0.01 mg/L Pb > 0.001 mg/L Hg > 0.05 mg/L Cr > 2 mg/L Cu > 0.3 mg/L Fe > 0.15 mg/L Mn > 5 mg/L Zn > 0.07 mg/L Ni > 0.2 mg/L Al	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	DOF, 2000; WHO, 2017a; Divakar <i>et al.</i> , 2018

^a: sustancia con más referencias. ^b: no hay un consenso para los límites establecidos, pero éste es uno de los que más se repiten. kGy=kiloGray, a_w=actividad de agua, MPa=megapascales.

2.3.1 Distribución de las extremofilias en el árbol de la vida

La diversidad filogenética de los organismos extremófilos se limita a la vida microbiana, por lo que su gran mayoría pertenecen a los dominios Bacteria y Archaea, teniendo solo algunos representantes en el dominio Eukarya, como las algas halófilas y los hongos psicrófilos (Figura 7). No obstante, tiene cierta complejidad, puesto que las características extremas no siempre se limitan a un solo grupo taxonómico; existen géneros exclusivamente compuestos por termófilos, y otros que combinan termófilos y mesófilos; de igual manera, una característica extrema como la barofilia se puede distribuir por todo el árbol de la vida, o se puede dar el caso de que un mismo género contenga halófilos, alcalífilos y acidófilos (Rampelotto, 2013).

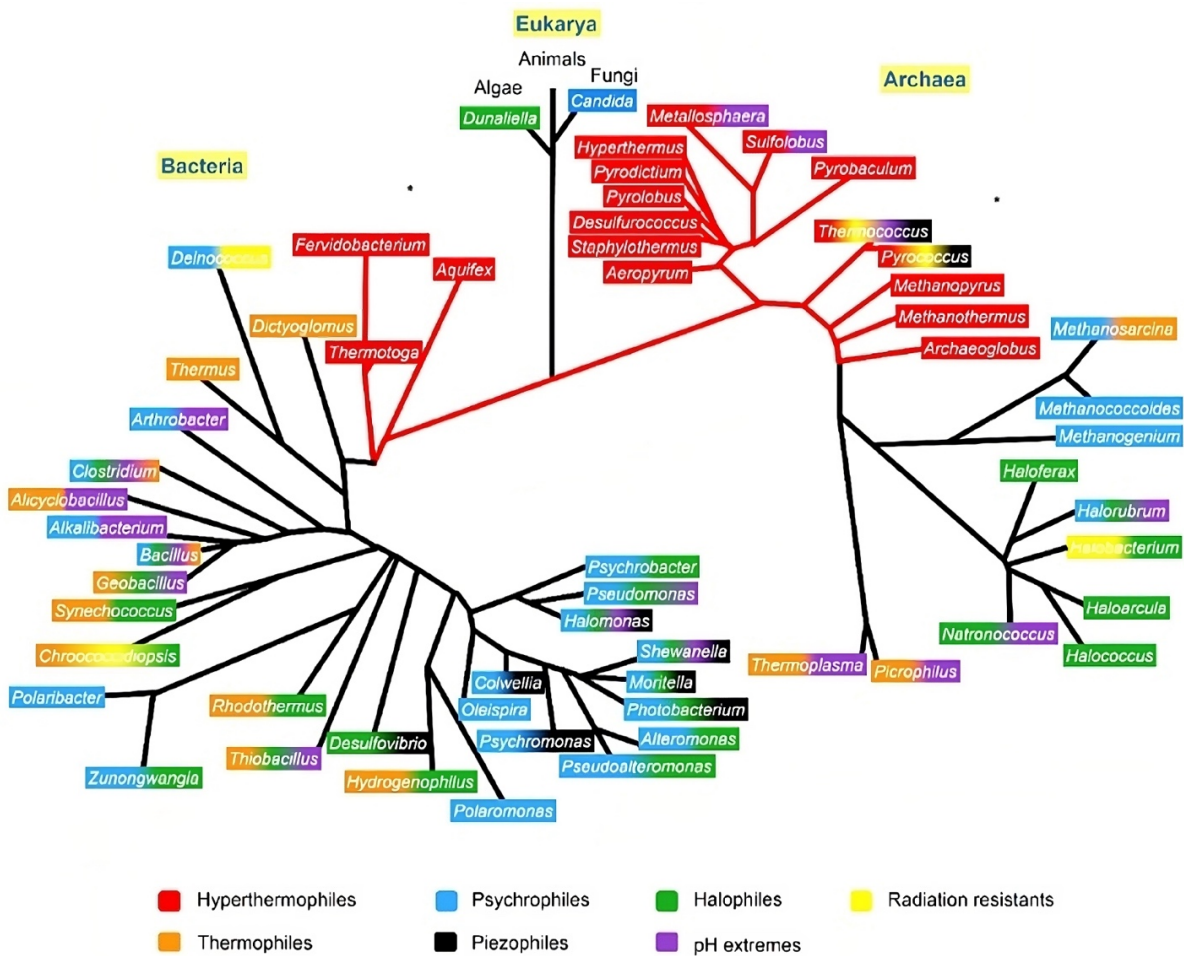


Figura 7. Árbol filogenético que identifica con el código de colores a los extremófilos y las características de resistencia que aparecen por lo menos en una especie de cada género (Leal Dalmaso *et al.*, 2015).

Esta distribución sin aparente uniformidad puede estar ligada a la hipótesis de que el primer ancestro común universal (LUCA) pudo haberse desarrollado en condiciones de hiperextremofilia, y aunque es un tema en debate, existe evidencia de que la extremofilia existió desde las primeras diversificaciones de los procariotes (Weiss *et al.*, 2016; Catchpole y Forterre, 2019).

Uno de los géneros en los que se aprecia este fenómeno es el género *Bacillus*, que se distribuyen por una amplia variedad de hábitats. Los *Bacillus* pueden encontrarse desde alimentos, plumas de aves e intestinos de animales, hasta superficies rocosas, desperdicios y pinturas, e incluso en lagos salados y chimeneas hidrotermales (Harirchi *et al.*, 2022). Las temperaturas de crecimiento de diferentes aislados de *Bacillus* también radican en lo extremo, pues tiene miembros que prefieren rangos de entre -2° y 20° C, u otros que solo se desarrollan por encima de los 50° C (Vos *et al.*, 2011).

Los estudios a base de cultivo para continuar entendiendo la ecología de los microorganismos en los ambientes extremos no solo permiten conocer los procesos metabólicos gracias a los cuales se han adaptado a dichos espacios, sino que también dan pie a extrapolar estos procesos y aplicarlos en la industria (Zhu *et al.*, 2020; de la Haba *et al.*, 2022).

2.3.2 El potencial biotecnológico de los microorganismos extremófilos

El primer registro de un estudio que involucrara algún microorganismo que creciera en condiciones de extremofilia data de 1958, cuando Koki Horikoshi se encontró con que uno de sus matraces con cultivo de *Aspergillus orizae* había sido contaminado con una cepa de *Bacillus circulans*, la cual había sido capaz de lisar la pared celular de *A. orizae*, lo que alcalinizaba el medio, exponenciando el crecimiento de *B. circulans* (Horikoshi e Iida, 1958). Este incidente llevó a que se estudiara la producción de la endo-1,3-β-glucanasa sintetizada por *B. circulans*, marcando también el primer registro de una aplicación biotecnológica en microorganismos extremófilos (Horikoshi, 2016).

En 1969 ocurrió el descubrimiento de uno del que quizás es el extremófilo más conocido para el dominio público: el termófilo *Thermus aquaticus*; éste requiere una temperatura mínima de 40° C para desarrollarse, pero su crecimiento óptimo se da hasta los 70° C,

llegando al máximo de 79° C (Brock y Freeze, 1969). La llegada de este bacilo al mundo científico tuvo una importancia enorme, ya que el aislamiento de su polimerasa (Taq polimerasa) en 1976 llevó al desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 1988, gracias a la cual se pudieron estudiar más profundamente los genomas (Ishino e Ishino, 2014).

Es claro entonces que desde el inicio de su descubrimiento, los trabajos con microorganismos extremófilos no se han limitado a estudiar los mecanismos celulares que les permiten vivir en sus particulares condiciones, sino a utilizarlos para una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas (Tse y Ma, 2016). La Tabla 2 resume las industrias o aplicaciones en las que más se ha dado uso a algunas de las clasificaciones de extremófilos más comunes.

Tabla 2. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos extremófilos más comunes.

Extremofilia	Proceso/Industria	Ventaja
Termófilos	Hidrólisis de almidón	Estabilidad enzimática
	Blanqueamiento de papel	Reducción de costos
	Procesos alimentarios	Estabilidad enzimática
	Detergentes	Estabilidad enzimática
	PCR	Novedad técnica
Psicrófilos	Producción de lácteos	Estabilidad enzimática
	Detergentes	Mejoramiento del producto
	Maricultura	Mayor eficiencia
	Biorremediación	Mayor eficiencia
	Farmacéutica	Mejoramiento del producto
Acidófilos	Desulfuración del carbón	Novedad técnica
Alcalífilos	Detergentes	Estabilidad enzimática
	Producción de antibióticos	Mayor eficiencia
Halófilos	Farmacéutica	Reducción de costos
	Surfactantes	Novedad técnica

Modificada de Rothschild y Mancinelli (2001).

Es por esta razón que, aun cuando existen avanzadas técnicas de biología molecular y bioinformática para la detección de microorganismos no cultivables y sus enzimas (como la metagenómica y la minería genómica), los estudios dependientes de cultivo no pueden abandonarse (Boehmwald *et al.*, 2016). Son éstos los que permiten analizar individualmente la fisiología de cada organismo, sobre todo cuando se realizan estudios de carácter transcriptómico, o cuando se estandariza un proceso para encontrar las condiciones de cultivo ideales para la obtención de mayor cantidad de una sustancia. De hecho, la combinación de los recursos informáticos actualmente disponibles y la exploración directa en cultivo resulta en una aproximación más rápida, completa y reducida en costos para obtener el mayor provecho de los metabolitos o enzimas que estos microorganismos producen para su supervivencia, como es el caso de los antibióticos (Rampelotto, 2013).

2.4 La resistencia a antibióticos

Se define como organismo resistente a antimicrobianos a todo aquel aislado de origen bacteriano que haya modificado su estado de susceptibilidad frente a un fármaco administrado terapéuticamente, ya sea que de susceptible haya pasado a intermedio o resistente, o que ya haya tenido una resistencia intermedia, y ahora ésta sea completa (Tamma *et al.*, 2012).

Cuando un microorganismo es resistente a más de un antibiótico, se clasifica en alguna de las siguientes tres categorías: multirresistente (MDR), de resistencia extendida (XDR) o panresistente (PDR), dependiendo del número de antibióticos relevantes para su tratamiento que presentan resistencia tras haber sido probados utilizando métodos de referencia (Falagas y Karageorgopoulos, 2008). De modo que un MDR es resistente al menos a tres de los grupos de antibióticos con relevancia para su tratamiento; un XDR lo será para todos, excepto uno o dos de ellos, para los que se mantendrá susceptible o con resistencia intermedia; y un PDR será resistente a todos los antibióticos de su lista (Jiménez Pearson *et al.*, 2019).

2.4.1 Planes de acción para combatir la contingencia

La resistencia se ha convertido en un problema mundial de alta prioridad, que en algunos países ya se intentaba resolver a nivel local, como es el caso del gobierno de los Estados Unidos, que desde 1999 fundó la Fuerza Interagencial para la Resistencia Microbiana (ITFAR), que se ha encargado de monitorear y combatir la situación dentro del país (Metz y Shlaes, 2014).

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (WHO) publicó una lista de microorganismos con resistencia a antibióticos, la cual contiene 12 grupos bacterianos clasificados en tres órdenes de prioridad a cuán urgente es encontrarles un antimicrobiano efectivo (Figura 8; WHO, 2017b). A partir de ésta fue que en el 2018 México puso en aplicación la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos, publicada en el Diario Oficial de la Federación, con el objetivo de mejorar el uso de los antibióticos y combatir la resistencia a los mismos (DOF, 2018).

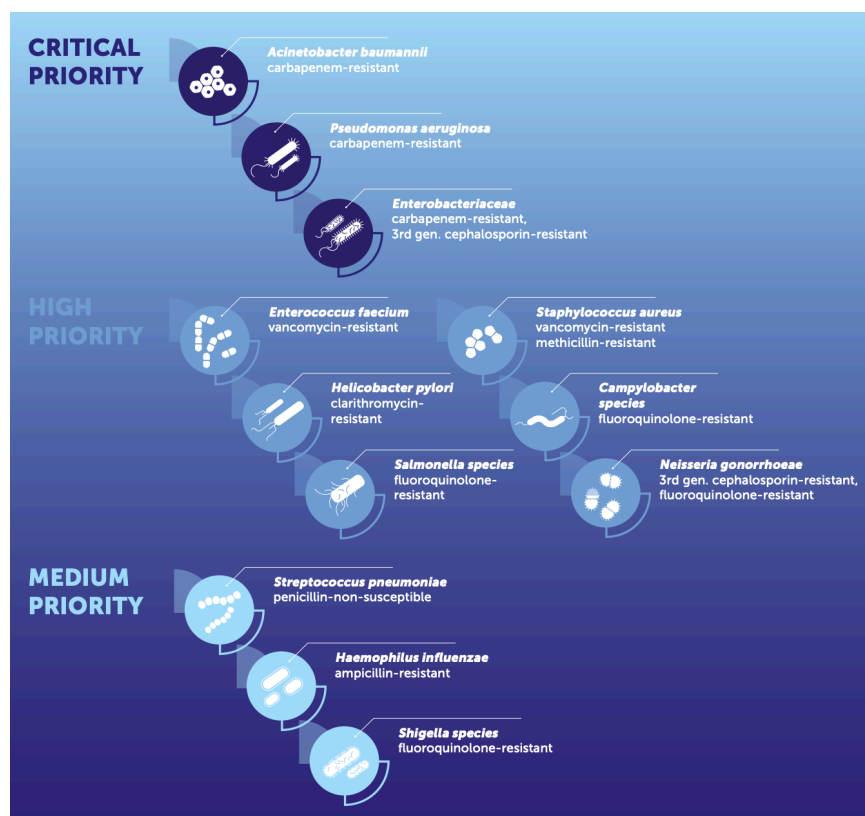


Figura 8. Patógenos bacterianos identificados por la WHO que son prioridad para encontrar nuevos tratamientos para sus infecciones (WHO, 2017c).

En junio de 2023, la WHO publicó la lista con las 40 prioridades para la investigación dentro del tema de la resistencia a antibióticos, el cual se divide en cinco temas: la prevención de las infecciones, el diagnóstico de las mismas, tratamientos y cuidados, estudios transversales, y estrategias específicas para *Mycobacterium tuberculosis* resistente a antibióticos (WHO, 2023). El documento tiene la finalidad de hacer un consenso de los comunicados y listas que la WHO ha publicado en los últimos años, por lo que retoma su lista de prioridad el 2017 e incluye también a las infecciones provocadas por hongos como *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*.

2.4.2 Los actores de la crisis

Dentro de los 12 grupos publicados por la WHO se encuentran bacterias responsables de infecciones nosocomiales, también conocidas como infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAs), las cuales se distinguen por ser adquiridas durante el proceso de recibir tratamiento médico, ya sea en hospitales, clínicas, o cualquier espacio de salud, que no se tenía en el momento de la admisión (Sikora y Zahra, 2021). La gran mayoría de este tipo de infecciones se asocian al grupo de patógenos agrupados en la definición ESKAPE, la cual se compone de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp. (Rice, 2008).

En el 2017, un estudio de impacto clínico determinó que, dentro de las bacterias resistentes a antibióticos, el grupo ESKAPE tiene los índices de riesgo de mortalidad más altos (Founou *et al.*, 2017). Además, sus altas tasas de mutación genética y lo propensos que son a adquirir elementos génicos móviles, han causado que sus mecanismos de resistencia se extiendan a otros microorganismos (Beatson y Walker, 2014). Los mecanismos generales que han permitido a estas bacterias sobrevivir a altas dosis de antibiótico se agrupan en cuatro categorías: inactivación o alteración del fármaco, modificación de los sitios de unión al fármaco, reducción de la acumulación intracelular, y formación de biopelículas (Santajit e Indrawattana, 2016).

Un análisis sistemático global determinó que 1.27 millones de muertes se atribuían directamente a infecciones por bacterias resistentes a antibióticos en el año 2019 (Figura 9), destacando las resistencias a fluoroquinolonas y carbapenémicos con 306 mil y 243 mil

decesos respectivamente, mientras que los patógenos con mayor número fueron *Escherichia coli* (219 mil), *K. pneumoniae* (193 mil) y *S. aureus* (178 mil); *S. aureus* destaca con la resistencia a meticilina (MRSA), combinación patógeno-resistencia que más muertes provocó (Murray *et al.*, 2022).

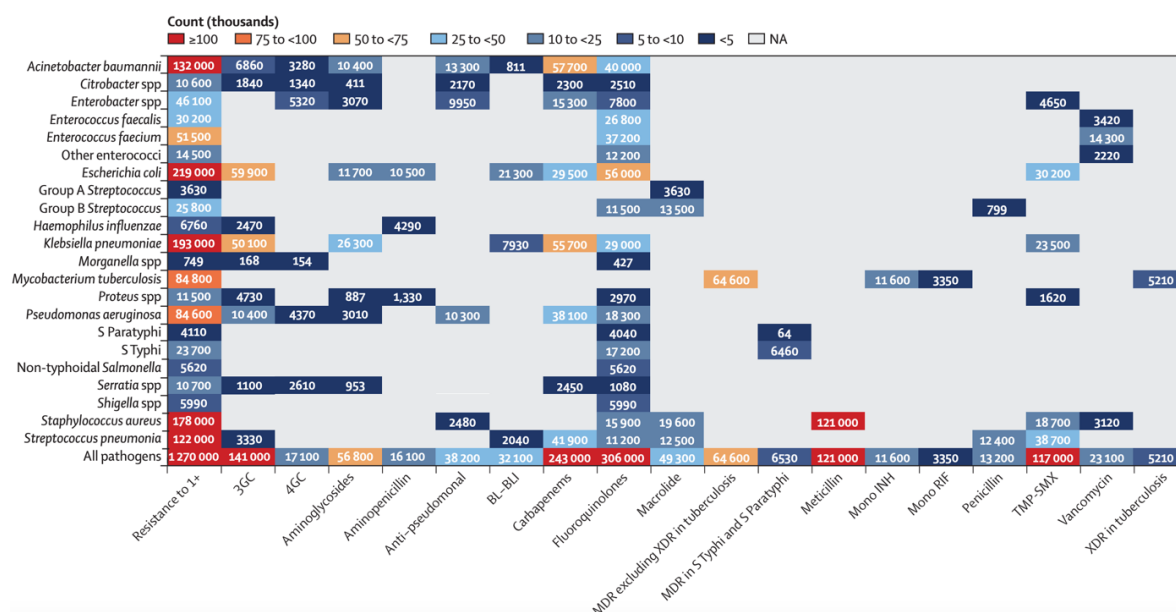


Figura 9. Número de muertes a nivel global atribuidas a bacterias resistentes a antimicrobianos en el 2019. La matriz enfrenta a los patógenos con el antibiótico de importancia al que presentan resistencia (Murray *et al.*, 2022). 3GC= cefalosporinas de tercera generación, 4GC=cefalosporinas de cuarta generación, Anti-pseudomonal=penicilina anti-pseudomónica o inhibidores de β -lactamasa, BL-BLI= β -lactámicos o inhibidores de β -lactamasa, MDR=multirresistente, Mono INH=monorresistencia a isoniazid, Mono RIF=monorresistencia a rifampicina, NA=no aplicable, Resistance to 1+=resistencia a uno o más antibióticos, S Paratyphi=*Salmonella enterica* serotipo *paratyphi*, S Typhi=*S. enterica* serotipo *typhi*, TMP-SMX=Trimetoprima-sulfametoxazol, XDR=resistencia extendida.

2.4.3 Búsqueda de estrategias para combatir la resistencia a antibióticos

Para el tratamiento de las infecciones por patógenos bacterianos resistentes a antibióticos se han propuesto alternativas terapéuticas, como el incremento constante de las dosis (Gaur, 2017). Otras estrategias biotecnológicas incluyen el desarrollo de anticuerpos, terapias con bacteriófagos o CRISPR-Cas9, trasplantes fecales y el uso de los péptidos antimicrobianos, probióticos, bacteriocinas, nanopartículas y enzimas de insectos (Ghosh *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2021; Murugaiyan *et al.*, 2022).

Si bien son soluciones prometedoras, la búsqueda de nuevos antibióticos sigue en pie, incluso aplicando herramientas de inteligencia artificial (Lluka y Stokes, 2022). Desde la publicación de la lista de la WHO, se han descubierto más antibióticos contra gram-negativos, y para finales de 2020, 43 sustancias antimicrobianas ya se encontraban en fases clínicas (Terreni *et al.*, 2021).

Por ello, nuevamente se deben destacar a los productores por excelencia de antibióticos: los actinomicetos. Sus antimicrobianos tienen un espectro estrecho, es decir, suelen ser específicos para un solo grupo bacteriano, lo que ha llevado a la teoría de que pudieran existir especies aún sin descubrir que generaran antimicrobianos con actividad frente a alguno de los ESKAPE (Da Rosa *et al.*, 2020). Por ejemplo, un *Streptomyces* aislado de Arabia Saudita, con 99% de identidad en su gen 16S con *Streptomyces felleus*, presentó actividad frente a un *Enterococcus* spp. de origen clínico (Almalki, 2020).

La producción de estos metabolitos también es dependiente del medio y las condiciones en que se crezcan, pues en un estudio en China donde se aislaron 800 actinomicetos, 96 fueron productores de antibióticos (la mayoría *Streptomyces*), de los cuales 92 lograron inhibir a *S. aureus* resistente a meticilina, 89 a *E. faecium*, 64 a *A. baumannii*, 57 a *K. pneumoniae*, 49 a *Enterobacter cloacae*, y 40 a *P. aeruginosa*, esto sumando los resultados de utilizar dos condiciones de crecimiento distintas, y considerando que sus antibióticos fueron específicos para los gram-positivos o contra solo uno de los gram-negativos (Zhu *et al.*, 2014).

La actividad antimicrobiana de los actinomicetos extremófilos es destacable. En un estudio realizado en Kazajistán, de 2019 actinomicetos aislados, 415 provenientes de ambientes neutros, salinos y alcalinos presentaron antagonismo contra patógenos como *E. coli* y *S. aureus*, siendo los salinos y alcalinos aquellos con halos de inhibición más amplios en comparación con los neutros (Trenozhnikova y Azizan, 2018). Por su parte, en el desierto de Atacama se han aislado cepas de *Streptomyces*, con actividad contra *B. subtilis*, *E. faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*, *E. coli*, y *S. aureus*, e incluso contra MRSA (Rateb *et al.*, 2011; Abdelkader *et al.*, 2018). El desierto de Atacama es uno de los lugares más áridos del planeta, y esto no ha sido obstáculo para que, en los últimos veinte años, se convirtiera en la principal fuente de nuevas especies de actinobacterias, representando el 20 % de todas las especies nuevas y el 50 % de todos los compuestos nuevos descubiertos (Xie y Pathom-aree, 2021).

Esto refuerza la idea de que se debe seguir realizando la bioprospección de ambientes extremos e inexplorados, en nuestro caso sin la necesidad de viajar a Sudamérica o al Medio Oriente, ya que es posible encontrar este tipo de ecosistemas en el Desierto Chihuahuense, específicamente en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Pérez Ortega, 2020).

2.5 Cuatro Ciénegas, Coahuila, como cuna de los nuevos antibióticos

El valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila se encuentra en el Desierto Chihuahuense, dentro del estado de Coahuila de Zaragoza. Su historia geológica data del final de la era Paleozoica, cuando el supercontinente Pangea se dividió en dos partes, y se cree que es un espacio en el que el tiempo prácticamente se detuvo, pues la evidencia biológica se ha topado con especies con características similares a aquellas encontradas únicamente en evidencia fósil (Souza *et al.*, 2008).

Las aguas de Cuatro Ciénegas son ricas en especies endémicas, pues se sugiere que esta área sirvió como un espacio seguro para la protección de flora durante las glaciaciones que sufrió el planeta, con lo cual se manifestaron condiciones ideales para el mantenimiento de microambientes en los que han interactuado una gran cantidad de especies, y que se han mantenido prácticamente inmutables debido al aislamiento geográfico del área y a que su ambiente es sumamente estable (Souza *et al.*, 2004).

Se considera un oasis perdido dentro del desierto mexicano, alimentado por algunas corrientes subterráneas, pero cuya principal rareza se distingue en los nutrientes disponibles; las aguas recuerdan a ambientes marinos a pesar de la escasa presencia de NaCl, que se compensa con azufre y magnesio; pero lo más sorprendente es cuán poco fósforo se puede cuantificar (Souza *et al.*, 2012). Mientras que el ratio de nitrógeno frente a fósforo (N:P) ideal para la vida en la mayor parte de la Tierra se considera en 16:1, las aguas de Cuatro Ciénegas lo conservan en 167:1, que puede llegar a ser mucho más extremo a nivel intracelular en algunas especies; es por esto que se ha tomado como ejemplo claro de las consecuencias que la biodisponibilidad de nutrientes puede tener en el curso de la evolución de la vida (Souza *et al.*, 2018). Asimismo, hay pozas como los Domos del Arqueano en el Rancho Pronatura que se pueden considerar como ecosistemas extremos, dado que en el estudio realizado por

Medina-Chávez *et al.* (2023) se registró una salinidad en el agua de 53.36 psu, y un pH de 9.94.

Es el Valle de Cuatro Ciénegas uno de los pocos en el mundo en el que aún se pueden encontrar estromatolitos vivos (Figura 10). Los estromatolitos están formados por un conglomerado de microorganismos que alguna vez abundó por los océanos prehistóricos, y que se han mantenido en conjunto con muchas otras bacterias de origen marino, cuyos números llegan hasta más de cinco mil especies diferentes, una cantidad sorprendente para la extensión geográfica que abarcan (Souza *et al.*, 2018).

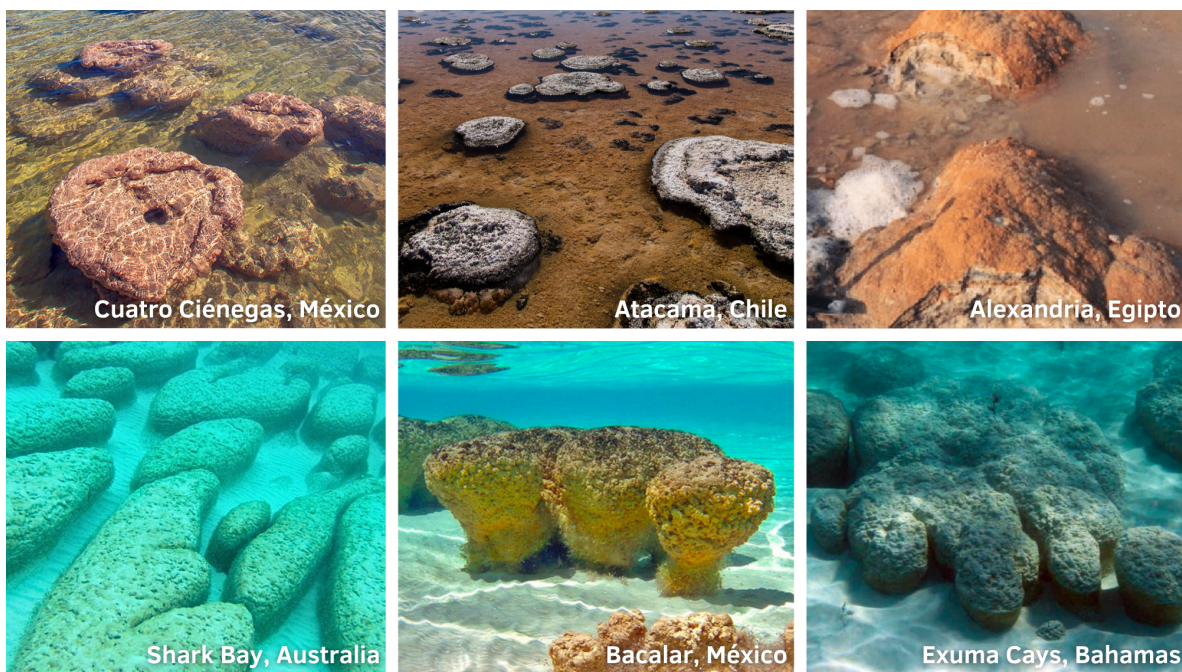


Figura 10. Seis de los lugares que aún cuentan con estromatolitos vivos: Cuatro Ciénegas (Pérez Ortega, 2020), Atacama (Poch, 2018), Alexandria (Aref y Taj, 2012), Shark Bay (BME, 2018), Bacalar (Sandoval Villalbaz, 2016), Exuma Cays (BME, 2018).

2.5.1 La diversidad microbiana en el Valle de Cuatro Ciénegas

A pesar de la escasez de nutrientes, la biodiversidad en Cuatro Ciénegas es inmensa. Por ejemplo, en el 2018 al estudiar muestras de un área de apenas 1 km² del sistema hidrológico Churince, se identificaron 5,167 OTUs pertenecientes a 57 *phyla* bacterianos, lo cual compite

directamente con estudios más grandes realizados en lugares extremos con alta biodiversidad, como las chimeneas hidrotermales de Yellowstone, los salares de Guerrero Negro o los suelos congelados de la Antártica (Souza *et al.*, 2018).

El *superphylum* Terrabacteria no se queda atrás en Cuatro Ciénegas. Uno de los grupos con alta diversidad es el género *Bacillus*; un estudio de Churince con aislamiento enfocado a bacterias de este género logró recuperar 428 bacterias identificadas como *Bacillus* spp., abarcando el 91.6% de sus aislados totales (Rodríguez-Torres *et al.*, 2017).

Además, el esfuerzo de aislamiento enfocado a actinobacterias de Churince realizado por Arocha-Garza *et al.* (2017) obtuvo 350 aislados con características morfológicas del *phylum* Actinomycetota. De estos aislados, 104 fueron secuenciados, y se encontró una dominancia del género *Streptomyces* del 54% de las secuencias, pero contando también con miembros de géneros raros como *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Blastococcus*, *Glycomyces*, *Cellulosimicrobium*, *Verrucosipora*, *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Kocuria*.

También se han realizado estudios metagenómicos de diversidad en el ecosistema hipersalino de los Domos del Arqueano, que se encuentran en el Rancho Pronatura, siendo que las bibliotecas de secuencias de genes 16S revelaron un agregado de 40 *phyla* procariotas (Espinosa-Asuar *et al.*, 2022). Bacteroidota fue el *phylum* con el mayor recuento de lecturas, aproximadamente el 23% de todas las secuencias de las muestras, seguido por Pseudomonadota y Cyanobacteriota, cada uno con alrededor de 18%, Spirochaetota con 8%, Chloroflexota con 4%, y Bacillota y el grupo Patescibacteria tuvieron una aparición de casi 2%. Medina-Chávez *et al.* (2023) también mencionan una prevalencia importante de los *phyla* Thermodesulfobacteriota y Actinomycetota. Alvarez Godínez (2021) realizó una bioprospección de los Domos del Arqueano con enfoque en este último *phylum*, en la que logró recuperar 98 aislados de actinomicetos, 55 de los cuales crecieron en medios con pH 9.5, exhibiendo así la creciente diversidad del ecosistema y la existencia de actinomicetos alcalifilos en Cuatro Ciénegas.

Adicionalmente, el potencial antimicrobiano de los actinomicetos cuatrociéneguenses ya ha sido demostrado por Correa Oviedo (2023). Tras evaluar a 214 aislados, encontró que 87 de ellos fueron capaces de inhibir a por lo menos a uno de los aislados clínicos resistente a

antibióticos probados (*A. baumannii* XDR, *S. aureus* 20-499 MDR, *S. aureus* 20-402 MDR, *Staphylococcus epidermidis* 17-1758 MDR, *S. epidermidis* 16-1998 MDR, *Staphylococcus haemolyticus* MDR y *Staphylococcus cohnii* MDR). La Figura 11 muestra el número de actinobacterias que inhibieron a cada patógeno, en cuatro medios de cultivo distintos.

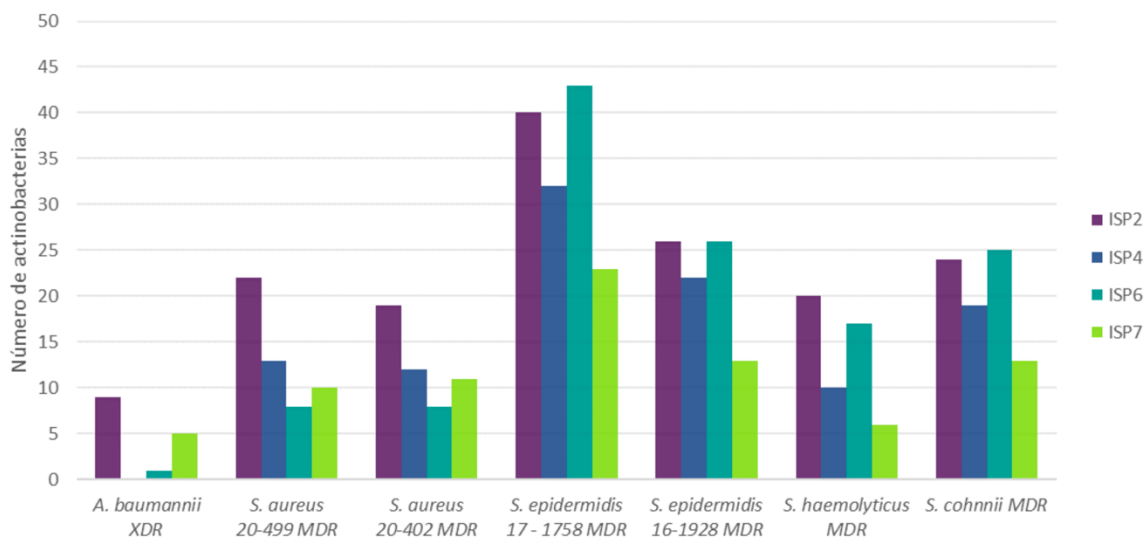


Figura 11. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas evaluadas, capaces de inhibir a aislados clínicos hospitalarios con multirresistencia a antibióticos (Correa Oviedo, 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de diversidad refuerzan la importancia de tener una amplia variedad de organismos interactuando en un mismo sitio, ya que fuertes relaciones tróficas vienen acompañadas de metabolismos que se complementan, aumentando la dinámica de los nutrientes y permitiendo así que se liberen al medio moléculas distintas que pueden ser utilizadas para supervivencia y adaptación de los miembros de la comunidad.

Los seres humanos, por medio de la biotecnología, han sido capaces de aprovechar estos productos naturales para su uso en industrias como la pecuaria, la agrícola y la farmacéutica. Los antibióticos y antifúngicos son la estrella de esta última, pues gracias a ellos es que ha sido posible combatir las enfermedades infecciosas que tantos decesos han causado a lo largo de la historia.

Hoy en día estas enfermedades han subido de nivel, dado que cada vez surgen más patógenos resistentes a los antimicrobianos que antes los podían erradicar con facilidad. Se ha estimado que, en los próximos años, más de 10 millones de muertes anuales podrían asociarse a la farmacorresistencia. Esta situación, acompañada de la falta de descubrimiento de nuevos antibióticos, ha requerido el diseño de nuevas estrategias para encontrar moléculas novedosas que puedan aplicarse a nivel clínico.

Los actinomicetos, en especial los dimanantes de ambientes inexplorados, o de sitios con condiciones físicas y químicas adversas, son una fuente prometedora de metabolitos con actividad antimicrobiana que no hayan sido descritos con anterioridad. El Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, en el Desierto Chihuahuense, reúne las suficientes características como para ser el lugar ideal para la búsqueda de actinobacterias filamentosas productoras de nuevos antibióticos

4. HIPÓTESIS

Las condiciones extremas de las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, determinan la composición de la diversidad bacteriana cultivable y el aislamiento de microorganismos con potencial biotecnológico.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Analizar la diversidad y el potencial biotecnológico de comunidades bacterianas extremotolerantes de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar microorganismos extremotolerantes y mesófilos al muestrear ocho pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
2. Comparar la diversidad bacteriana entre una poza de condiciones extremas y una de condiciones mesófilas, utilizando secuencias del gen 16S.
3. Determinar los rangos de crecimiento en distintos niveles de pH y concentraciones de cloruro de sodio de los actinomicetos aislados con medios de condiciones extremotolerantes.
4. Identificar y caracterizar actinomicetos extremotolerantes con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Áreas de estudio

Dentro del área natural protegida del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, de los años 2020 a 2022, se obtuvieron muestras de agua, agua con sedimento y sedimento seco de ocho de sus pozas, ubicadas en cuatro sitios (Figura 12): Cuatro pozas en Rancho Pronatura (La Poza Azul, Los Domos del Arqueano, El Arqueanito, La Poza Verde), dos en Los Hundidos (Las Pozas Rojas, El Hundido), El Churince y La Becerra. Las coordenadas geográficas de cada poza se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Coordenadas de las pozas del Valle de Cuatro Ciénegas a partir de las cuales se obtuvieron las muestras.

Nombre de la poza	Coordenadas
La Poza Azul, Rancho Pronatura	26°49'39.03"N, 102°01'26.94"O
Los Domos del Arqueano, Rancho Pronatura	26°49'41.86"N, 102°01'23.67"O
El Arqueanito, Rancho Pronatura	26°49'42.86"N, 102° 1'24.43"O
La Poza Verde, Rancho Pronatura	26°49'35.84"N, 102°01'22.87"O
Las Pozas Rojas, Los Hundidos	26°52'16.80"N, 102°01'11.30"O
El Hundido, Los Hundidos	26°52'15.24"N, 102°01'14.12"O
Sistema Churince, El Churince	26°50'53.79"N, 102°08'30.29"O
Poza La Becerra, La Becerra	26°52'40.99"N, 102°08'17.41"O

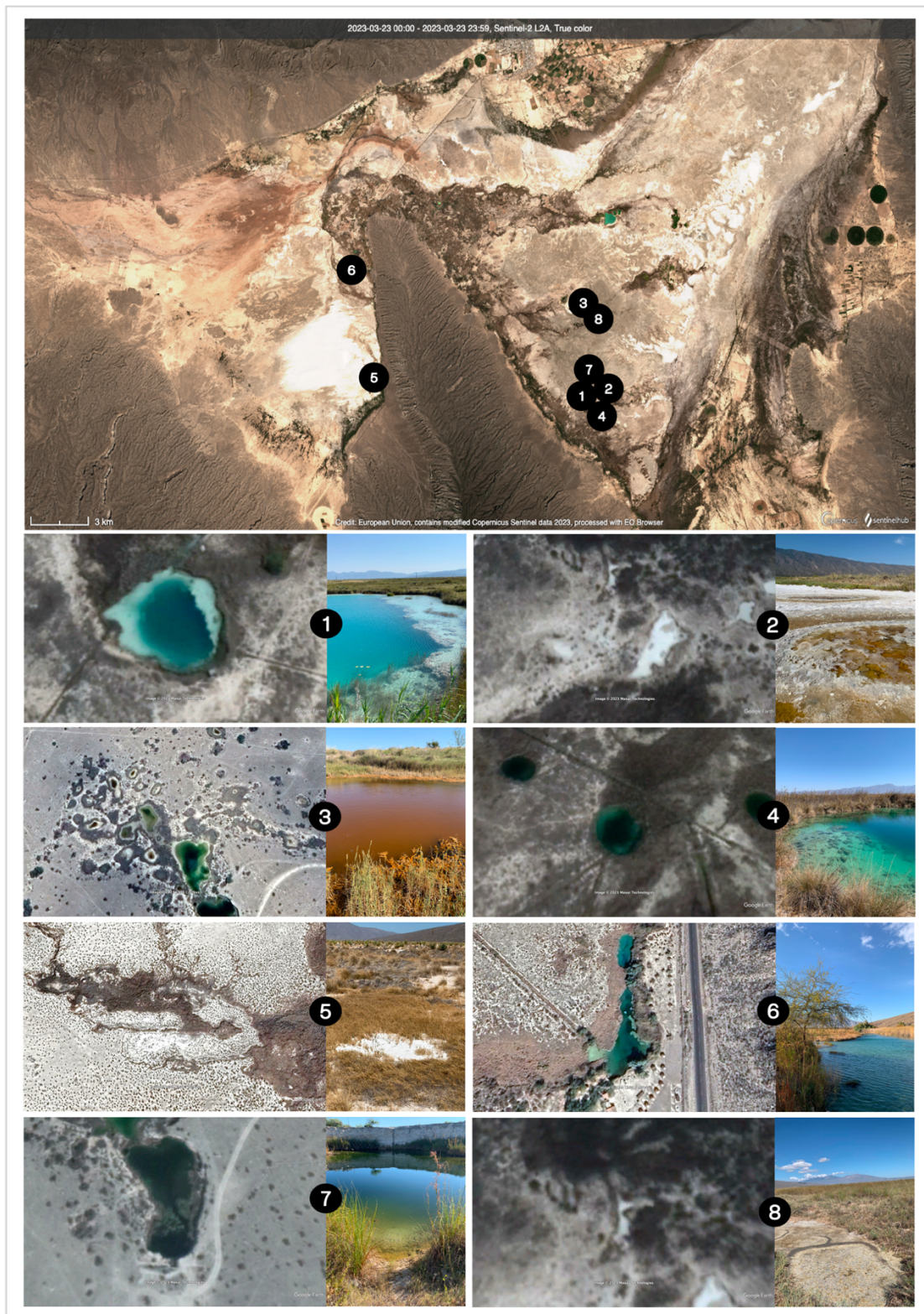


Figura 12. Mapa del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, ubicando de manera representativa cada una de las pozas en las que se realizó el muestreo, así como la vista aérea de la poza y su vista peatonal. **1.** La Poza Azul (Rancho Pronatura), **2.** Los Domos del Arqueano (Rancho Pronatura), **3.** Las Pozas Rojas (Los Hundidos), **4.** La Poza Verde (Rancho Pronatura), **5.** Sistema Churince (El Churince), **6.** Poza La Becerra (La Becerra), **7.** El Hundido (Los Hundidos), **8.** El Arqueanito (Rancho Pronatura).

6.2 Muestreo

6.2.1 Muestreo 2020

En octubre del 2020, con apoyo del grupo de trabajo de la Dra. Gabriela Olmedo de CINVESTAV Unidad Irapuato, se colectó agua con sedimento en tubos para centrifuga estériles de 50 ml. La profundidad del agua en el sitio de colecta no rebasaba los 40 cm, y la muestra de sedimento fue superficial. Se eligieron diez puntos al azar de la Poza Azul dentro de un radio de 10 m a la redonda de la ubicación con las coordenadas $26^{\circ}49'39.82''\text{N}$, $102^{\circ}01'27.31''\text{O}$ (Figura 13). Las diez muestras se transportaron para ser procesadas de inmediato en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 22 en Cuatro Ciénegas, Coahuila.



Figura 13. Imagen satelital de la Poza Azul en el Rancho Pozas Azules. El círculo de color rojo delimita el área de la que se obtuvieron las diez muestras de agua con sedimento.

6.2.2 Muestreo 2021

En septiembre del 2021, se muestrearon Los Domos del Arqueano (AD) y Las Pozas Rojas (PR), como se resume en la Tabla 4. El muestreo en AD se realizó en dos ocasiones distintas:

la primera fue en condiciones de clara falta de lluvia; y la segunda, seguida de una lluvia torrencial que ocurrió pocas horas después de haber partido de la poza. Por ello distinguimos ambos muestreos como “Arqueano seco (ADS)” y “Arqueano húmedo (ADH)”. Todos los puntos de muestreo se observan en la Figura 14.

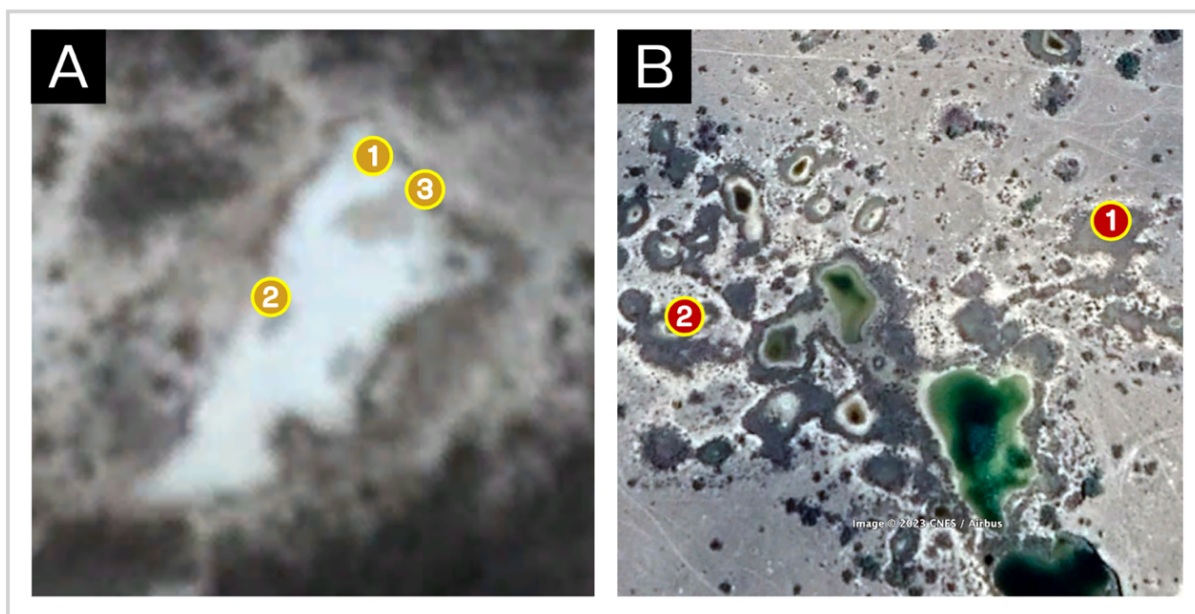


Figura 14. Puntos muestreados en septiembre del 2021. A) Los Domos del Arqueano (AD); B) Pozas Rojas (PR). Los números de los puntos corresponden a los indicados en la Tabla 5.

Tabla 4. Puntos del muestreo realizado en septiembre del 2021.

Poza	Punto	Tipo de muestras	pH	Temperatura	Coordenadas
ADS	1	Agua con sedimento a 5 cm de profundidad sumergida.	7.5	32° C	26°49'42.26"N, 102°01'23.40"O
	2	A. Tapete a 3 cm de profundidad bajo tierra.	7.5	34° C	26°49'41.89"N, 102°01'23.83"O
		B. Suelo a 13 cm de profundidad bajo tierra. C. Suelo a 30 cm de profundidad bajo tierra.			
3	Tapete a 5 cm de profundidad bajo tierra.	7.5	32° C	26°49'42.15"N, 102°01'23.32"O	
ADH	2	Tapete a 5 cm de profundidad sumergida.	9.0	24° C	26°49'41.89"N, 102°01'23.83"O
	3	Tapete a 5 cm de profundidad sumergida.	9.0	20° C	26°49'42.15"N, 102°01'23.32"O

PR	1	A. Costra de sal superficial. B. Tapete a 7 cm de profundidad bajo tierra.	7.0	34° C	26°52'18.27"N, 102°01'12.18"O
	2	A. Agua a 15 cm de profundidad sumergida. B. Agua con sedimento (10 ml) a 20 cm de profundidad sumergida. C. Agua con sedimento (45 ml) a 20 cm de profundidad sumergida.	7.0	24° C	26°52'16.54"N, 102°01'18.10"O

Arqueano Seco (ADS), Arqueano Húmedo (ADH) y Las Pozas Rojas (PR).

En ADS, se tomó muestra de tres puntos distintos. El primer punto se trataba de un charco amarillento al cual se introdujo una espátula estéril para recoger un poco del sedimento a 5 cm de profundidad, que se hidrató con agua superficial del mismo charco. El segundo punto se manipuló excavando con un artefacto artesanal del grupo de investigación perteneciente a la UNAM CDMX liderado por la doctora Valeria Souza; aquí se obtuvo muestra tanto de tapete microbiano a 3 cm de profundidad, suelo a 13 cm de profundidad, y suelo a 30 cm de profundidad; se recogieron las muestras en tubos de centrifuga estériles de 50 ml. El tercer punto fue un corte con espátula estéril a 1 m del primer punto, obteniendo tapete microbiano de colores muy vivos a 5 cm de profundidad, que se colectó en un tubo de centrifuga estéril de 50 ml. Los tubos se cubrieron con papel aluminio. Las muestras de los puntos 1 y 3 fueron procesadas inmediatamente en condiciones no estériles, en el mismo punto de muestreo. Las muestras del punto 2 se llevaron al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

En ADH, se tomó muestra repitiendo los puntos 2 y 3 del muestreo ADS. El punto 1 no se reconsideró debido a que el charco se integró con el resto del agua llovida y ya no había una distinción clara con el punto 3. En ambos puntos seleccionados, se utilizó una espátula estéril para tomar tapete microbiano a 5 cm de profundidad, que fue colectado en tubos de centrifuga estériles de 50 ml, cubiertos con papel aluminio y después llevados para su procesamiento al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

En PR, se tomó muestra de dos pozas. La primera poza estaba cubierta por una costra de sal muy sólida, de 2 cm de grosor; de ésta se cortó un trozo con una espátula estéril y se guardó dentro de un tubo de centrifuga estéril de 50 ml cubierto por papel aluminio. Debajo de la

costra, con la misma espátula se hizo un corte para obtener tapete microbiano a 7 cm de profundidad, que se colectó de igual manera en un tubo estéril cubierto de aluminio. La segunda poza contenía bastante agua; de ésta se tomaron tres tubos de muestra: el primero únicamente contenía agua colectada a 15 cm de profundidad; con el segundo se obtuvo sedimento hasta la marca de 10 ml, y el resto se llenó con agua de la misma poza, a 20 cm de profundidad; el tercero se llenó hasta la marca de 45 ml con únicamente sedimento, y el resto se llenó igual de agua, a 20 cm de profundidad. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se llevaron al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

6.2.3 Muestreo 2022

En marzo del 2022 (Muestreo 2022A), el muestreo abarcó cinco pozas: los Domos del Arqueano (AD), La Poza Verde (PV), Las Pozas Rojas (PR), Churince (CH) y Poza La Becerra (PB). Esto se resume en la Tabla 5, y los puntos pueden observarse en la Figura 15.

Tabla 5. Puntos del muestreo realizado en marzo del 2022.

Poza	Punto	Tipo de muestras	pH	Temperatura	Coordenadas
AD	1	A. Blíster. B. Costra de sal.	7.5	30° C	26°49'42.26"N, 102°01'23.40"O
	2	A. Suelo a 13 cm de profundidad bajo tierra. B. Suelo a 30 cm de profundidad bajo tierra.	7.5	30° C	26°49'41.89"N, 102°01'23.83"O
PV	1	Tapete a 30 cm de profundidad sumergida.	7.0	25° C	26°49'36.32"N, 102°01'23.41"O
PR	2	Agua con sedimento (25 ml) a 100 cm de profundidad sumergida.	8.0	18° C	26°52'16.54"N, 102°01'18.10"O
	3	Agua con sedimento (25 ml) a 50 cm de profundidad sumergida.	9.0	18° C	26°52'16.91"N, 102° 1'11.46"O
CH	1	Tapete a 5 cm de profundidad bajo tierra.	7.5	30° C	26°50'56.00"N, 102°08'35.67"O
PB	1	Agua con sedimento (25 ml) a 220 cm de profundidad sumergida.	7.0	31° C	26°52'42.13"N, 102°08'17.24"O

Los Domos del Arqueano (AD), La Poza Verde (PV), Las Pozas Rojas (PR), Churince (CH) y Poza La Becerra (PB).

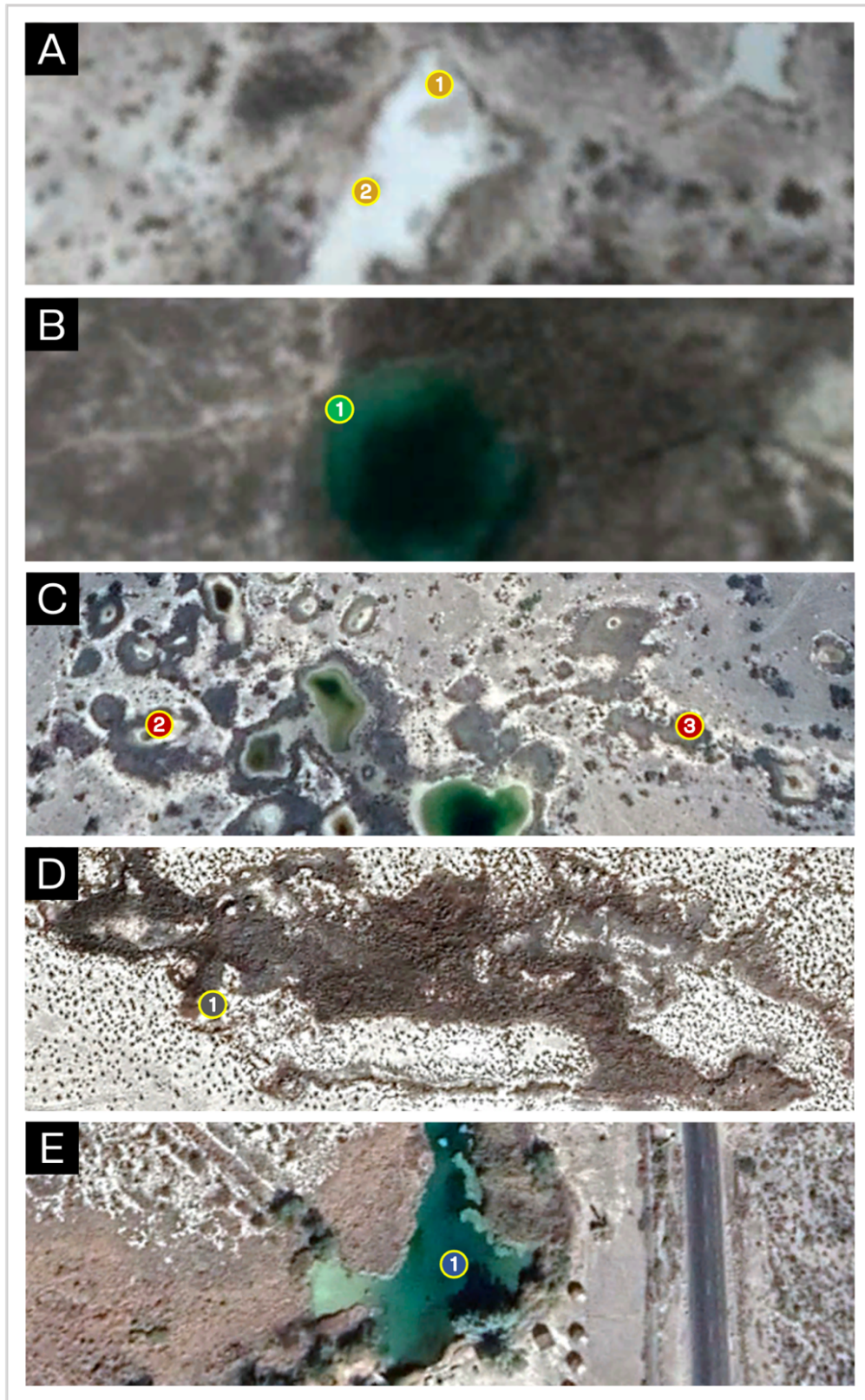


Figura 15. Puntos muestreados en marzo del 2022. A) Los Domos del Arqueano; B) La Poza Verde; C) Las Pozas Rojas; D) Churince; E) Poza La Becerra. Los números de los puntos corresponden a los indicados en la Tabla 6.

En AD se muestrearon dos puntos, los equivalentes a los puntos 1 y 2 del muestreo del 2021. En esta ocasión, no había ni rastro de agua, sino que se apreciaban pequeños cúmulos de color blanco que fueron denominados *blisters*; éstos se ubicaban sobre una costra de sal de 1 cm de grosor, de apariencia quebradiza. De modo que se utilizó una espátula estéril para tomar tanto blíster como costra de sal, y se colocaron en dos tubos para centrífuga de 50 ml estériles independientes. A algunos metros se ubica PV, y de ésta se tomó muestra de tapete microbiano al sumergir los brazos aproximadamente 30 cm y escarbar el fondo con un tubo para centrífuga de 50 ml estéril. Los tubos fueron cubiertos por papel aluminio y llevados al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

En PR, al contrario que AD, el nivel de agua era mucho mayor que en el muestreo de 2021. Se decidió volver a muestrear la poza marcada con el número 2 en la Figura 14, solo que en esta ocasión fue necesario sumergirse hasta 100 cm para tomar sedimento del fondo. Se descartó muestrear la poza marcada por el punto 1 en la Figura 14, debido a que los límites de ésta se difuminaron por la abundancia de agua. De este modo, se optó por tomar sedimento de la poza marcada con el punto 3 en la Figura 15, cuyo sedimento se encontraba sumergido a alrededor de 50 cm de profundidad. En ambas ocasiones, se utilizaron tubos para centrífuga de 50 ml estériles, que fueron llenados con sedimento hasta la marca de 25 ml, y el resto por agua. Los tubos fueron cubiertos por papel aluminio y llevados al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila, para ser procesados.

En CH, el único punto de interés fue un espacio con apariencia muy similar a la de AD, pues se encontraba seco y cubierto por blisters, además de una capa blanca de sales. Se utilizó una espátula estéril para cortar a 5 cm de profundidad, en donde se encontró tapete microbiano que fue colectado con un tubo para centrífuga de 50 ml estéril. Después se procedió al muestreo de PB. Ésta es una poza con varios metros de profundidad, que contiene una grieta en su fondo, donde la temperatura es más alta que la superficie. Fue necesario sumergirse alrededor de 220 cm para así tomar sedimento lo más cercano a la grieta posible, utilizando de igual manera un tubo para centrífuga de 50 ml estéril. Los tubos fueron cubiertos por papel aluminio y llevados al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila, para su procesamiento.

En septiembre del 2022 (Muestreo 2022B), el muestreo fue de cuatro pozas: los Domos del Arqueano (AD), Arqueanito (AQ), Las Pozas Rojas (PR) y Los Hundidos (HU). Esto se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Puntos del muestreo realizado en septiembre del 2022.

Poza	Punto	Tipo de muestras	pH	Temperatura	Coordenadas
AD	1	Agua con sedimento (10 ml) a 10 cm de profundidad sumergida.	8.0	24° C	26°49'42.26"N, 102°01'23.40"O
	3	Agua con sedimento (10 ml) a 10 cm de profundidad sumergida.	9.0	24° C	26°49'42.15"N, 102°01'23.32"O
AQ	1	Tapete microbiano en formación, a 5 cm de profundidad bajo tierra.	7.0	32° C	26°49'43.04"N, 102°01'24.41"O
	2	Muestra del surco elevado.	7.0	31° C	26°49'42.99"N, 102°01'24.46"O
	3	Tapete microbiano en formación, a 5 cm de profundidad bajo tierra.	6.0	29° C	26°49'42.93"N, 102°01'24.41"O
PR	1	Agua superficial.	7.0	23° C	26°52'18.27"N, 102°01'12.18"O
	4	A. Agua a 5 cm bajo la superficie. B. Agua con sedimento (10 ml) a 15 cm de profundidad sumergida.	10.0	24° C	26°52'17.35"N, 102°01'18.69"O
	5	Agua con sedimento (15 ml) a 30 cm de profundidad sumergida.	8.0	23° C	26°52'15.45"N, 102°01'16.71"O
HU	1	Agua con sedimento (15 ml) a 20 cm de profundidad sumergida.	7.0	23° C	26°52'13.13"N, 102°01'13.36"O

Los Domos del Arqueano (AD), Arqueanito (AQ), Las Pozas Rojas (PR), Los Hundidos (HU).

AD presentó un nivel de agua mucho mayor al antes observado. Se muestrearon los puntos equivalentes a 1 y 3 del muestreo del 2021 (Figura 16). A unos metros al norte de esta poza, se visitó la que fue bautizada como Arqueanito (AQ), pues presentaba características similares a las observadas en AD en años anteriores. Ésta formaba dos círculos grandes con

un gran surco entre ambos, por lo que se tomó tapete microbiano de los círculos y del surco, con ayuda de una espátula estéril. Lo obtenido se colocó en tubos para centrifuga estériles de 50 ml, los cuales fueron cubiertos por papel aluminio y llevados al Laboratorio de Biología Molecular del Museo Vivo Génesis en Cuatro Ciénegas, Coahuila, para ser procesados.

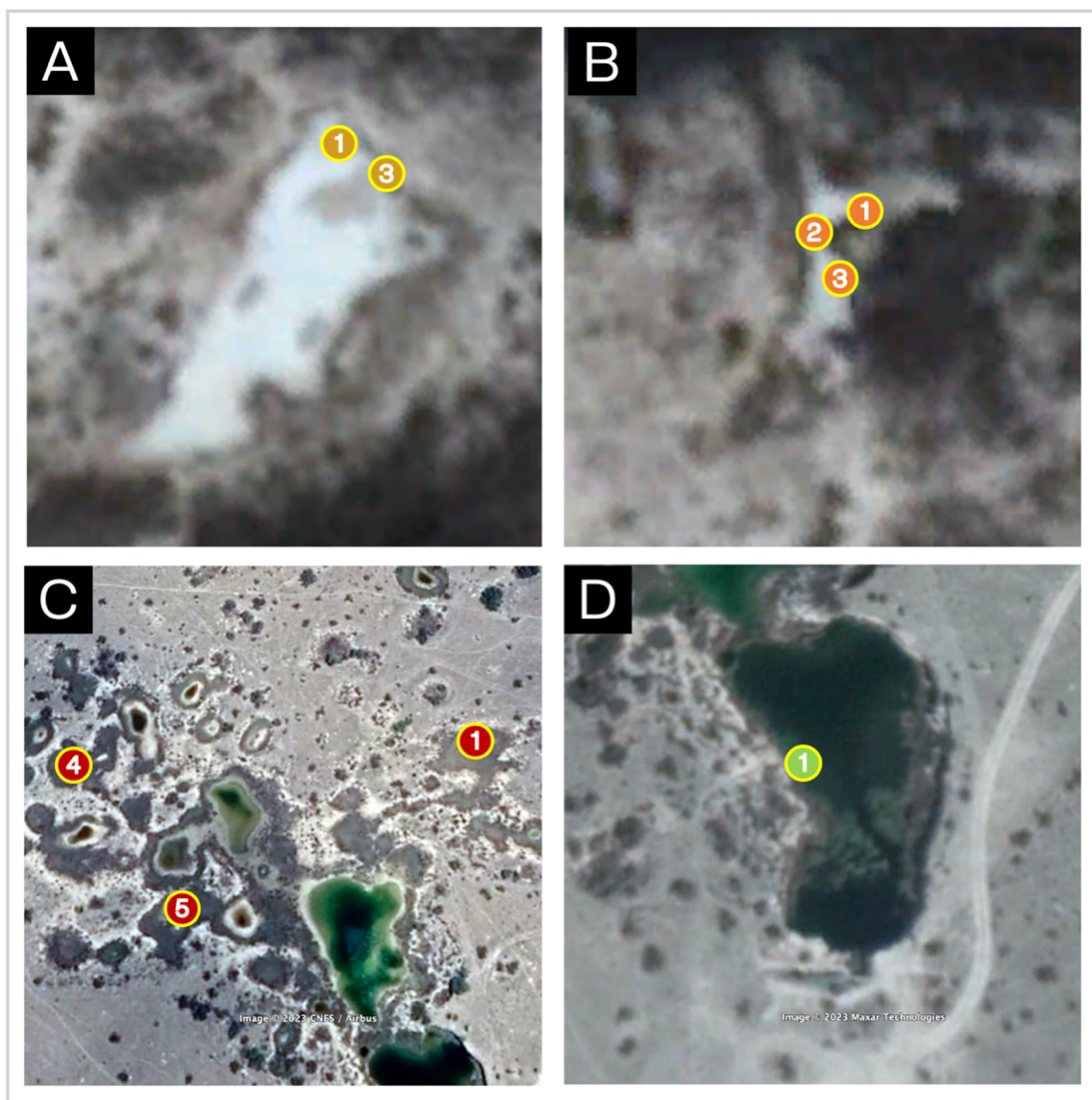


Figura 16. Puntos muestreados en septiembre del 2022. A) Los Domos del Arqueano (AD); B) Arqueanito (AQ); C) Las Pozas Rojas (PR), D) Los Hundidos (HU). Los números de los puntos corresponden a los indicados en la Tabla 7.

PR disminuyó un poco su nivel de agua, a comparación del muestreo anterior, con lo que fue posible volver a tomar de la poza identificada con el punto 1 en la Figura 16, la cual ya se

había muestreado previamente. En esta ocasión, era posible apreciar espuma blanca en la superficie, el cual podría ser un estado anterior al de la costra de sal que tenía en el muestreo de 2021. De esta poza se tomó únicamente agua de la parte más superficial con un tubo para centrífuga de 50 ml estéril. A continuación, se procedió a explorar dos pozas más que no se habían observado antes. La número 4 tenía un aspecto muy rojizo, con lo cual se extrajo tanto sedimento a 15 cm de profundidad, como agua cercana a la superficie. Se utilizó de igual manera un tubo para centrífuga de 50 ml estéril, llenándolo con sedimento hasta la marca de 10 ml. De la poza número 5, con un aspecto más marrón, solo se tomó sedimento usando el mismo tipo de tubo, a 30 cm de profundidad, llenando el tubo hasta la marca de 15 ml con sedimento. Finalmente se tomó una muestra del sistema hidrológico HU, llenando con sedimento hasta la marca de 15 ml, y complementando con agua, sumergiendo el tubo 20 cm por debajo de la superficie.

6.3 Procesamiento de las muestras

Dependiendo de su composición, las muestras se clasificaron en tres grandes grupos: sólidas, líquidas y coloidales. Las muestras líquidas se trataban únicamente de agua; las sólidas fueron todas aquellas que comprendieran suelo, capas de sal, blisters o tapete microbiano, sin que se le hubiera agregado agua al tubo; las coloidales fueron aquellas compuestas de sedimento o tapete microbiano, acompañadas de agua de la misma poza.

Las muestras líquidas se transfirieron de manera directa, agregando 10 ml de éstas a tubos para centrífuga estériles de 15 ml. Las muestras coloidales fueron resuspendidas por inversión, hasta observar una mezcla homogénea, para después igualmente transferir 10 ml de éstas a tubos para centrífuga estériles de 15 ml. Finalmente, se pesó 1 g de las muestras sólidas en tubos para centrífuga estériles de 15 ml, para después resuspenderlos en 10 ml de una solución de sales de Kent al 3.5% y llevarlos al vórtex por dos minutos. Estos tubos se denominarán “tubos de procesamiento” para los siguientes pasos.

6.4 Pretratamientos

Para realizar selección selectiva dentro del aislamiento, se aplicaron algunos pretratamientos físicos y químicos, que se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Pretratamientos aplicados para la obtención selectiva de microorganismos.

Pretratamiento	Descripción
Calor (H)	Se preparó el baño metabólico a 80° C. Se tomó un vaso de precipitado de vidrio de 1 L y en éste se introdujeron los tubos de procesamiento para que estuvieran dentro del baño sin el contacto directo con el agua. Se calentaron durante 30 minutos.
Nistatina (N)	Se agregaron 10 µl de una solución de nistatina a 100 mg/ml al tubo de procesamiento, para después llevarlo al vórtex durante dos minutos. Se esperó durante 15 minutos.
Polimixina B (P)	Se agregaron 5 µl de una solución de polimixina B a 100 mg/ml al tubo de procesamiento, para después llevarlo al vórtex durante dos minutos. Se esperó durante 15 minutos.
Fenol (F)	Se agregaron 5 µl de una solución de fenol al 1.5% al tubo de procesamiento, que después se llevó a agitación a 27° C durante 30 minutos.
Radiación Ultravioleta (U)	Se colocaron las placas ya inoculadas y destapadas en la campana de flujo laminar. Se expusieron a una distancia de 110 cm, durante 30 minutos, a la lámpara de luz ultravioleta, con una potencia de 30 W y una longitud de onda de 253.7 nm.

6.5 Aislamiento primario

El aislamiento primario se dividió en dos vertientes: aislamiento primario de mesófilos y aislamiento primario de extremófilos. Para ello, fueron empleados los medios contenidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Medios de cultivo utilizados durante el aislamiento.

Medio	Composición por litro (1 L)	pH	Muestreo
MM	5 g de peptona, 1 g de extracto de levadura, 0.1 g de citrato férrico, 5 g de cloruro de sodio, 0.1 g de carbonato de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio, 0.4 g de cloruro de calcio, 1 g de sulfato de sodio, 80 mg de bromuro de potasio, 22 mg de ácido bórico, 24 mg de fluoruro de sodio, 16 mg de nitrato de amonio, 80 mg de fosfato de sodio dibásico, 20 ml de sulfato de magnesio 2 M, 16 g de agar bacteriológico.	6.8	2020
HAK1	0.5 g de fosfato de potasio dibásico, 0.5 g de fosfato de potasio monobásico, 1 g de peptona de caseína, 35 g de sales marinas de Kent, 10 g de cloruro de sodio, 10 ml de glicerol, 16 g de agar bacteriológico.	9.0	2021
		10.0	2021
SFM	20 g de manitol, 20 g de harina de soya, 25 g de sales marinas de Kent, 20 g de agar bacteriológico.	7.0	2022B
		9.0	2021
		10.0	2021
ISP2	5 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de dextrosa anhidra, 25 g de sales marinas de Kent, 20 g de agar bacteriológico.	11.0	2022A
ISP2+15	5 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de dextrosa anhidra, 150 g de cloruro de sodio, 20 g de agar bacteriológico.	11.0	2022A
ISP5	1 g de L-asparagina, 1 g de fosfato de potasio dibásico, 1 mg de sulfato ferroso, 1 mg de cloruro de manganeso, 1 mg de sulfato de zinc, 10 ml de glicerol, 20 g de agar bacteriológico.	9.0	2021
		11.0	2022A
ISP5+10	1 g de L-asparagina, 1 g de fosfato de potasio dibásico, 1 mg de sulfato ferroso, 1 mg de cloruro de manganeso, 1 mg de sulfato de zinc, 100 g de cloruro de sodio, 10 ml de glicerol, 20 g de agar bacteriológico.	10.0	2022B
HV	0.5 g de ácidos húmicos y fúlvicos, 0.5 g de ácidos húmicos y carbohidratos (ambos diluidos en 10 ml de hidróxido de sodio 0.2 N), 0.5 g de fosfato de sodio dibásico, 1.71 g de cloruro de potasio, 50 mg de sulfato de magnesio heptahidratado, 10 mg de sulfato ferroso heptahidratado, 20 mg de carbonato de calcio, 0.5 mg de tiamina, 0.5 mg de riboflavina, 0.5 mg de niacina, 0.5 mg de	9.0	2021
		10.0	2021

	piridoxina, 0.5 mg de pantotenato de calcio D, 0.5 mg de inositol, 0.5 mg de ácido paraaminobenzoico, 0.25 mg de biotina, 18 g de agar bacteriológico.	11.0	2022A
MQ	10 g de quitina coloidal, 25 g de sales marinas de Kent, 16 g de agar bacteriológico.	7.0 11.0	2022B 2022A
MQ+10	10 g de quitina coloidal, 100 g de cloruro de sodio, 16 g de agar bacteriológico.	10.0	2022B
R2A	0.5 g de extracto de levadura, 0.5 g de peptona bacteriológica, 0.5 g de peptona de caseína, 0.5 g de glucosa, 0.5 g de almidón soluble, 0.3 g de piruvato de sodio, 0.3 g de fosfato de potasio dibásico, 50 mg de sulfato de magnesio, 15 g de agar bacteriológico.	7.0	2022B

Medio marino (MM), Halófilos y alcalinos 1 (HAK1), Harina de soya y manitol (SFM), International Streptomyces Project 2 (ISP2), International Streptomyces Project 2 adicionado con 15% de cloruro de sodio (ISP2+15) International Streptomyces Project 5 (ISP5), International Streptomyces Project 5 adicionado con 10% de cloruro de sodio (ISP5+10), Ácidos húmicos y vitaminas (HV), Medio de quitina (MQ), Medio de quitina adicionado con 10% de cloruro de sodio (MQ+10), Agar 2A de Reasoner (R2A).

6.5.1 Aislamiento primario de mesófilos

Se obtuvieron dos tubos de procesamiento de cada una de las diez muestras obtenidas de la Poza Azul en el 2020. De éstos, uno se utilizó de manera directa, mientras que el segundo se pasó por el pretratamiento H. Acto seguido, se transfirió 1 ml de cada tubo a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, para después realizarles tres diluciones seriadas con PBS estéril. Se inocularon 150 µl de cada dilución en placas Petri de 90 x 15 mm de Medio Marino (MM, Tabla 8). El inóculo se esparció con perlas de vidrio estériles. Se incubaron por cuatro días a 27° C.

6.5.2 Aislamiento primario de extremófilos

Para la primera etapa de este aislamiento se utilizaron las muestras obtenidas en septiembre del 2021. Se delimitaron con base en el tipo de muestra y el punto de muestreo, de modo que se definieron 12 tubos de procesamiento (Figura 17). ADS-1 y ADS-3 fueron procesadas en condiciones no estériles, sin pretratamientos, a unos metros de la poza, siendo homogeneizadas con una solución estéril de sales marinas Kent al 3.5%, mezclando únicamente por inversión. El resto se manejaron en el laboratorio, dentro de una campana de flujo laminar. ADS-2A, ADS-2B, ADS-2C, ADH-2, ADH-3, PR-1A, PR-1B, PR-2A, PR-2B y PR-2C fueron sometidas a los pretratamientos N y P. De cada tubo se tomaron 150 µl y

éstos se agregaron a una placa Petri de 90 x 15 mm de cada uno de los siguientes medios: HAK1 en pH 9 y 10, SFM en pH 9 y 10, HV en pH 9 y 10, e ISP5 a pH 9. Se añadieron perlitas de vidrio estériles, para después realizar movimientos rectos durante un minuto, de forma que las perlas impactaran contra los lados de las placas, distribuyendo el inóculo. Pasado este tiempo, se retiraron las perlitas y las placas fueron llevadas a incubación en oscuridad a 27° C durante 21 días.

	ADS-1	ADS-2A	ADS-2B	ADS-2C	ADS-3	ADH-2	ADH-3	PR-1A	PR-1B	PR-2A	PR-2B	PR-2C
HAK1 pH 9	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
HAK1 pH 10	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
SFM pH 9	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
SFM pH 10	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
HV pH 9	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
HV pH 10	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
ISP5 pH 9	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 17. Diseño experimental para el aislamiento primario de las muestras obtenidas en septiembre del 2021.

La segunda etapa del aislamiento involucró las muestras tomadas en marzo del 2022. Los tubos de procesamiento también se definieron con base en el tipo de muestra y el punto de muestreo, pero esta vez se agregaron tres más que fueron sometidos al pretratamiento U, obteniendo un total de 12 tubos (Figura 18). Todos los tubos pasaron por los pretratamientos N y F. Se tomaron 150 µl de la muestra procesada y se agregaron a una placa Petri de 90 x 15 mm de cada uno de los siguientes medios: ISP2, ISP2+15, ISP5, HV y MQ, todos a pH 11. Se distribuyeron con perlas de vidrio estériles, agitando las placas en movimientos rectos durante un minuto. Se removieron las perlitas, y únicamente las placas identificadas como AD-1A^{UV}, PR-3^{UV} y CH-1^{UV} se llevaron al pretratamiento U. Fueron incubadas a 27° C durante 21 días en oscuridad.

	AD-1A	AD-1A ^{UV}	AD-1B	AD-2A	AD-2B	PV-1	PR-2	PR-3	PR-3 ^{UV}	CH-1	CH-1 ^{UV}	PB-1
ISP2 pH 11												
ISP2+15 pH 11												
ISP5 pH 11												
HV pH 11												
MQ pH 11												

Figura 18. Diseño experimental para el aislamiento primario de las muestras obtenidas en marzo del 2022.

La tercera etapa del aislamiento se realizó con las muestras de septiembre del 2022. Las etiquetas de los tubos de procesamiento fueron definidas en función de los puntos de muestreo y el tipo de muestra, llegando a 10 tubos; no obstante, para evaluar la diferencia entre la efectividad del fenol y la de los antimicrobianos durante el aislamiento primario, se sometieron a los pretratamientos identificados como N y P (en conjunto), y a F, de forma individual, obteniendo un total de 20 tubos de procesamiento (Figura 19). Se inocularon placas Petri de 90 x 15 mm con 150 µl de las muestras procesadas, en cada uno de los siguientes medios: SFM a pH 7, ISP5+10 a pH 10, MQ a pH 7, MQ+10 a pH 10, y R2A a pH 7.2. El inóculo fue distribuido por perlas de vidrio estériles, al realizar movimientos rectos con las placas durante un minuto. Las perlitas fueron retiradas para proceder a la incubación. Las placas de ISP5+10 pH 10 y MQ+10 pH 10 se llevaron a 27° C durante 21 días, mientras que las de SFM pH 7, MQ pH 7 y R2A pH 7.2 se mantuvieron a 55° C por 30 días, todo esto en oscuridad.

	AD-1 ^{NP}	AD-3 ^{NP}	AQ-1 ^{NP}	AQ-2 ^{NP}	AQ-3 ^{NP}	PR-1 ^{NP}	PR-4A ^{NP}	PR-4B ^{NP}	PR-5 ^{NP}	HU-1 ^{NP}	AD-1 ^F	AD-3 ^F	AQ-1 ^F	AQ-2 ^F	AQ-3 ^F	PR-1 ^F	PR-4A ^F	PR-4B ^F	PR-5 ^F	HU-1 ^F	
SFM pH 7																					
ISP5+10 pH 10																					
MQ pH 7																					
MQ+10 pH 10																					
R2A pH 7.2																					

Figura 19. Diseño experimental para el aislamiento primario de las muestras obtenidas en septiembre del 2022.

6.6 Aislamiento secundario

6.6.1 Aislamiento secundario de mesófilos

Pasada la incubación, se observaron las distintas morfologías coloniales, y se seleccionó una de cada tipo de morfología. Éstas fueron transferidas a MM nuevo, e inoculadas por la técnica de la estría cruzada en condiciones de esterilidad. Se incubaron a 27° C durante 72 h (o hasta notar crecimiento abundante) y se repitió la transferencia hasta que el cultivo se encontrara axénico. Logrado esto, se criopreservaron en glicerol estéril al 50%, a una temperatura de -80° C.

6.6.2 Aislamiento secundario de actinobacterias extremófilas

A partir del crecimiento obtenido, se seleccionaron las colonias que aparentaran pertenecer al *phylum* Actinomycetota por lo descrito en la literatura. Adicionalmente, se consideraron los siguientes criterios:

- ◇ Presencia de antagonismo.
- ◇ Pigmentación de la colonia.
- ◇ Textura resistente o dura al momento de manipular.
- ◇ Elevación destacada.
- ◇ Producción de gotas.
- ◇ Presencia de esporulación.
- ◇ Expansión de la colonia en medios complejos.

Las colonias se transfirieron a una placa del mismo medio del que se obtuvieron, por medio de la técnica de la estría cruzada en condiciones estériles. Se incubaron a 27° C durante siete días y se repitió la transferencia hasta que el cultivo se encontrara axénico.

Se procedió a la identificación microscópica de los aislados por medio de tinciones Gram. Únicamente se retuvieron aquellos que resultaran gram-positivos y cuyas estructuras fueran filamentosas, las cuales son características morfológicas de los actinomicetos. Además, se describieron los fenotipos obtenidos.

Para propiciar el aumento de biomasa, se reinocularon los aislados en medio SFM al mismo pH de su medio de origen. En caso de no presentarse crecimiento, se utilizaron también los medios ISP2 e ISP4, a pH 7 y pH 9, en estados sólido y líquido. Posteriormente, se criopreservaron en glicerol estéril al 50%, a una temperatura de -20° C.

También se evaluó la asociación entre el medio de cultivo y el pH para aislar un mayor número de morfotipos de actinomicetos, a través de un análisis de tabla de contingencia.

6.7 Análisis filogenético de mesófilos

6.7.1 Extracción de ADN

Con el fin de dilucidar la identidad de los aislados mesófilos, se realizó una extracción de ADN genómico con el método de fenol-cloroformo. Se partió de cultivos líquidos en MM que estuvieron en agitación a 125 rpm durante 24-48 h. Los cultivos fueron centrifugados a 13 000 rpm para obtener la pastilla celular, a la cual se le retiró el medio, se lavó con buffer TE y fue transferida a un tubo nuevo para microcentrífuga de 1.5 ml.

Aquí se le agregó fenol, cloroformo, perlitas de vidrio, Triton x-100, SDS, NaCl, Tris pH 8.0, EDTA y buffer TE. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 14 000 rpm para dividirla en dos fases. Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo, en donde se le agregó nuevamente fenol y cloroformo.

Se agitó en vórtex y se centrifugó a 13 000 rpm para obtener dos fases nuevamente, y transferir la superior a otro tubo nuevo. Se realizó un lavado con cloroformo y se le agregó etanol 100%. Se mezcló por inversión y se incubó por dos horas a -20° C. Finalmente, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua libre miliQ.

La concentración del ADN y su relación 260/280 se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop. La integridad de éste se evaluó con un gel de agarosa 1%, usando GelRed como agente intercalante.

6.7.2 Identificación molecular

A partir del ADN extraído, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la secuencia del gen 16S de cada aislado. Se utilizó DreamTaq polimerasa de Thermofisher y los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; Lane, 1991) y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'; Stackebrandt y Liesack, 1993), buscando un producto con un tamaño de 995 a 1233 pb.

Las reacciones fueron en un volumen de 25 µl, comenzando en el termociclador con 3 min de desnaturalización inicial a 95° C, para después realizar 34 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95° C, 30 s de alineamiento de los primers a 48° C y 1 min 40 s de elongación a 72° C; la elongación final fue de 5 min a 72° C, para después mantenerse en incubación a 12° C.

La integridad del ADN, así como la obtención del producto deseado, se verificaron en un gel de agarosa 1%, con GelRed como agente intercalante y un marcador de peso molecular de 1 kb. La concentración y su relación 260/280 se midieron con espectrofotómetro NanoDrop. Si la concentración de la muestra era de un mínimo de 12 ng/µl, se procedía a ser mandada al Laboratorio Nacional de Genómica y Biodiversidad (LANGEBIO) en Irapuato, Guanajuato, para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas (denominadas secuencias PA) fueron editadas con BioEdit (Hall, 1999), y se analizaron con la herramienta BLASTn de NCBI (McGinnis y Madden, 2004) para buscar secuencias nucleotídicas que tuvieran similitud.

6.7.3 Elaboración de árboles filogenéticos

Se tomaron 165 secuencias del gen 16S de la colección genética del Laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana, en CINVESTAV Unidad Irapuato, provenientes de microorganismos de los Domos del Arqueano (secuencias AD). Éstas también se analizaron con la herramienta BLASTn de NCBI.

Se realizaron dos alineamientos con MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), ayudándose de la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004). El primero involucró únicamente a las secuencias PA

y AD. Se seleccionó el mejor modelo de sustitución para la reconstrucción filogenética y se construyó un árbol filogenético de unión de vecinos (Neighbor-joining/NJ) con 1000 bootstraps. El segundo alineó a las secuencias PA y AD con 120 de las secuencias obtenidas con BLASTn-NCBI. De igual manera, el mejor modelo de sustitución para la reconstrucción filogenética fue seleccionado y se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (Maximum likelihood/ML) con 1000 bootstraps. Ambos fueron editados en la herramienta iTOL de EMBL.

6.8 Análisis de diversidad ecológica

Para estimar la riqueza y evaluar su calidad, se obtuvo una curva de rarefacción con base en diez muestras de la Poza Azul. También se estimó la riqueza con el estimador no paramétrico Chao2. Ambas estimaciones se realizaron con el programa EstimateS 9.1 (Colwell, 2013).

Se utilizó Past 4.13 (Hammer *et al.*, 2001) para obtener la equitatividad de Pielou (J'), y los índices de diversidad de Shannon-Wiener (H') y Simpson (D) con intervalos de confianza del 95% en función de los morfotipos encontrados en los aislados de la Poza Azul. En el mismo programa, se realizaron pruebas de t (Hutchenson 1970, Brower *et al.* 1988) para comparar la diversidad (H' y D) entre los OTUs obtenidos tanto en la Poza Azul como en los Domos del Arqueano.

Para una cuantificación integrada de la diversidad, se estimaron y compararon los números de Hill para las secuencias de la Poza Azul y los Domos del Arqueano, calculándose de acuerdo con las fórmulas propuestas por Hill (1976).

También se realizó una prueba de t para comparar la media de los morfotipos aislados de la Poza Azul con y sin pretratamiento, en Past 4.13 (Hammer *et al.*, 2001).

6.9 Caracterización morfológica de actinobacterias

6.9.1 Caracterización microscópica

Se llevó a cabo una tinción Gram con cada uno de los aislados de actinobacterias. En un portaobjetos, se colocó una gota de agua bidestilada para distribuir la biomasa de los microorganismos. Se fijó con la ayuda del mechero, y se procedió a teñir. El procedimiento fue cubrir por completo con cristal violeta y reposar un minuto, seguido de un minuto con solución de Lugol, se despintó el exceso con alcohol-acetona y se finalizó con 30 segundos cubierto con safranina. Se llevó al microscopio de campo claro a una magnificación total de 1000 x.

6.9.2 Caracterización macroscópica

Los aislados fueron inoculados en medio ISP2 modificado por Arocha et al. (2017). Se incubaron a 27° C por doce días, y se registró su crecimiento, esporulación y pigmentación los días 2, 5 y 12, con los criterios seguidos por Khodamoradi *et al.* (2021).

6.10 Rangos de extremotolerancia de actinobacterias

Se probaron los rangos de halofilia, acidofilia y alcalifilia de las actinobacterias obtenidas tras el aislamiento secundario de extremotolerantes. Para ello, las actinobacterias fueron reactivadas en medio ISP2 pH 7 e incubadas a 27° C por siete días. Se transfirieron tres sacabocados de cada cultivo a matraces de 500 ml con ISP2 líquido, el cual fue incubado a 27° C, con una agitación de 125 rpm durante diez días. El cultivo fue transferido a tubos para centrífuga de 50 ml, para ser centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos. Estos cultivos fueron los utilizados para los ensayos a continuación.

6.10.1 Ensayo de rangos de pH

Se llevó a cabo en placas de 96 pozos, colocando 135 µl de ISP2 ajustado a once valores de pH: 2.0±0.05, 3.0±0.05, 4.0±0.05, 5.0±0.05, 6.0±0.05, 7.0±0.05, 8.0±0.05, 9.0±0.05,

10.0±0.05, 11.0±0.05 y 12.0±0.05. Cada pozo se inoculó con 15 µl de sobrenadante del cultivo centrifugado. Fueron incubadas a 27° C durante 10 días.

Posteriormente, se leyó la densidad óptica de los pozos a una longitud de onda de 600 nm, entendiendo que, a mayor densidad óptica, mayor crecimiento. Por cada valor de pH se llenaron pozos con medio sin inocular, para posteriormente usarse como blancos en el momento de la corrección de la densidad óptica.

6.10.2 Ensayo de tolerancia a NaCl

Se utilizaron placas de 6 pozos con Medio de Tolerancia a la Sal (MTS; [Por litro]: 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura, 16 g de agar bacteriológico), teniendo seis concentraciones distintas de NaCl: ausencia (0%), 5% m/v, 7.5% m/v, 10% m/v, 12.5% m/v y 15% m/v (Figura 20).

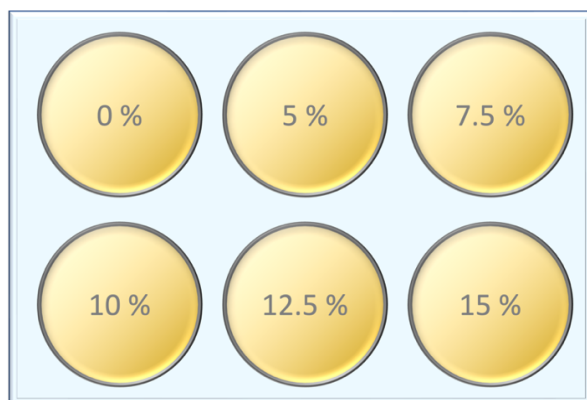


Figura 20. Diseño experimental del ensayo de tolerancia a NaCl en placa de 6 pozos.

A cada pozo se le agregaron 500 µl de sobrenadante del cultivo centrifugado, que se distribuyó inclinando la placa hacia los lados. Fueron incubadas a 27° C por 10 días.

Se interpretó como resultado positivo la presencia de crecimiento en el medio, y como resultado negativo la ausencia de éste.

6.10.3 Nomenclatura de la extremofilia

Para clasificar a los aislados con cierta categoría de extremofilia se tomaron los siguientes criterios, basados en un consenso de los trabajos de Rothschild y Mancinelli (2001), Irshad et al. (2014), Grum-Grzhimaylo et al. (2016), y Unterlass (2017):

- a) Salinidad:
 - a. Mesófilo: crecimiento únicamente en ausencia de sal.
 - b. Halófilo ligero: crecimiento únicamente en 5% de sal.
 - c. Halófilo moderado obligado: crecimiento únicamente a partir de 7.5% de sal.
 - d. Halotolerante ligero: crecimiento sin sal y además en 5% de concentración.
 - e. Halotolerante moderado: Crecimiento sin sal y $\geq 7.5\%$ de concentración.
- b) Escala de pH:
 - a. Mesófilo: crecimiento dentro del rango de pH 4-8.
 - b. Acidófilo: crecimiento dentro del rango de pH 2-3.
 - c. Alcalífilo: crecimiento dentro del rango de pH 9-12.
 - d. Acidotolerante: crecimiento dentro del rango de pH 2-3, y además en pH 7.
 - e. Alcalitolerante: crecimiento dentro del rango de pH 9-12, y además en pH 7.
 - f. Alcalitolerante facultativo: crecimiento dentro del rango de pH 8-12, pero además en $\text{pH} \leq 5$.

6.11 Identificación de actinobacterias con actividad antimicrobiana

6.11.1 Material biológico

Los patógenos utilizados para los ensayos procedieron del cepario de patógenos multidrogorresistentes del laboratorio 9 del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se seleccionaron *S. haemolyticus*, *S. aureus* 20-499, *S. epidermidis* 17-1758, *S. aureus* 20-402, *S. cohnii* y *S. epidermidis* 16-1928. El perfil de resistencia se determinó por Correa Oviedo (2023).

Todos los aislados se encontraban almacenados a -20°C y fueron reactivados en caldo Mueller Hinton (MHB; [Por litro]: 2 g de extracto de carne, 17.5 g de peptona de caseína ácida, 1.5 g de almidón), incubados a 37°C por 18 h.

6.11.2 Ensayos de estría perpendicular

Los actinomicetos fueron reactivados en medio IPS2 y se incubaron a 28 °C por 5-10 días, hasta que se apreciaran completamente esporuladas. Seguidamente, se preparó una solución de esporas con 0.1 g de esporas y 1 ml de Tween 20%. Se colocaron 10 µl de esta solución en placas con medio ISP2, formando una línea recta de 13 mm de ancho que atravesara el centro de la placa. Se llevaron a incubación a 27 °C durante 10 días.

Posteriormente, se agregó una capa de agar Mueller Hinton (MHA; [Por litro]: 2 g de extracto de carne, 17.5 g de peptona de caseína ácida, 1.5 g de almidón, 17 g de agar bacteriológico) por la sección de la placa sin crecimiento. Sobre ésta, se inocularon los patógenos MDR, los cuales habían sido cultivados con 24 h de anticipación, y se habían ajustado a 1.5×10^8 UFC/ml. Se trazaron líneas rectas de 23 mm, perpendiculares al actinomiceto, con un isopo estéril que se sumergía en los cultivos ajustados. Se observa una representación en la Figura 21. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 18 h.

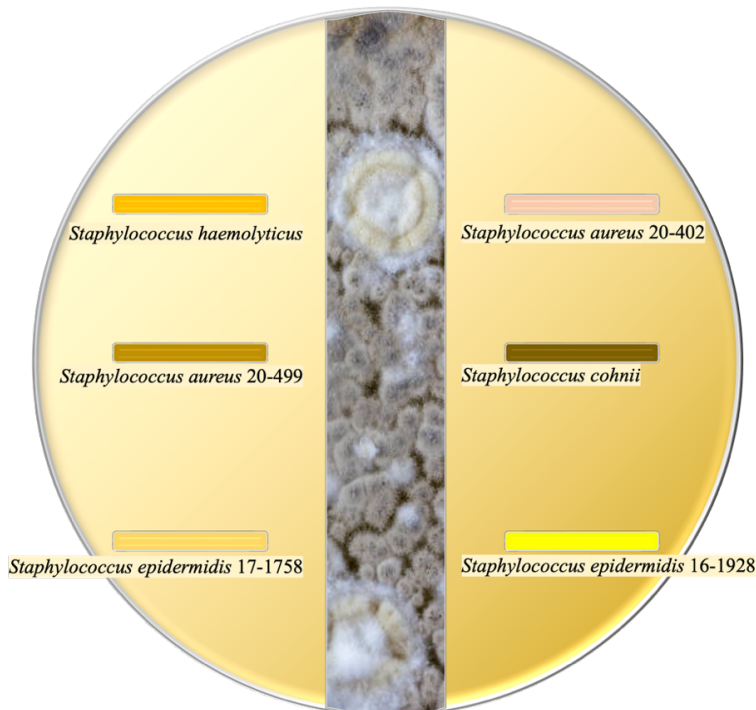


Figura 21. Acomodo de los microorganismos en el ensayo de estría perpendicular.

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento con enfoque mesófilo de bacterias de la Poza Azul

Se obtuvieron 124 aislados de la Poza Azul (PA) del Valle de Cuatro Ciénegas a partir del aislamiento realizado en octubre del 2020 (Figura 22). El medio de cultivo utilizado fue MM a pH 6.8. Se muestrearon diez puntos, y al sedimento obtenido de cada punto se dividió en dos partes, de manera que a una se le aplicara pretratamiento de calor (H), y la otra se inoculara de manera directa. El tratamiento por calor tiene como fin enriquecer para bacterias formadoras de esporas. Se recabó un promedio de doce aislados por punto, siendo el punto 4 el menor con nueve y el punto 9 el mayor con dieciocho, como se muestra en la Tabla 9. Los datos mostraron normalidad ($p=1$ prueba de homocedasticidad Levene, $p=0.5$ prueba de Shapiro-Wilk) y la existencia de una diferencia significativa entre los métodos ($t=4.9$, $p=0.0001$). Por lo tanto, es posible afirmar que la inoculación directa, como era esperado, recupera una mayor diversidad, con un promedio de ocho aislados por punto y un total de 79, mientras que el pretratamiento de calor tuvo promedio de cinco y total de 45.

Tabla 9. Número de aislados con morfologías distintas identificados en cada punto de muestreo realizado en la Poza Azul (octubre 2020).

Punto de muestreo	Directo	Calor	Aislados totales
PA1	8	3	11
PA2	7	3	10
PA3	7	3	10
PA4	5	4	9
PA5	10	6	16
PA6	7	4	11
PA7	8	5	13
PA8	8	6	14
PA9	11	7	18
PA10	8	4	12
Promedio	7.9 (6.7, 9.1)	4.5 (3.5, 5.5)	12.4 (9.5, 15.3)
Aislados totales	79	45	124

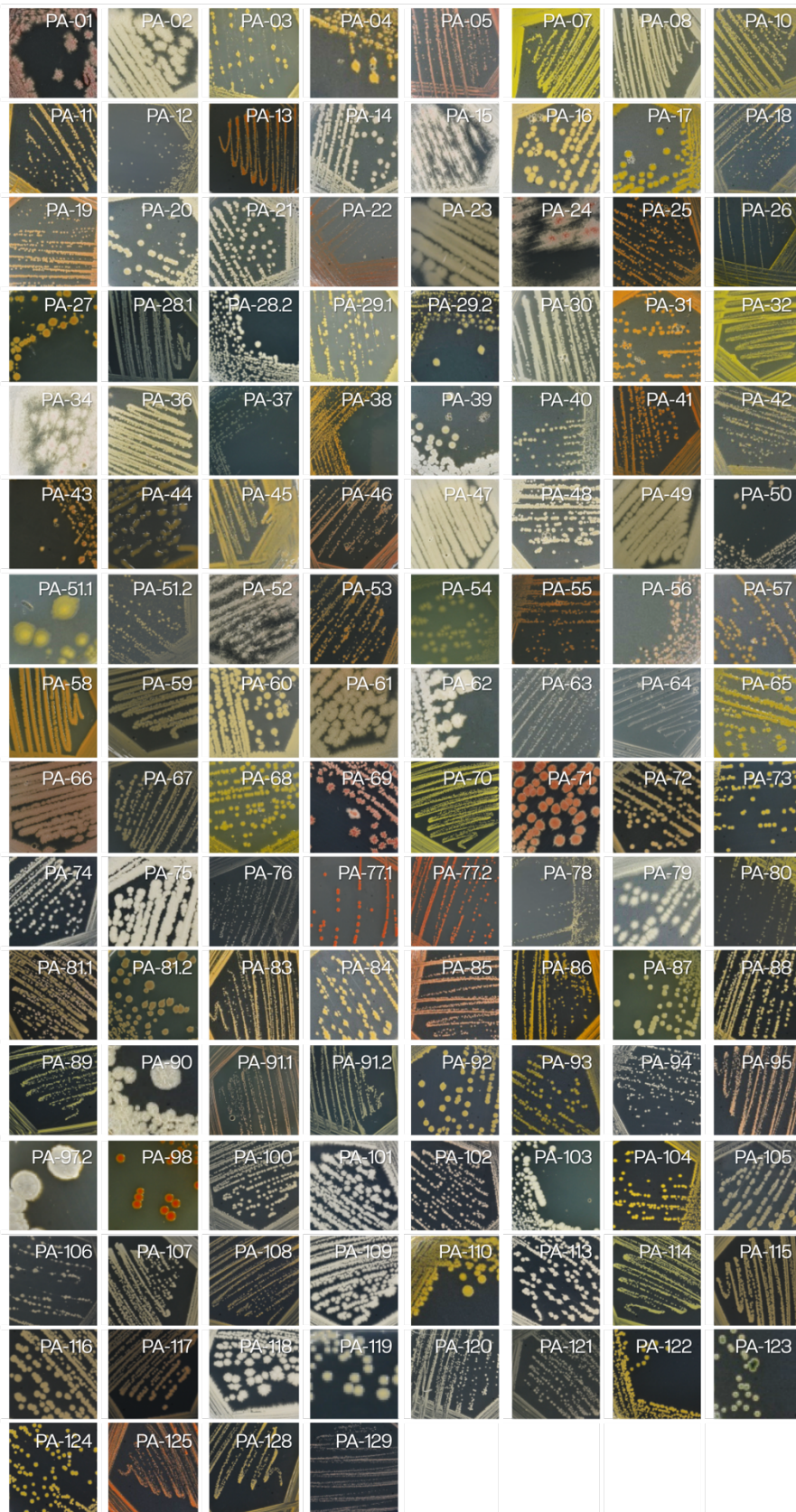


Figura 22. Fotografías de los 124 aislados axénicos originarios de la Poza Azul y sembrados en Medio Marino.

7.2 Evaluación de la diversidad morfológica de la Poza Azul

7.2.1 Morfología colonial de los aislados PA

Se evaluó la morfología colonial de las bacterias aisladas, en función de su forma, elevación, borde y color, con lo indicado por Kotwzan *et al.* (2011). El color se estableció de acuerdo al sistema de clasificación europeo de colores RAL Clásico 2017 (Anexo 12; Kelly, 1964).

Cada combinación única se definió como un fenotipo, obteniendo así un total de 93, plasmados en el Anexo 1. El fenotipo más observado fue de colonias circulares planoconvexas de borde redondeado y color marfil claro, con siete incidencias, seguido de las colonias circulares convexas de borde redondeado y color naranja pálido, y las colonias irregulares planas de borde redondeado y color beige, ambos con seis. En contraste, 75 fenotipos presentaron una sola incidencia.

Cabe destacar que algunos fenotipos fueron exclusivos de los aislados que pasaron por pretratamiento de calor, con un total de 31; 52 fenotipos solo se observaron en aislados sin pretratamiento; y 10 fueron independientes de esta variable (Anexo 2).

Se hizo también una relación entre qué aislados fueron obtenidos de cada uno de los diez puntos de muestreo, así como el fenotipo identificado para cada uno de ellos (Anexo 3).

7.2.2 Curva de rarefacción del punto de muestreo

Se tomaron las frecuencias de cada uno de los 93 fenotipos dentro de las diez muestras tomadas. A partir de estos datos se calculó la curva de rarefacción para el esfuerzo muestral, mientras que las asíntotas se construyeron con los límites de confianza del 95% (Figura 23). El comportamiento de la curva demuestra que diez muestras no son suficientes para acercarse a la diversidad potencial de la Poza Azul, ya que no alcanza la asíntota.

El índice de Chao2 refuerza que 93 fenotipos aún no son un número representativo de la diversidad bacteriana de PA. Tuvo un valor de 335.55 (210.38, 594.21), el cual refleja la cantidad de posibles fenotipos que pudieran encontrarse en la poza con el método de muestreo empleado.

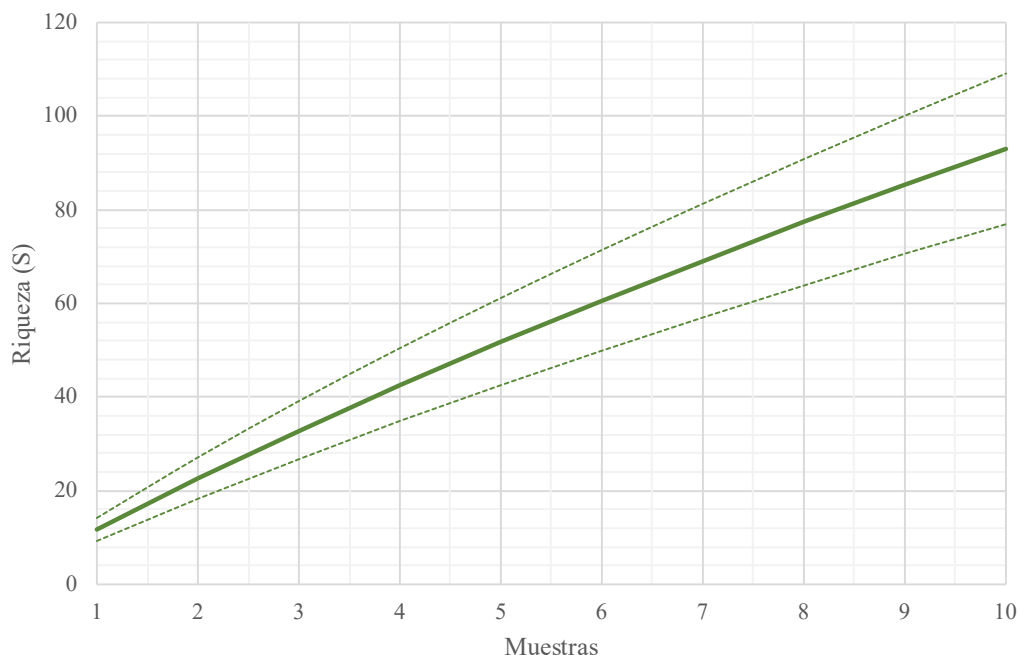


Figura 23. Curva de rarefacción (línea continua) con intervalos de confianza del 95% (líneas discontinuas) de la Poza Azul a partir de los datos obtenidos de las 10 muestras tomadas.

7.3 Evaluación de la diferencia en diversidad de secuencias del gen 16S obtenidas de la Poza Azul y los Domos del Arqueano

7.3.1 Identificación molecular de los aislados PA

Se logró extraer exitosamente el ADN genómico y obtener el gen 16S como producto en la PCR de los 124 aislados. No obstante, por cuestiones técnicas, solo fue posible secuenciar a 104. Las secuencias se encuentran disponibles en la base de datos del Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Microbiana de CINVESTAV Unidad Irapuato. Se analizaron con la herramienta BLAST de NCBI, y se identificó como el organismo más cercano a aquél que tuviera el porcentaje de identidad (%ID) más alto. La gran mayoría tuvo un %ID por encima de 95% (95 aislados), seis aislados lo tuvieron mayor a 90% pero menor a 95%, y tres más fueron mayores a 85% pero menores a 90% (Anexo 4).

El género con mayor presencia fue *Bacillus* con 34.62%, seguido de *Metabacillus* con 12.50% y *Paracoccus* con 9.62%. Los de menor incidencia fueron *Acinetobacter*, *Cytobacillus*, *Gordonia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neobacillus*, *Paracraurococcus*,

Peribacillus, *Priestia*, *Rhodococcus*, *Virgibacillus* y *Williamsia*, con 0.96% cada uno (Figura 24).

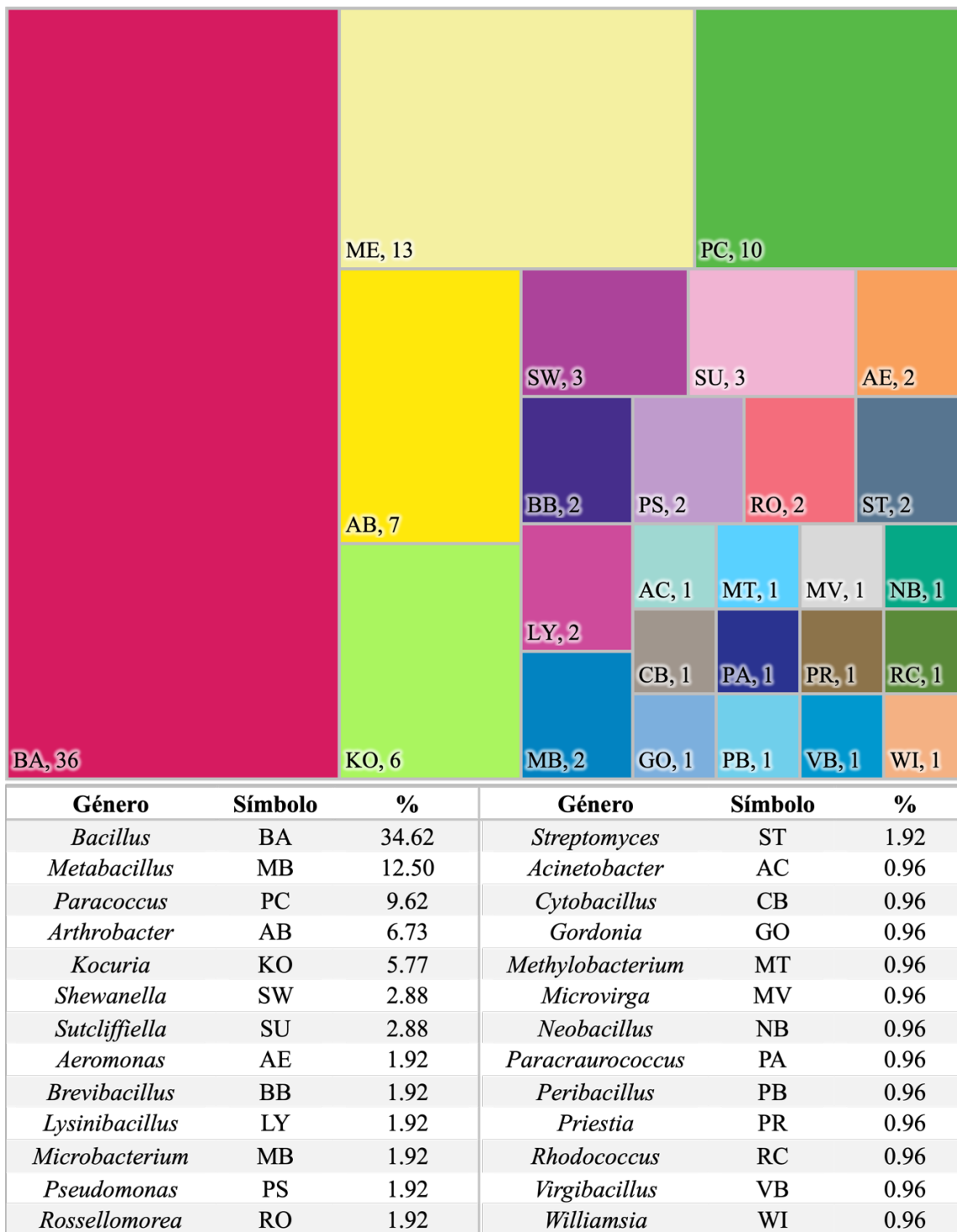


Figura 24. Géneros con los que las secuencias PA tuvieron coincidencia, por cantidad y porcentaje de aislados.

Se analizaron los datos de las secuencias de NCBI con las que hubo coincidencia, para así averiguar el tipo de muestra y país de origen del cual se obtuvieron. Aquellos que coincidieron con secuencias obtenidas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, fueron resaltados en el Anexo 4. Como se observa en la Figura 25, más de la mitad tuvieron su origen en tres países: China, India y México; pero hubo importante representación de todos los continentes. En cuanto al tipo de muestra, las más comunes fueron de suelo, microbiota vegetal y rizósfera, teniendo también representación los ambientes acuáticos.

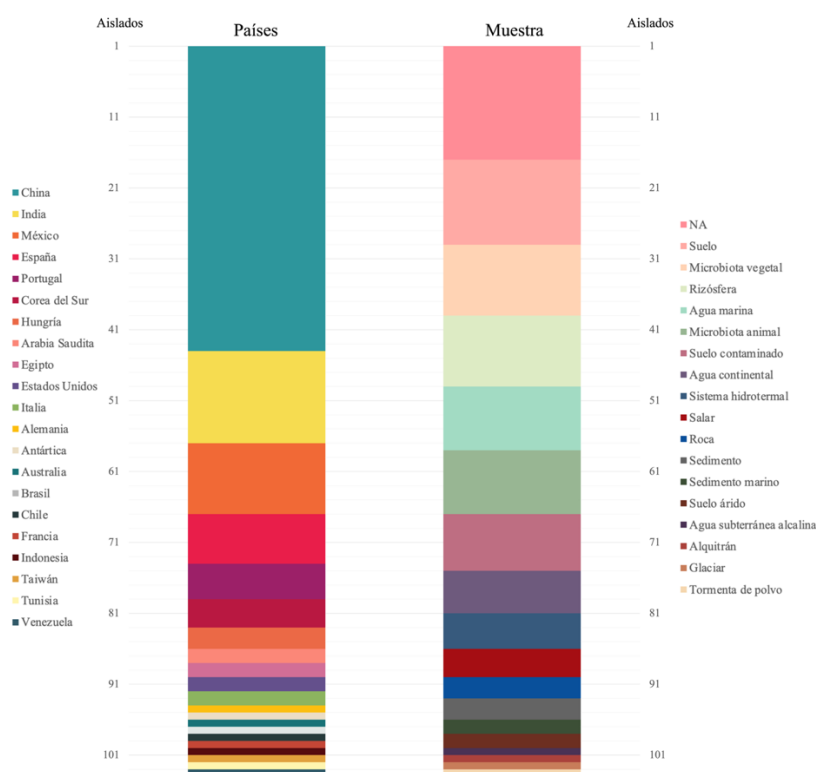


Figura 25. Países de origen y tipo de muestra de las que se obtuvieron las secuencias de NCBI con las que hubo coincidencia con los aislados PA.

Ya teniendo los datos de las coincidencias de las secuencias, se evaluó la efectividad del pretratamiento para el aislamiento de microorganismos relacionados al *phylum* Bacillota. Se recabó un promedio de seis secuencias por punto, siendo los puntos 4, 8 y 10 los menores con cuatro, y el punto 9 el mayor con diez, como se muestra en la Tabla 10. Los datos mostraron normalidad ($p=0.2$ prueba de homocedasticidad Levene, $p=0.8$ prueba de Shapiro-Wilk) y la existencia de una diferencia significativa entre los métodos ($t=4.1$, $p=0.0006$). Por

lo tanto, es posible afirmar que el pretratamiento de calor no fue significativo para encontrar más aislados relacionados con el *phylum* Bacillota, pues tuvo promedio de dos secuencias por punto y un total de 19, siendo que con inoculación directa el promedio fue de cuatro por punto, con un total de 43.

Tabla 10. Número de secuencias con coincidencia con algún miembro del *phylum* Bacillota, obtenidas a partir de los aislados de la Poza Azul (octubre 2020), identificadas en cada punto de muestreo.

Punto de muestreo	Directo	Calor	Secuencias totales
PA1	4	2	6
PA2	5	2	7
PA3	7	1	8
PA4	4	0	4
PA5	5	2	7
PA6	3	3	6
PA7	4	2	6
PA8	2	2	4
PA9	6	4	10
PA10	3	1	4
Promedio	4.3 (3.2, 5.4)	1.9 (1.1, 2.7)	6.2 (4.3, 8.1)
Secuencias totales	43	19	62

7.3.2 Análisis de las secuencias AD

De igual manera, las secuencias obtenidas de las bases de datos del Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Microbiana de CINVESTAV Unidad Irapuato, pertenecientes a microorganismos de los Domos del Arqueano, se analizaron con la herramienta BLAST de NCBI para identificar a los géneros con mayor similitud. Todas las secuencias tuvieron un% ID por encima de 95% (Anexo 5).

El género con mayor presencia fue *Bacillus* con 44.24%, seguido de *Virgibacillus* con 10.30% y *Alkalihalobacillus* con 6.06%. Los de menor incidencia fueron *Agrococcus*, *Aquibacillus*, *Aurantimonas*, *Brevibacillus*, *Citricoccus*, *Cytobacillus*, *Jeotgalicoccus*,

Litchfieldia, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*, *Rhizobium*, *Roseibium*, *Salirhabdus*, *Desulfonatronovibrio* y *Terribacillus*, con 0.61% cada uno (Figura 26).

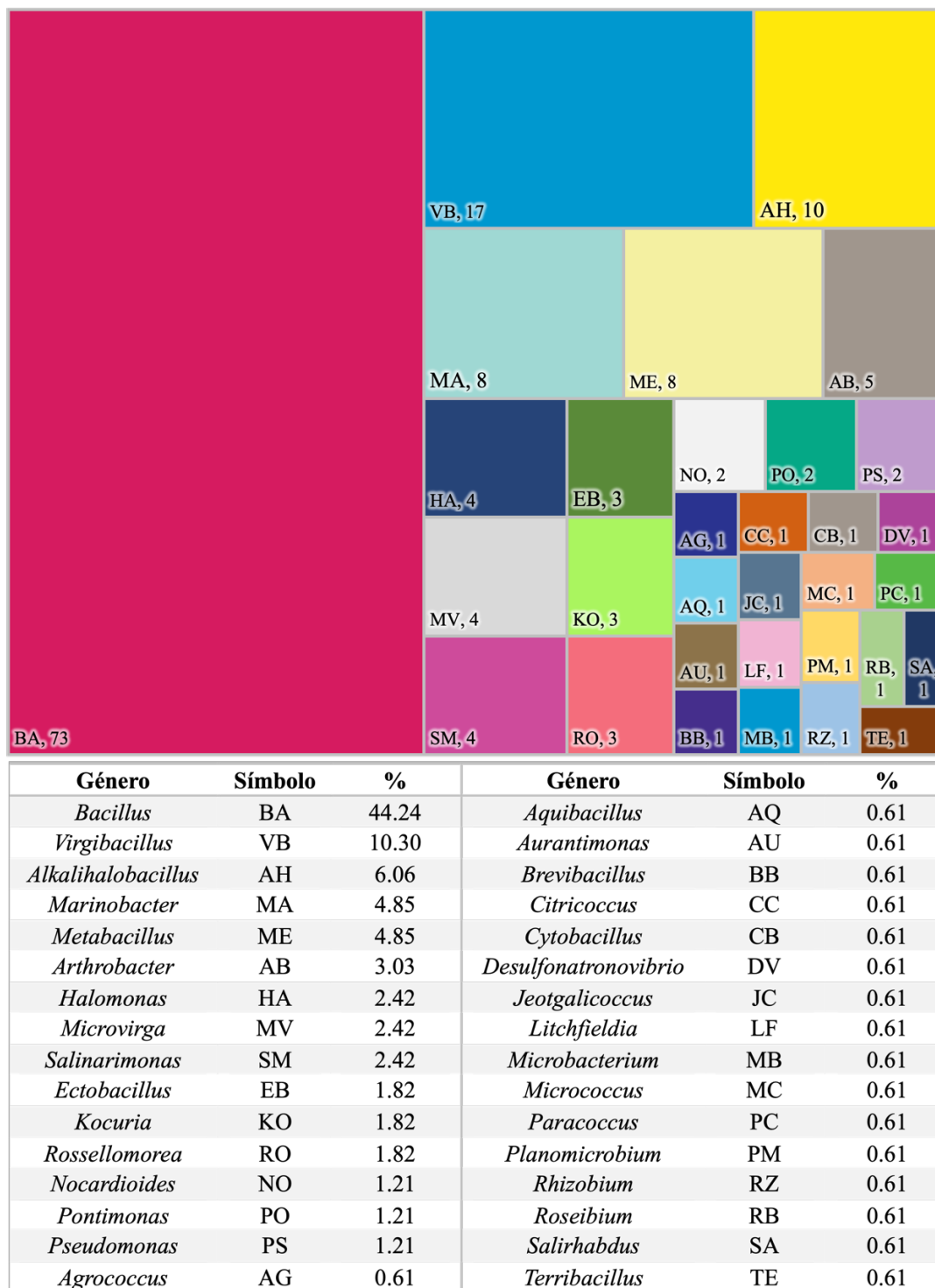


Figura 26. Géneros con los que las secuencias AD tuvieron coincidencia, por cantidad y porcentaje de aislados.

A su vez, se analizaron los datos de las secuencias de NCBI con las que coincidieron, para también en estas secuencias averiguar el tipo de muestra y país de origen. Aquellos que coincidieron con secuencias obtenidas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, fueron resaltados en el Anexo 5. Como se observa en la Figura 27, más de la mitad tuvieron su origen en China, Estados Unidos y México, sin perder de vista que se encontraron de países de todos los continentes. En cuanto al tipo de muestra, las más comunes fueron de suelo, salares y microbiota vegetal, teniendo también representación los ambientes acuáticos y ambientes alcalinos y salinos.

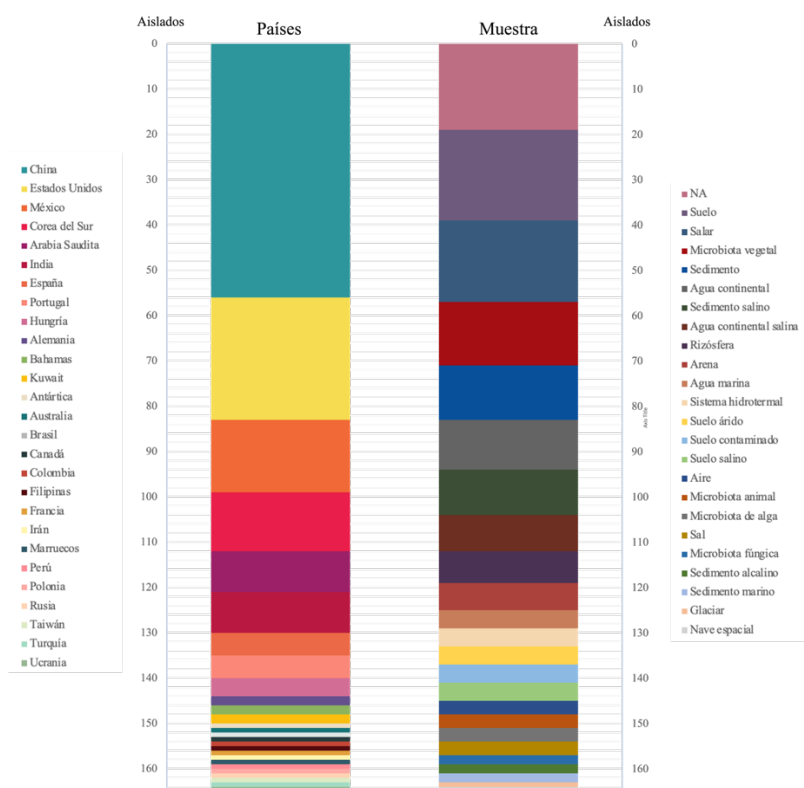


Figura 27. Países de origen y tipo de muestra de las que se obtuvieron las secuencias de NCBI con las que hubo coincidencia con las secuencias AD.

7.3.3 Diversidad taxonómica encontrada y en PA y AD

Tomando en cuenta las coincidencias con NCBI, se encontró la clasificación taxonómica a la que posiblemente pertenezcan las secuencias de PA y AD (Figura 28).

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	PA	AD
Actinomycetota	Actinomycetes	Kitasatosporales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	2	0
			Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus</i>	0
		<i>Microbacterium</i>			2	1
		<i>Pontimonas</i>			0	2
		Micrococcaceae		<i>Arthrobacter</i>	7	5
				<i>Citricoccus</i>	0	1
			<i>Kocuria</i>	6	3	
			<i>Micrococcus</i>	0	1	
		Mycobacteriales	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>	1	0
			Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1	0
				<i>Williamsia</i>	1	0
			Propionibacteriales	Nocardioidaceae	<i>Nocardioides</i>	0
		Bacillota	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Alkalihalobacillus</i>
<i>Aquibacillus</i>	0					1
<i>Bacillus</i>	36					73
<i>Cytobacillus</i>	1					1
<i>Ectobacillus</i>	0					3
<i>Litchfieldia</i>	0					1
<i>Lysinibacillus</i>	2					0
<i>Metabacillus</i>	13					8
<i>Neobacillus</i>	1					0
<i>Peribacillus</i>	1					0
<i>Priestia</i>	1					0
<i>Rossellomorea</i>	2					3
<i>Salirhabdus</i>	0					1
<i>Sutcliffeiella</i>	3					0
<i>Terribacillus</i>	0					1
<i>Virgibacillus</i>	1					17
Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>					2
Planococcaceae	<i>Planomicrobium</i>	0	1			
Staphylococcaceae	<i>Jeotgalicoccus</i>	0	1			
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	Hyphomicrobiales	Aurantimonadaceae	<i>Aurantimonas</i>	0	1
			Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	0	1
			Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	1	0
				<i>Microvirga</i>	1	4
			Salinarimonadaceae	<i>Salinarimonas</i>	0	4
			Stappiaceae	<i>Roseibium</i>	0	1
	Rhodobacterales	Paracoccaceae	<i>Paracoccus</i>	10	1	
	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Paracraurococcus</i>	1	0	
	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	2	0
		Alteromonadales	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	3	0
Moraxellales		Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	1	0	
Oceanospirillales		Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	0	4	
Pseudomonadales	Marinobacteraceae	<i>Marinobacter</i>	0	8		
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	2	2		
Thermodesulfobacteriota	Desulfovibrionia	Desulfovibrionales	Desulfonatronovibrionaceae	<i>Desulfonatronovibrio</i>	0	1
Total					104	165

Figura 28. Géneros a los que pertenecen las secuencias de NCBI con las que aquellas de PA y AD tuvieron coincidencia por medio de BLASTn. Se observa el número de secuencias que hubo por poza, además del phylum, clase, orden y familia de cada taxón.

Se detectaron entonces 4 *phyla*, 5 clases, 14 órdenes, 24 familias y 58 géneros bacterianos. Las secuencias de PA coincidieron con 3 *phyla*, 4 clases, 10 órdenes, 14 familias y 26 géneros, mientras que las de AD con 4 *phyla*, 5 clases, 8 órdenes, 17 familias y 32 géneros. La Figura 29 muestra la proporción con que se distribuyeron las secuencias en clases. Para

las de PA, 60.6% correspondieron a la clase Bacilli, 19.2% a Actinomycetes, 12.5% a Alphaproteobacteria y 7.7% a Gammaproteobacteria. En cuanto a las de AD, 73.9% eran de la clase Bacilli, 9.7% a Actinomycetes, 7.3% a Alphaproteobacteria, 8.5% a Gammaproteobacteria y 0.6% a Desulfonatronovibrionaceae.

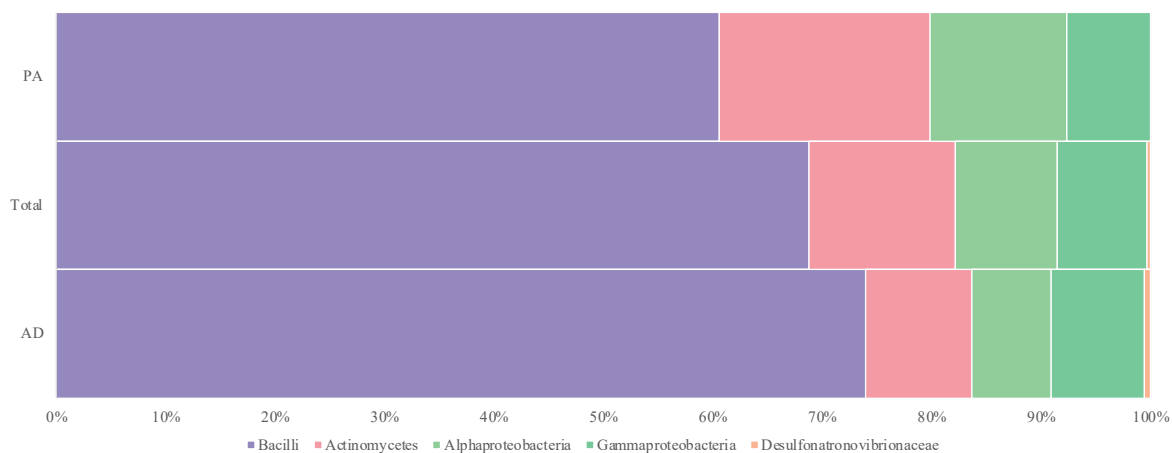


Figura 29. Proporción con que se distribuyeron las secuencias de PA y AD en las 5 clases bacterianas encontradas.

En un análisis más detenido que se ilustra en la Figura 30, se reparó en que ambas pozas compartían 12 de los 58 géneros encontrados: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cytobacillus*, *Kocuria*, *Metabacillus*, *Microbacterium*, *Microvirga*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rosellomorea* y *Virgibacillus*. Los restantes se consideraron exclusivos de la poza correspondiente, con las condiciones de aislamiento determinadas. Así, 14 géneros se ubicaron únicamente en PA y 20 solo fueron hallados en AD.



Figura 30. Diagrama que muestra los géneros con los que tuvieron coincidencia las secuencias de PA y AD. El círculo izquierdo representa a los exclusivos de PA, el círculo derecho a los de AD, y la zona en que concordan a los que se comparten en ambas pozas.

7.3.4 Cálculo de la diversidad de secuencias

Para analizar la diversidad de secuencias de ambas pozas, se consideró cada secuencia como una OTU. La Tabla 11 muestra los índices de diversidad obtenidos por el programa Past4.

Tabla 11. Índices de diversidad de las OTUs correspondientes a las pozas Poza Azul (PA) y Domos de Arqueano (AD), Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Índice	PA	AD
OTUs	104	165
Riqueza (S)	26 (24, 28)	32 (32, 32)
Equitabilidad (J')	0.8 (0.73, 0.86)	0.7 (0.64, 0.76)
Simpson (D)	0.15 (0.09, 0.2)	0.21 (0.16, 0.27)
Simpson (1-D)	0.85 (0.8, 0.91)	0.79 (0.73, 0.84)
Shannon-Wiener (H')	2.59 (2.35, 2.84)	2.43 (2.23, 2.63)

No se encontró evidencia de una diferencia significativa en la diversidad de OTUs entre las pozas AD y PA, basado en H' ($p=0.462$) y en D ($t=-1.465$, $p=0.144$). La equitabilidad fue medianamente alta y similar para ambas pozas (Tabla 11).

Basados en la comparación de los números de Hill y sus intervalos de confianza del 95%, la riqueza (N_0) en AD fue significativamente mayor que en PA. No obstante, el número efectivo de especies comunes y el número efectivo de especies abundantes no presentaron diferencia aparente entre ambas pozas (Fig. 31).

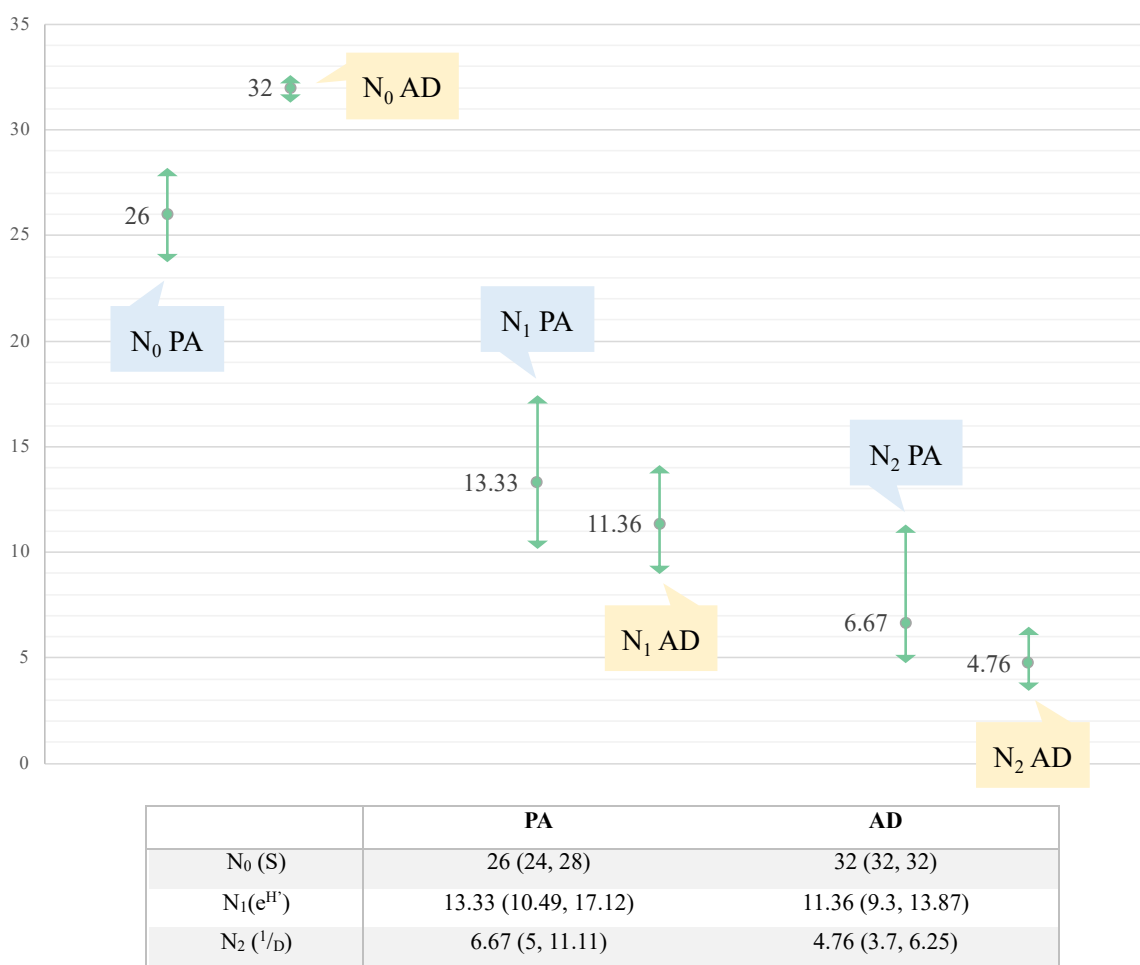


Figura 31. Números efectivos de especies (OTUs) para Poza Azul (PA) y Doms de Arqueano (AD) obtenidos a partir de los índices de diversidad. El N_0 (S) presenta la riqueza observada, el N_1 ($e^{H'}$) a la diversidad en función de las especies comunes, y el N_2 ($1/D$) en función de las abundantes..

7.3.5 Análisis filogenético

Se realizó un alineamiento con las secuencias PA y AD, para después construir un árbol Neighbor-Joining (Figura 32, Anexo 13), con el que se pudo observar qué tanto se encuentran relacionadas. Para la relación filogenética de las secuencias PA y AD, se realizó un segundo alineamiento integrando secuencias tipo obtenidas de NCBI, con lo cual se construyó un árbol de Maximum-Likelihood (Figura 33, Anexo 14). Con este árbol también se pudieron definir los grupos taxonómicos del árbol Neighbor-Joining.

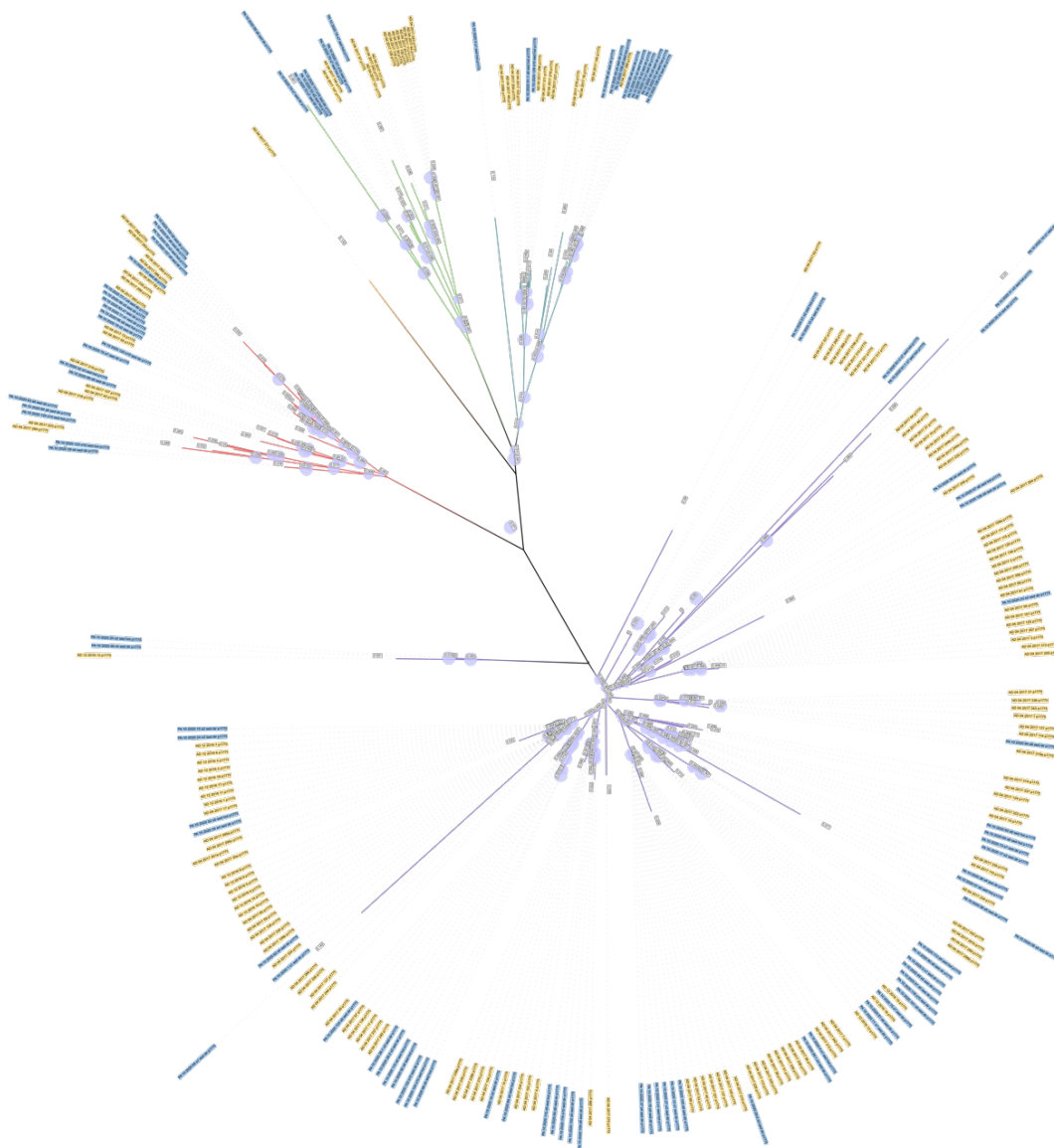


Figura 32. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias del gen 16S obtenidas de PA y AD. En color azul se encuentran las secuencias de PA, y en color amarillo las de AD.

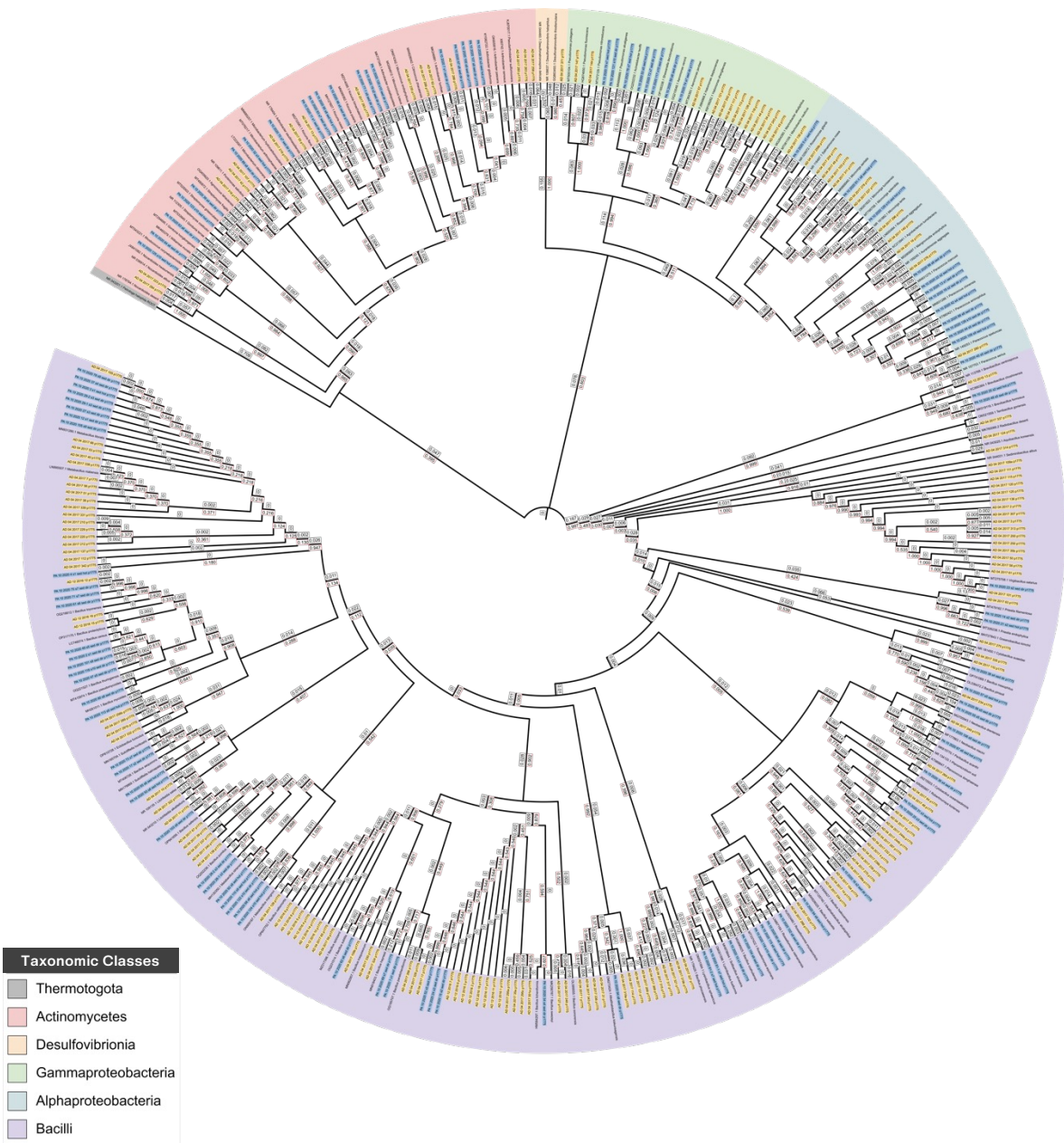


Figura 33. Árbol Maximum-Likelihood de las secuencias del gen 16S obtenidas de PA (azul) y AD (amarillo), junto con secuencias de referencia descargadas de NCBI.

7.4 Aislamiento selectivo con enfoque extremófilo de actinomicetos

Se obtuvieron 29 aislados de actinobacterias a partir de los tres muestreos realizados en el Valle de Cuatro Ciénegas en septiembre del 2021 (1), marzo del 2022 (2) y septiembre del 2022 (3). De los muestreos 1 y 2 se aisló un número similar de actinomicetos (catorce y

quince, respectivamente), mientras que en el muestreo 3 no se obtuvo ninguno (Tabla 12). De estos 29 especímenes, doce se aislaron de Los Domos del Arqueano, seis de Churince, cuatro de Pozas Rojas, cuatro de Poza Verde y tres de Poza La Becerra; El Hundido y Arqueanito no dieron resultados positivos (Tabla 13).

Tabla 12. Aislados obtenidos en función de los muestreos realizados.

Fecha de muestreo	Muestras procesadas	Pozas muestreadas	No. de aislados
Septiembre 2021	12	AD, PR	14
Marzo 2022	12	AD, PR, PV, PB, CH	15
Septiembre 2022	20	AD, PR, AQ, HU	0

Los Domos del Arqueano (AD), Las Pozas Rojas (PR), La Poza Verde (PV), El Churince (CH), Poza La Becerra (PB), El Hundido (HU), El Arqueanito (AQ).

Tabla 13. Aislados obtenidos en función de las pozas muestreadas.

Poza muestreada	No. de muestras procesadas	Fecha de muestreo			No. de aislados
		M1	M2	M3	
AD	16	✓	✓	✓	12
PR	16	✓	✓	✓	4
AQ	6			✓	0
HU	2			✓	0
CH	2		✓		6
PB	1		✓		3
PV	1		✓		4

Los Domos del Arqueano (AD), Las Pozas Rojas (PR), La Poza Verde (PV), El Churince (CH), Poza La Becerra (PB), Los Hundidos (HU), El Arqueanito (AQ). ✓=muestreada, M1=septiembre 2021, M2=marzo 2022, M3=septiembre 2022.

Fueron cuatro los pretratamientos empleados durante el aislamiento: nistatina (N), fenol (F), polimixina B (P) y radiación UV (U). Se armaron tres combinaciones de éstos: N+P, N+F y

N+F+U; además, algunas muestras no se trataron. De esta manera, nueve aislados resultaron de la combinación N+F, seis de N+F+U, cuatro de N+P, y diez sin pretratamiento.

Se utilizaron 10 medios de cultivo distintos: Halófilos y alcalinos 1 (HAK1), Harina de soya y manitol (SFM), International *Streptomyces* Project 2 (ISP2), ISP2 adicionado con 15% de cloruro de sodio (ISP2+15) International *Streptomyces* Project 5 (ISP5), ISP5 adicionado con 10% de NaCl (ISP5+10), Ácidos húmicos y vitaminas (HV), Medio de quitina (MQ), MQ adicionado con 10% de NaCl (MQ+10) y Agar 2A de Reasoner (R2A); sin embargo, únicamente tres de ellos alojaron actinomicetos. El más efectivo fue HV con quince aislados, seguido de ISP5 con diez, y finalmente MQ con cuatro. Los medios de aislamiento variaban en su valor de pH, encontrándose en cuatro diferentes: 7.0, 9.0, 10.0 y 11.0. Los valores de pH utilizados en cada medio se detallaron anteriormente en la Tabla 8. Solamente se obtuvo un aislado de actinomiceto en pH 9.0, y catorce tanto en pH 10.0 como en 11.0. Estas distinciones se resumen de manera gráfica en la Figura 34.

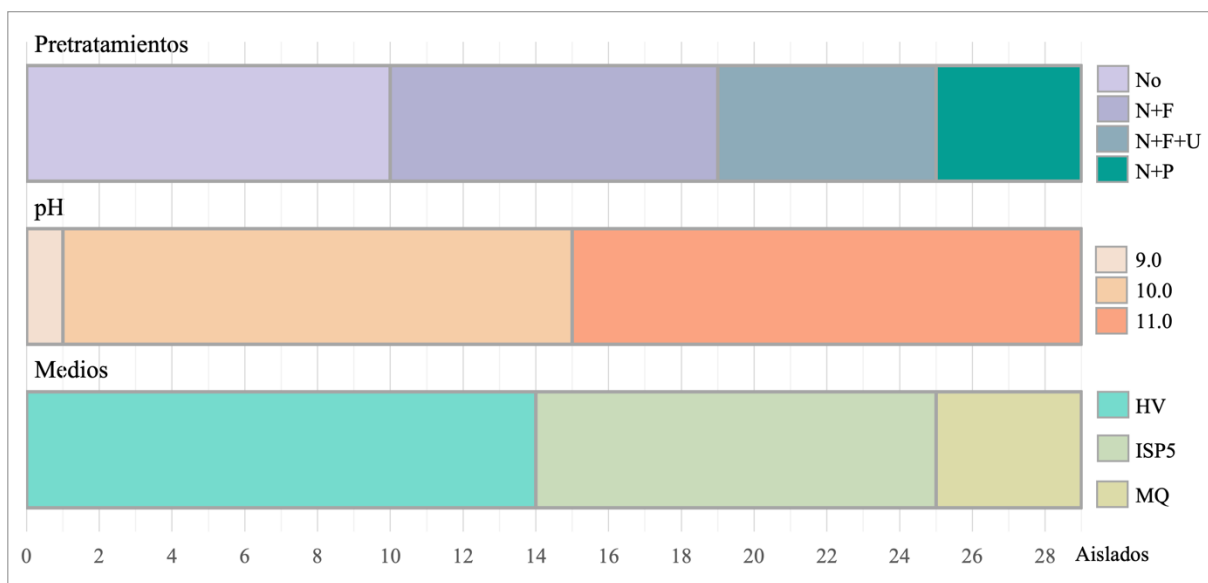


Figura 34. Aislados obtenidos en función de los medios de cultivo, los valores de pH de los mismos, y los pretratamientos empleados.

En la Figura 35 y el Anexo 6 se observa un resumen de los aislados exitosos, en proporción a la poza de origen, su medio de aislamiento y el pretratamiento al que se sometieron. De modo que en septiembre del 2021 solo se obtuvieron actinomicetos del medio HV pH 10 e ISP5 pH 9; los dos extraídos de Pozas Rojas pasaron por el pretratamiento N+P, al igual que

dos más de Domos del Arqueano, que, en su mayoría (diez aislados), no requirieron ser pretratados. En marzo del 2022 hubo mayor variabilidad: con el medio ISP5 pH 11 se aislaron tres actinomicetos de Poza La Becerra y dos de Pozas Rojas, con la combinación de pretratamientos N+F, y cinco más del Churince, pero con la combinación N+F+U; de esta misma poza se obtuvo una cepa, solo que en medio HV pH 11, y con la combinación N+F+U. Los cuatro aislados restantes fueron a partir de medio MQ pH 11 y la combinación N+F, provenientes de la Poza Verde.



Figura 35. Resumen gráfico de los aislamientos realizados en el Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila. Los Domos del Arqueano (AD), Las Pozas Rojas (PR), La Poza Verde (PV), El Churince (CH), Poza La Becerra (PB), nistatina + polimixina B (N+P), nistatina + fenol (N+F), nistatina +fenol+UV (N+F+U), International *Streptomyces* Project 5 (ISP5), medio de ácidos húmicos y vitaminas (HV), medio de quitina (MQ).

Adicionalmente, para expandir el análisis de la investigación, se incluyeron dos aislados obtenidos de la Poza Azul en el muestreo del 2020, dando un total de 31 (Anexo 8). En la Figura 36 se muestra la morfología colonial de los aislados.

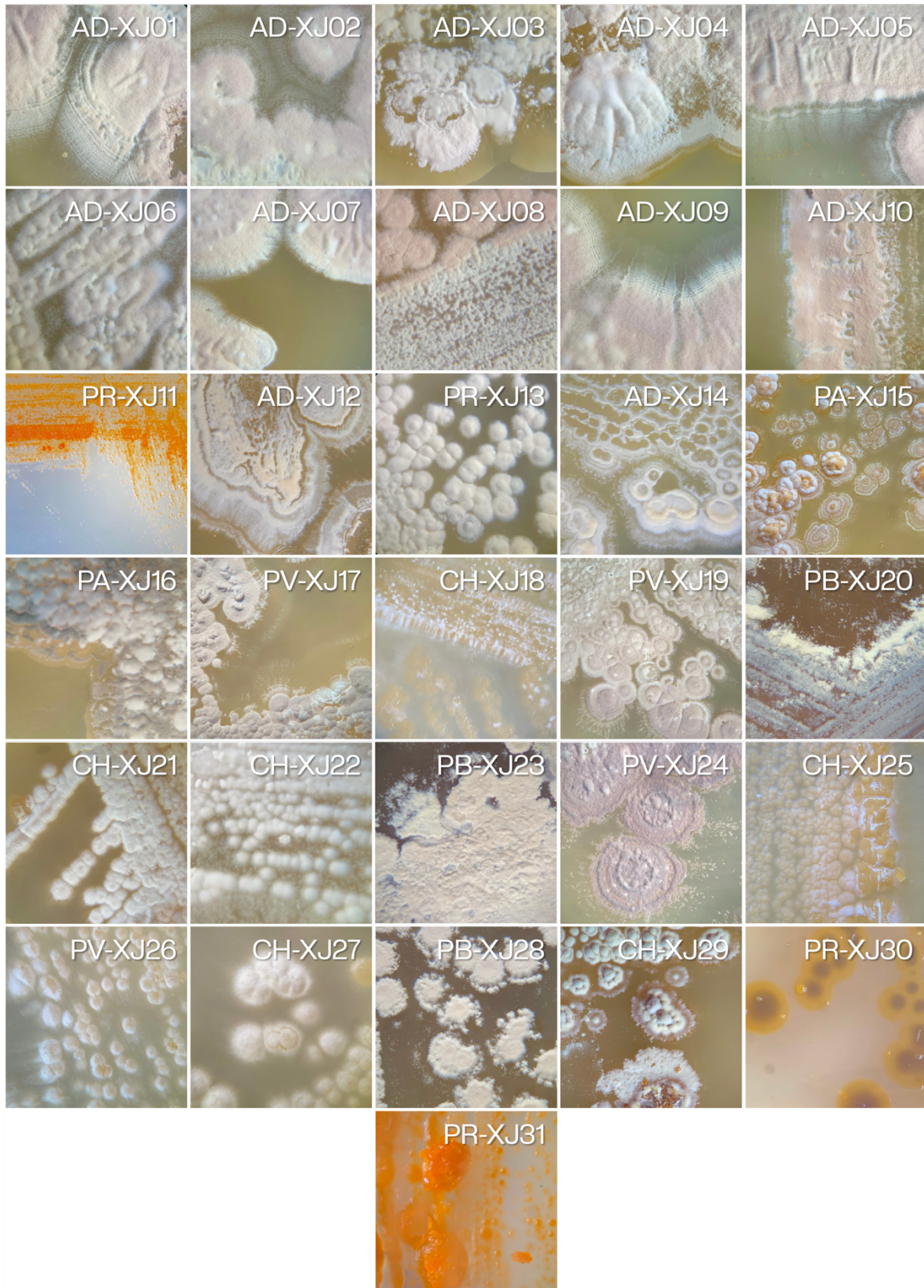


Figura 36. Actinomicetos aislados del Valle de Cuatro Ciéneas, Coahuila, con enfoque de extremotolerancia.

7.5 Evaluación de la diversidad de actinomicetos obtenidos a partir de medios específicos

7.5.1 Fenotipos de los actinomicetos aislados

Se evaluó la morfología colonial de los actinomicetos aislados, en función de su forma, elevación y borde, de acuerdo a lo establecido por Kołwzan *et al.* (2011). El color se describió de acuerdo al RAL Clásico 2017 (Anexo 12; Kelly, 1964). Cada combinación única se definió como un fenotipo, llegando a un total de 23, como se ve en la Anexo 7.

7.5.2 Cálculo de la diversidad de actinomicetos

Los fenotipos fueron organizados con base en el pH y medio con el que habían sido aislados, para comparar la efectividad de los medios a los valores de pH utilizados durante los muestreos (Figura 37). Los fenotipos 10 y 11 no se consideraron en el análisis por corresponder a microorganismos obtenidos del aislamiento de mesófilos.



Figura 37. Distribución de los fenotipos observados con base en el pH y medio de aislamiento.

Se realizó una tabla de contingencia con estos datos, expresados en la Figura 38, obteniendo una asociación significativa entre el tipo de medio y su valor de pH (χ^2 de 18.965 y un valor de p de 0.0008). Con esto fue notorio que los medios más efectivos fueron HV pH 10 e ISP5 pH 11, a partir de los cuales se aislaron más fenotipos, mientras que en HV pH 9, ISP5 pH 10 y MQ pHs 9 y 10 no hubieron aislados. Es importante recalcar que los medios ISP5 y MQ pH 10 se prepararon con 10% de sal, lo cual es un factor que puede haber influido en la ausencia de aislados.

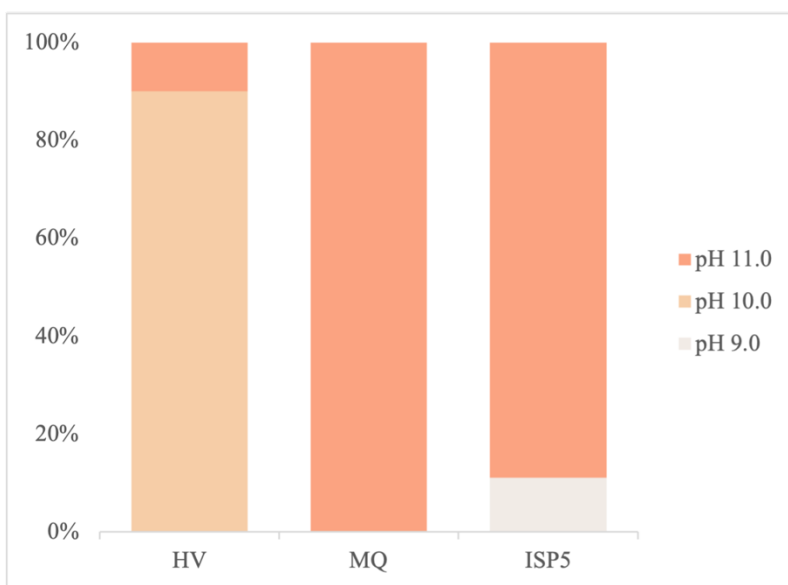


Figura 38. Porcentaje de aislados obtenidos en función del medio de cultivo utilizado y su valor de pH. HV=medio ácidos húmicos y vitaminas, MQ=medio quitina, ISP5=Medio No.5 del Proyecto Internacional *Streptomyces*.

7.6 Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados

Todos los aislados fueron gram-positivos y con estructura celular de filamentos delgados, largos y ramificados, exceptuando a PR-XJ30, que presentaba bacilos gruesos, algunos organizados en estreptobacilos (Figuras 39-42, izquierda).

Los 31 aislados fueron capaces de crecer en medio ISP2, como se observa en la parte derecha de las Figuras 39-42.

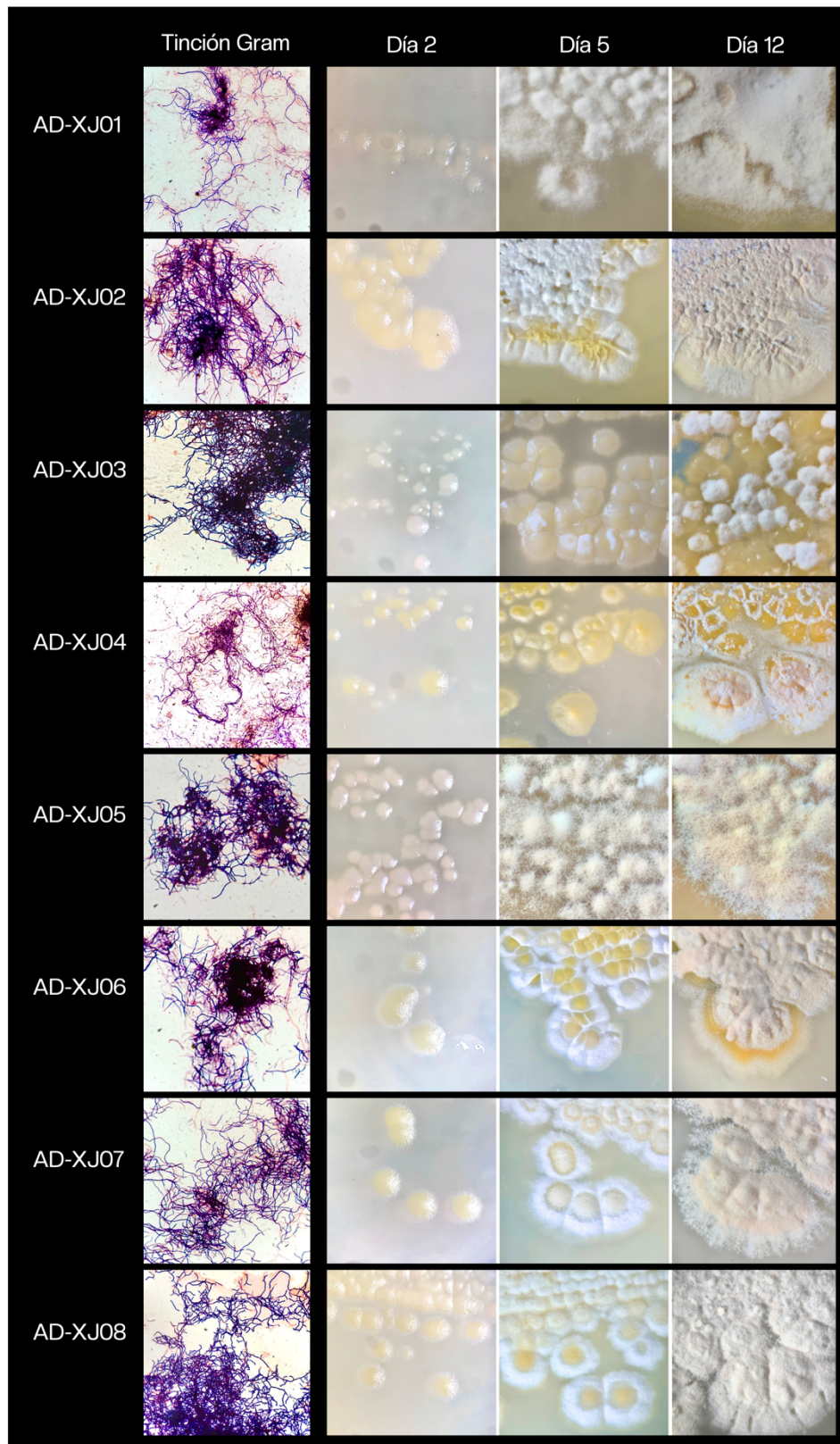


Figura 39. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 1 al 8.

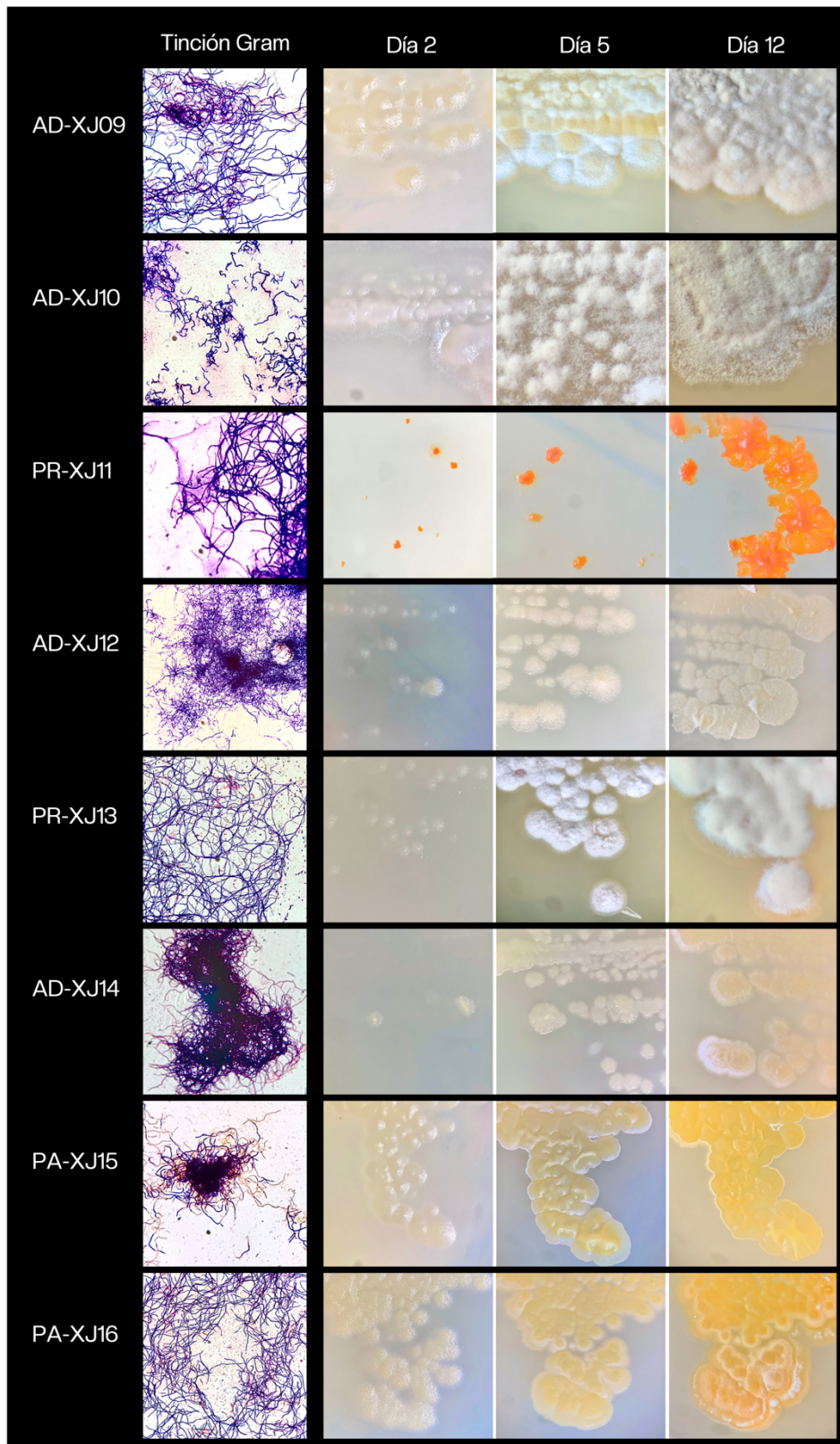


Figura 40. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 9 al 16.

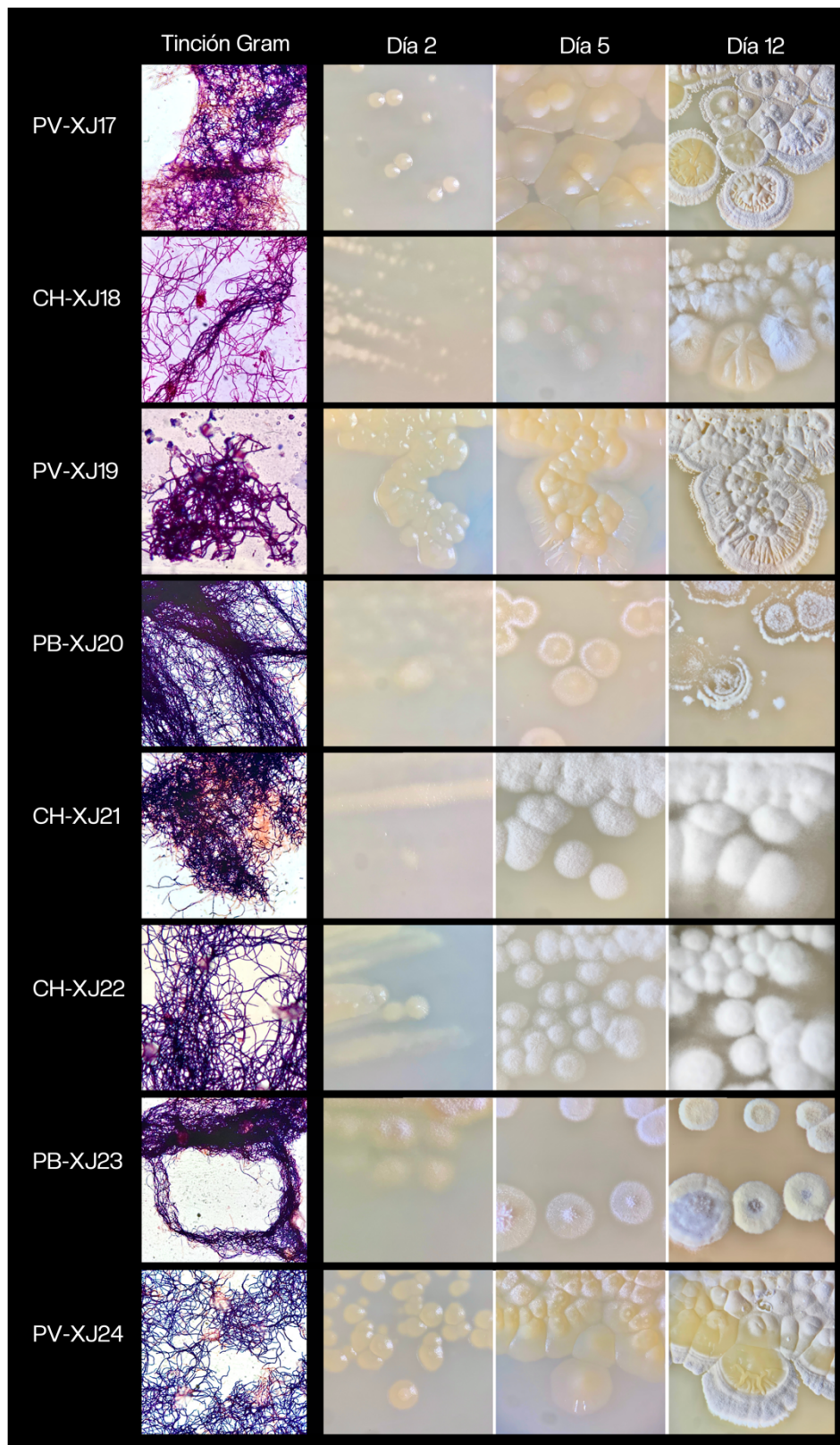


Figura 41. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 17 al 24.

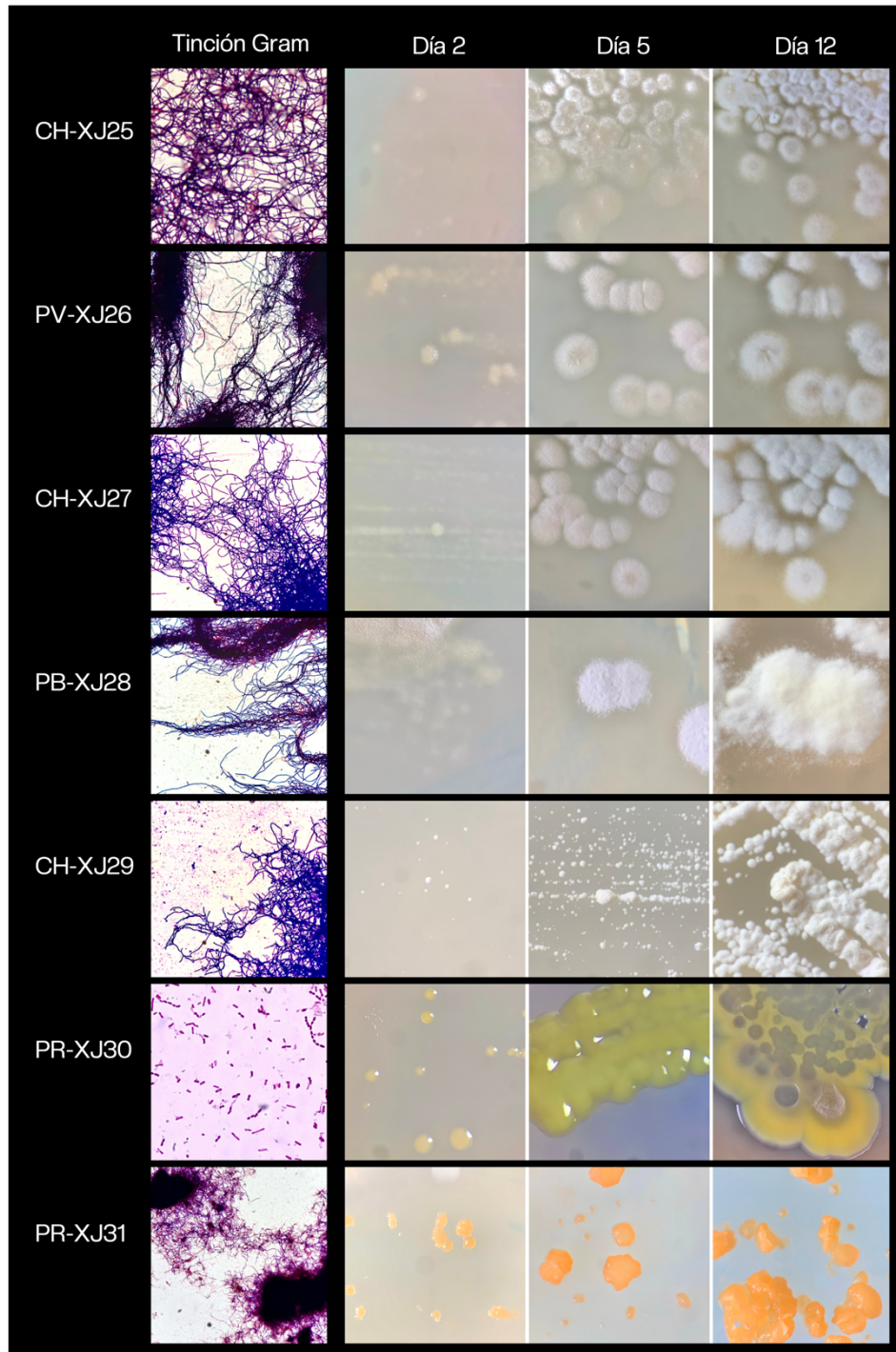


Figura 42. Tinción Gram (1000 x) y morfología colonial en medio ISP2 a los dos, cinco y doce días de incubación a 27° C, de los aislados 25 al 31.

La mayor parte de los aislados crecieron de manera similar:

- a) El micelio vegetativo era duro al tacto con el asa bacteriológica.
- b) Las primeras colonias aparecían después de las 48 h, compuestas de micelio vegetativo con aspecto brillante y de tonos marfiles o grisáceos.
- c) Una vez que el crecimiento maduraba, el brillo se volvía mate y el micelio vegetativo pasaba a tonos amarillentos, pardos o grisáceos. Las colonias eran de un tamaño mediano y, teniendo el suficiente espacio, se podían expandir bastante.
- d) El micelio aéreo, con aspecto lanudo y blancuzco, aparecía desde los primeros tres días, y con el tiempo cubría por completo al crecimiento vegetativo, pasando a tonos grisáceos.
- e) Ausencia de pigmentos solubles.

Hubo algunas excepciones importantes de mencionar:

- ◇ CH-XJ29 se distinguía por colonias puntiformes que se cubrían rápidamente por micelio aéreo.
- ◇ El micelio vegetativo de PR-XJ13 tomaba un color rosado después de los siete días de crecimiento.
- ◇ AD-XJ03 y AD-XJ04 esporulaban a manera de mosaico, es decir, algunas colonias se cubrían por completo y algunas solo parcialmente, o no esporulaban.
- ◇ AD-XJ12 y AD-XJ14 mantenían un micelio vegetativo corrugado de aspecto brillante por casi catorce días, con esporulación muy escasa. Necesitaba por lo menos 30 días para observarse una esporulación más significativa.
- ◇ Después de 20 días de incubación, PA-XJ15 formaba colonias pardas que crecían de manera concéntrica, como parte de un sistema montañoso.
- ◇ Tras 14 días de incubación, las colonias de PA-XJ16 se tornaban en una morfología con una textura similar a fideos enredados. Además, después de este tiempo, algunas de sus esporas se tornaban gris oscuro, mientras que otras se mantenían blancas, dándole una apariencia de mosaico.
- ◇ PR-XJ11 y PRXJ-31 jamás formaron micelio aéreo visible, y su micelio vegetativo era de tonos anaranjados. Su crecimiento era considerablemente más lento que el de

los demás aislados, sin abarcar nunca una superficie amplia; no obstante, algunas colonias llegaban a formar un crecimiento vertical con forma irregular. Después de 30 días de incubación, el micelio vegetativo de la parte más alta de PR-XJ11 tomaba un tono más rojizo. En cambio, el de PR-XJ31 se aclaraba a un color más amarillo, o incluso podía oscurecerse a uno más pardo.

- ◇ PR-XJ30 fue el único aislado con textura cremosa, que llegaba a ser de color verde, formando círculos más oscuros en la parte central, y gruesos bordes más claros. Crecía extensamente desde las primeras 24 horas, y producía pigmento oscuro que era soluble en el medio.

La descripción morfológica completa de los días 2, 5 y 12 se encuentra en el Anexo 9.

7.7 Evaluación de los rangos de extremofilia de los actinomicetos aislados

7.7.1 Rangos de crecimiento en la escala de pH

Se evaluó la capacidad de los actinomicetos de crecer a diferentes valores de pH. La mayor parte de ellos prefirió pHs mesófilos y alcalinos, pero también fueron capaces de crecer a niveles más ácidos, por debajo de 6.0. El rango más amplio lo tuvo CH-XJ18, creciendo desde pH 3.0 hasta pH 12.0, mientras que el más corto fue para PB-XJ23, de pH 8.0 a pH 12.0.

Los aislados PV-XJ19, PB-XJ28 y PR-XJ31 presentaron dificultades en la ejecución de la prueba.

En la Figura 43 se encuentran los valores de densidad óptica obtenidos por espectrofotometría después de la corrección del blanco. En el Anexo 10 se encuentran los datos numéricos.

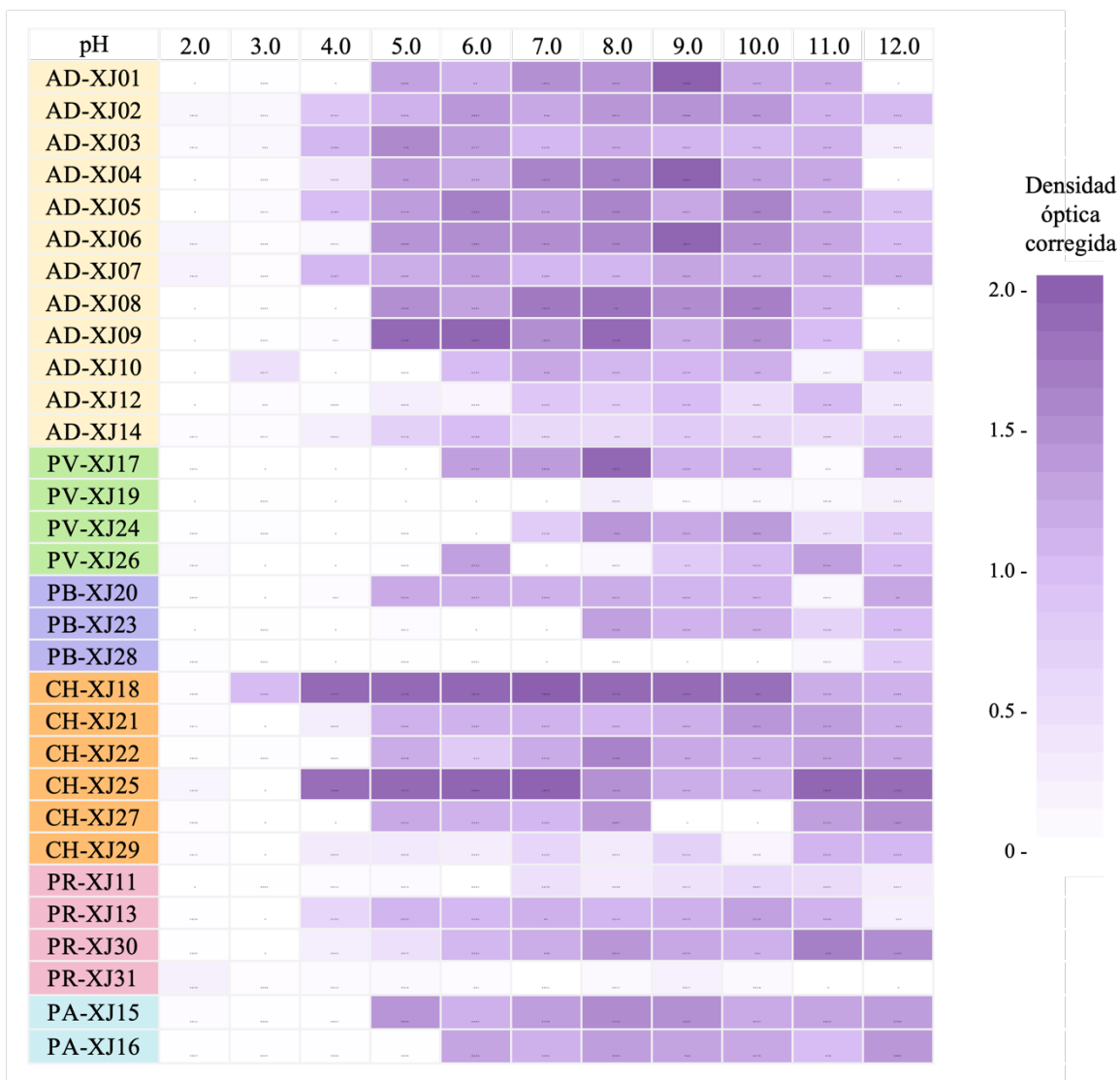


Figura 43. Densidad óptica corregida del medio después de diez días de haber sido inoculado con los aislados de actinomicetos, a una longitud de onda de 600 nm.

7.7.2 Rangos de crecimiento en gradiente de concentración de cloruro de sodio

Se evaluó la capacidad de los actinomicetos de crecer a diferentes concentraciones de NaCl. La totalidad de ellos proliferó en ausencia de sal y a una concentración de 5%. No obstante, el crecimiento en ausencia de sal era más sombrío y traslúcido que en presencia de ésta. AD-XJ06 y PA-XJ15 se limitaron a crecer en dicho rango, mientras que el resto de los aislados soportaron 7.5% de concentración o más. Nueve aislados incluso fueron capaces de crecer desde 0 hasta 12.5% de concentración (Figura 44A). El crecimiento del micelio aéreo también fue registrado, manifestándose de manera inconsistente (Figura 44B).

A	Crecimiento	0%	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
AD-XJ01	2	2	1	0	0	0	0
AD-XJ02	2	2	2	1	0	0	0
AD-XJ03	2	2	2	1	0	0	0
AD-XJ04	2	2	2	0	0	0	0
AD-XJ05	2	2	1	0	0	0	0
AD-XJ06	2	2	0	0	0	0	0
AD-XJ07	2	2	2	0	0	0	0
AD-XJ08	2	2	2	0	0	0	0
AD-XJ09	2	2	2	0	0	0	0
AD-XJ10	2	2	2	0	0	0	0
AD-XJ12	2	2	1	0	0	0	0
AD-XJ14	2	2	2	1	0	0	0
PV-XJ17	2	1	1	0	0	0	0
PV-XJ19	2	2	2	0	0	0	0
PV-XJ24	2	2	2	2	2	0	0
PV-XJ26	2	2	2	2	2	2	2
PB-XJ20	2	2	2	2	2	1	1
PB-XJ23	2	2	1	0	0	0	0
PB-XJ28	2	2	2	2	2	1	1
CH-XJ18	2	2	2	2	2	2	2
CH-XJ21	2	2	2	0	0	0	0
CH-XJ22	2	2	2	2	2	2	2
CH-XJ25	2	2	2	2	2	1	1
CH-XJ27	2	2	2	2	2	2	2
CH-XJ29	2	2	2	0	0	0	0
PR-XJ11	2	1	1	0	0	0	0
PR-XJ13	2	2	2	2	2	1	1
PR-XJ30	2	2	2	0	0	0	0
PR-XJ31	2	2	2	1	1	1	1
PA-XJ15	2	1	0	0	0	0	0
PA-XJ16	2	2	1	0	0	0	0

B	Esporulación	0%	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
AD-XJ01	1	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ02	0	1	0	0	NA	NA	NA
AD-XJ03	0	0	0	0	NA	NA	NA
AD-XJ04	0	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ05	0	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ06	1	0	NA	NA	NA	NA	NA
AD-XJ07	1	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ08	0	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ09	0	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ10	0	1	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ12	0	0	0	NA	NA	NA	NA
AD-XJ14	0	0	0	0	NA	NA	NA
PV-XJ17	1	0	0	NA	NA	NA	NA
PV-XJ19	1	0	0	NA	NA	NA	NA
PV-XJ24	0	0	0	0	0	NA	NA
PV-XJ26	0	1	2	2	2	2	2
PB-XJ20	1	2	2	2	1	0	0
PB-XJ23	1	1	0	NA	NA	NA	NA
PB-XJ28	2	2	2	2	1	0	0
CH-XJ18	0	0	1	1	1	1	1
CH-XJ21	1	0	0	NA	NA	NA	NA
CH-XJ22	0	0	1	1	2	1	1
CH-XJ25	0	1	1	0	0	0	0
CH-XJ27	0	1	1	1	1	0	0
CH-XJ29	2	2	2	NA	NA	NA	NA
PR-XJ11	0	0	0	NA	NA	NA	NA
PR-XJ13	0	0	0	0	0	0	0
PR-XJ30	0	0	0	NA	NA	NA	NA
PR-XJ31	0	0	0	0	0	0	0
PA-XJ15	1	0	NA	NA	NA	NA	NA
PA-XJ16	1	0	0	NA	NA	NA	NA

Figura 44. A) Crecimiento de los aislados en medio MTS a diferentes concentraciones de NaCl, tras 10 días de incubación. B) Esporulación presentada en el crecimiento observado. Los criterios para determinarla fueron 2=Bueno, 1=Escaso, 0=Ausente.

7.7.3 Clasificación de la extremofilia de los aislados

Observando los rangos de crecimiento de los aislados en las condiciones de pH y salinidad, y tomando en cuenta los criterios establecidos en la metodología, los aislados se clasificaron dentro de los grupos definidos en la Tabla 14. Únicamente se ocuparon dos categorías de extremofilia por salinidad y dos de extremofilia por pH, viéndose una clara preferencia de los aislados por la halotolerancia moderada para salinidad y la alcalitolerancia facultativa para pH.

Tabla 14. Clasificación de los aislados de actinomicetos en las diferentes categorías de extremofilia en las que fueron caracterizados de acuerdo con los criterios establecidos en la metodología.

	Categoría	Aislados
Sal	Halotolerante ligero	AD-XJ06, PA-XJ15
	Halotolerante moderado	AD-XJ01, AD-XJ02, AD-XJ03, AD-XJ04, AD-XJ05, AD-XJ07, AD-XJ08, AD-XJ09, AD-XJ10, AD-XJ12, AD-XJ14, PV-XJ17, PV-XJ19, PV-XJ24, PV-XJ26, PB-XJ20, PB-XJ23, PB-XJ28, CH-XJ18, CH-XJ21, CH-XJ22, CH-XJ25, CH-XJ27, CH-XJ29, PR-XJ11, PR-XJ13, PR-XJ30, PR-XJ31, PA-XJ16
pH	Alcalitolerante	AD-XJ10, PV-XJ24, PV-XJ26, PB-XJ23, PR-XJ11, PA-XJ16
	Alcalitolerante facultativo	AD-XJ01, AD-XJ02, AD-XJ03, AD-XJ04, AD-XJ05, AD-XJ06, AD-XJ07, AD-XJ08, AD-XJ09, AD-XJ12, AD-XJ14, PV-XJ17, PB-XJ20, CH-XJ18, CH-XJ21, CH-XJ22, CH-XJ25, CH-XJ27, CH-XJ29, PR-XJ13, PR-XJ30, PA-XJ15,
	Indeterminado	PR-XJ31, PB-XJ28, PV-XJ19

7.7 Ensayos de antagonismo de los actinomicetos aislados contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos por el método de estría perpendicular

Los ensayos de antagonismo en medio ISP2 contra las bacterias patógenas MDR mostraron resultados favorables. La cepa contra la cual se presentó un mayor número de aislados con actividad antimicrobiana fue *Staphylococcus epidermidis* 17-1758, con 20 aislados; seguida de *S. epidermidis* 16-1928, con 19; *Staphylococcus aureus* 20-499, *S. aureus* 20-402 y *Staphylococcus haemolyticus* fueron inhibidas por cinco aislados; y finalmente solo dos aislados tuvieron actividad contra *Staphylococcus cohnii*.

Los aislados que presentaron mayor actividad fueron PR-XJ13 y PR-XJ30, siendo capaces de inhibir a las seis cepas patógenas evaluadas (Figura 45, Anexo 11).

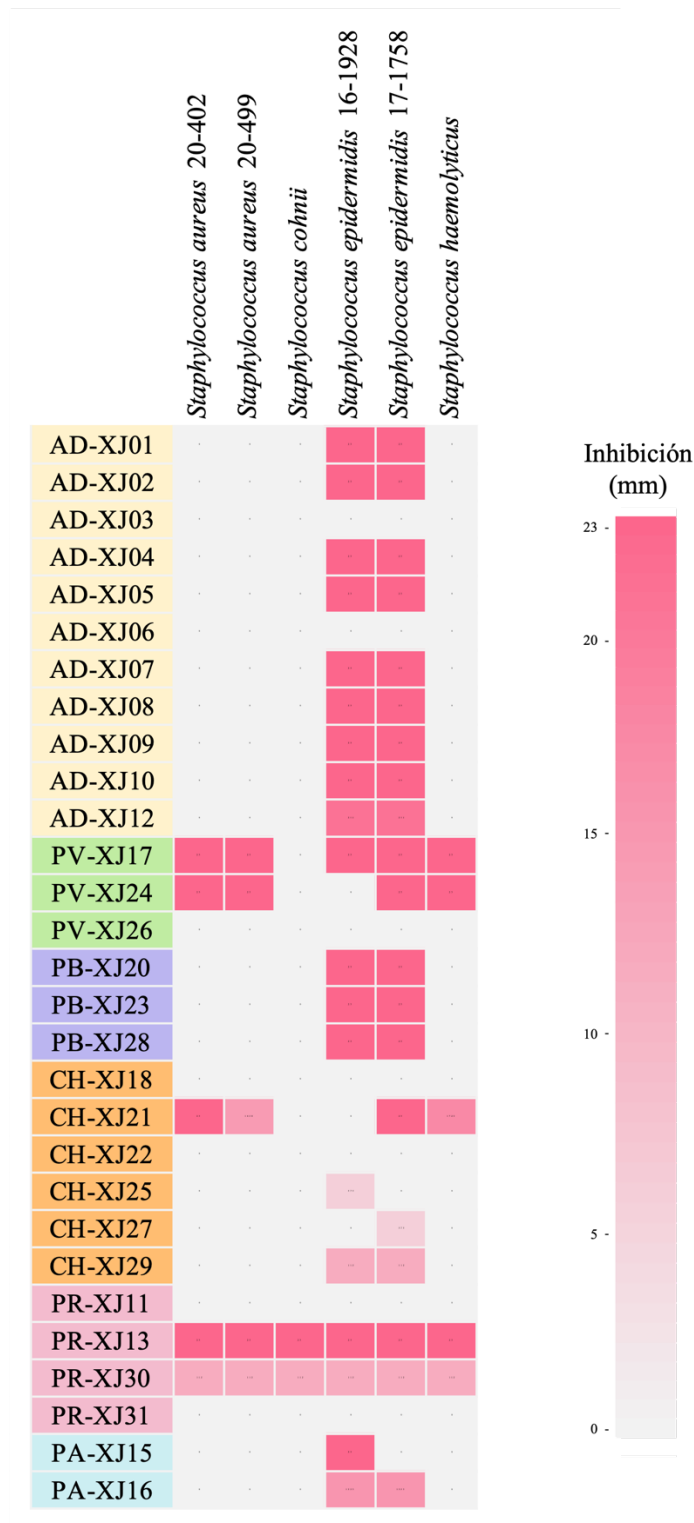


Figura 45. Mapa de calor que muestra la cantidad de inhibición que tuvo cada uno de los aislados contra los patógenos MDR *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus* 20-499, *Staphylococcus epidermidis* 17-1758, *Staphylococcus aureus* 20-402, *Staphylococcus cohnii* y *Staphylococcus epidermidis* 16-1928 en medio ISP2.

8. DISCUSIÓN

8.1 La diversidad morfológica de la Poza Azul

El presente estudio es el primero en dar un esbozo sobre la diversidad cultivable de la Poza Azul en el Rancho Pozas Azules del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Las 93 morfoespecies aisladas encontraron en el Medio Marino el vehículo propicio para desarrollarse en condiciones de laboratorio. Desde hace varios años que el estudio del Valle se realiza pensando en un ecosistema marino aun cuando existen factores geográficos como que las pozas aquí encontradas son sistemas hídricos en territorio continental, a 800 km del cuerpo marino más cercano (Golfo de México), o factores químicos, como el hecho de que la composición del agua no da indicios de algún parecido con agua de mar (Souza *et al.*, 2006). No obstante, los estudios moleculares de los microorganismos aislados y los de aquellos detectados por metagenómica revelan linajes endémicos de Cuatro Ciénegas que tienen origen marino, y se relacionan estrechamente con bacterias y archaeas ubicadas solo en los océanos (Souza *et al.*, 2006; Alcaraz *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2018; Medina-Chávez *et al.*, 2023).

Estudios anteriores que comparan la efectividad de varios medios para aislar diversidad bacteriana de agua marina inexplorada colocan al Medio Marino como una excelente opción para dicho fin, pues puede dar una diferencia abismal en conteo de UFC y diversidad de morfologías coloniales, aún en comparación con medios igualmente específicos como Sales Marinas y Glucosa (Rodrigues y de Carvalho, 2022).

La caracterización de la morfología colonial de los aislados obtenidos tras un muestreo puede brindar información relevante sobre la diversidad de un ambiente (Sousa *et al.*, 2011). Ben-Jacob *et al.* (2000) aseguran que el aspecto de estos cúmulos de poblaciones procariotas está determinado directamente por la especie a la que pertenecen y las condiciones en que se desarrollan. Esto porque se trata de una respuesta física al estrés inducido por el entorno, ligada al metabolismo único de cada cepa, por lo que diferentes cepas de microorganismos producirán distintas morfologías coloniales, aun encontrándose en el mismo medio de cultivo (Shen y Chou, 2016; Tasaki *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2020). Del mismo modo, las

adaptaciones metabólicas pueden no ser suficientes o adecuadas para todos los microorganismos colocados en el medio, por lo que un estudio dependiente de cultivo siempre estará sesgado hacia las bacterias que logren proliferar (Yang *et al.*, 2015).

La curva de rarefacción obtenida a partir de las diferentes morfoespecies aisladas indica que aún hay bastante por explorar sobre la diversidad bacteriana cultivable de la Poza Azul, respaldado por el hecho de que los 93 morfotipos identificados a partir de las condiciones de aislamiento aplicadas no se comparan con los 335 potenciales que el índice de Chao2 sugiere que se podrían encontrar. La manera en que se pudiera acercarse lo más posible a este número sería poner atención a cuestiones como el tiempo que pasa entre la colecta de la muestra y la siembra en el medio de cultivo, pues se ha visto que se ve afectada la viabilidad, siendo lo más recomendable el realizar el aislamiento inmediatamente después de colectar (Lagier *et al.*, 2015). Otros factores que condicionan la diversidad cultivable pueden ser la temperatura y tiempo de incubación, la oxigenación o incluso una preferencia personal de los microbiólogos hacia conservar las morfologías más llamativas (Austin, 2017).

Esta diversidad cultivable también puede ser reducida de manera intencional para sesgarse a la obtención de ciertos grupos taxonómicos. Esto al utilizar pretratamientos específicos, ya sean físicos, químicos o biológicos (Weeraphan *et al.*, 2023). De esta manera, el pretratamiento de calor redujo significativamente la cantidad de aislados y morfologías distintas de los inóculos a los que fue aplicado, siendo que obtuvo un total de 45 aislados, mientras que con el aislamiento directo fueron 79. Empero, 31 de los fenotipos observados correspondieron a bacterias obtenidas exclusivamente tras calentar la muestra, lo cual influyó directamente en los análisis de diversidad previamente mencionados.

El pretratamiento de calor busca activar las esporas de los procariotes del *phylum* Bacillota y eliminar al resto de los microorganismos (Song *et al.*, 2018). Sin embargo, la inoculación directa fue significativamente mayor en cuanto a la obtención de bacterias de dicho *phylum*, en comparación con el pretratamiento, pues únicamente fueron 19 los aislados que se le pudieron asociar tras haber secuenciado su gen 16S ribosomal, frente a los 43 del método directo. Esto, más que hablar sobre la ineffectividad de un método, posiblemente da fuerza a estudios previos en el Valle de Cuatro Ciénegas en los que ha sido clara la dominancia del

phylum Bacillota, especialmente el género *Bacillus* (Rodríguez-Torres *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2018).

8.2 Diversidad taxonómica de PA y AD

Aunque la morfología colonial sigue siendo el primer paso para la identificación bacteriana, son las estrategias moleculares las que han permitido observar las relaciones evolutivas entre los seres vivos (Woese *et al.*, 1990; Huang y Wu, 2018). Para lograr una aproximación a conocer la clasificación taxonómica de los aislados de la Poza Azul, se procedió a secuenciar el gen *16S* ribosomal de 104 aislados. Éstos fueron exitosamente secuenciados y sus secuencias se analizaron por alineamientos con la base de datos del NCBI. Para algunos microorganismos aislados, el análisis de GenBank mostró que poseen la misma secuencia del gen *16S* ribosomal, y sin embargo presentaron distinta morfología colonial, lo que sugiere una pluralidad de fenotipos para una misma especie. Esto es completamente posible, pues dentro de la misma cepa puede haber diversidad genética que conduce a la fenotípica, lo cual apoya la idea de que la caracterización de la morfología colonial puede ser un complemento que contribuye con información importante para la identificación microbiana (Qamer *et al.*, 2003).

Las secuencias del gen *16S* ribosomal de los 104 aislados coincidieron solo con tres *phyla*: Bacillota, Actinomycetota y Pseudomonadota. Se observó una clara dominancia por parte de Bacillota, asociado a más del 60% de los aislados. Este número es muy pequeño comparado con los 57 *phyla* bacterianos que han sido detectados en la poza Churince de Cuatro Ciénegas (Souza *et al.*, 2018), aunque la metodología metagenómica lo explica. No obstante, análisis de secuencias dependientes de cultivo realizados en esta misma poza han revelado una incidencia casi absoluta de Bacillota y Actinomycetota (Rodríguez-Torres *et al.*, 2017), muy posiblemente como resultado de su enriquecimiento en el Medio Marino.

Churince se encuentra a más de 10 km de distancia de la Poza Azul, por lo que se optó por comparar la información de los aislados obtenidos con los de alguna poza más cercana. Se decidió que era pertinente elegir a la poza Domos del Arqueano por dos razones principales: en primera, que se ubica a solo 100 m de la Poza Azul, dentro del Rancho Pozas Azules, por

lo que sería posible observar diferencias en la diversidad dependientes de la distancia; y la segunda, porque visualmente es muy diferente, ya que el agua toma tonos amarillos a pardos, y la sal puede ser tan abundante que llega a cristalizar sobre la superficie.

Las secuencias de los Domos del Arqueano habían sido previamente obtenidas por Olmedo-Álvarez. Se analizaron por alineamientos con la base de datos de NCBI y se encontró un patrón similar en cuanto a los phyla que pertenecían y las proporciones de estos, solamente agregando la presencia de un miembro del *phylum* Thermodesulfobacteriota. Esto sugiere a grandes rasgos que los Domos del Arqueano podrían tener mayor similitud taxonómica con la Poza Azul que el Churince. Sumado a que menos de la décima parte (19/269) de las secuencias totales obtenidas de aislados del Rancho Pozas Azules tuvieron coincidencia en la base de datos de NCBI con los genes del *16S* ribosomal de bacterias de origen marino, frente a un aplastante 50% de Churince (Souza *et al.*, 2006). Empero, esto pudiera deberse a cierta informalidad por parte de grupos de trabajo provenientes de países como China o Estados Unidos, quienes no siempre reportan el tipo de muestra de la que se había aislado su microorganismo, lo que pudo afectar estos resultados.

Si bien la confiabilidad taxonómica del gen *16S* ribosomal para determinar la especie de un aislado se ha puesto en duda en los últimos años, los puntos de corte establecidos por Yarza *et al.* (2014) para determinar la clasificación taxonómica de una secuencia nucleotídica dependiendo del porcentaje de identidad se han utilizado ampliamente y son aún una referencia en continuo uso. Depender de un solo marcador molecular se presta a errores debido a cuestiones técnicas, como una mala secuenciación; sistemáticas, como la falta de secuencias de referencia o información de éstas en las bases de datos. Incluso la constante transferencia horizontal de genes entre bacterias disminuye la confiabilidad en un solo marcador (Poretsky *et al.*, 2014). Una manera en que el gen 16S pudiera coincidir con la especie sería contando con la totalidad de la secuencia y con múltiples copias intragénicas (Johnson *et al.*, 2019). Es por estas razones que para evaluar las diferencias en la diversidad de PA y AD, se prefirió trabajar a nivel de género.

Aunque las proporciones a nivel de phylum o clase se asemejaban bastante, hubo una clara diferencia en los géneros que se asociaban con las secuencias de cada poza. Los números efectivos de especies fueron clave para entender cómo se distribuía la diversidad. La riqueza

observada fue claramente mayor en AD, lo cual habla de una mayor variedad en dicho sitio. Sin embargo, en los análisis de comunidades bacterianas, la riqueza puede verse sesgada por el esfuerzo muestral, por lo que no es un parámetro determinante (Youssef y Elshahed, 2008). El balance de ambas pozas es similar, pues la diversidad tanto en función de las especies comunes como de las abundantes dieron números con límites de confianza que se traslapaban.

Aun cuando los índices de Shannon y Simpson por sí mismos no son una medida de la diversidad, son pocos los estudios que obtienen un valor real por medio de los números de Hill, lo que obliga a realizar las comparaciones con los valores crudos de los índices. El índice de Shannon de ambientes extremos de lugares como el desierto de Atacama y el Mar Muerto fue mayor a los obtenidos en PA y AD (Idris *et al.*, 2017; Jacob *et al.*, 2017; Leon *et al.*, 2018). Esto se repite con el mismo índice en Churince y AD (Souza *et al.*, 2018; Medina-Chávez *et al.*, 2023). Sin embargo, los estudios previamente mencionados parten de OTUs resultado de secuenciación metagenómica, mientras que Kirk Harris *et al.* (2012), en un estudio dependiente de cultivo en Guerrero Negro, obtienen un índice de Shannon por debajo de los correspondientes a PA y AD por el mismo método. Esto sugiere que la naturaleza del análisis también puede sesgar las mediciones de diversidad obtenidas en estudios de diferentes aproximaciones, por lo que lo más pertinente será comparar los resultados de metodologías similares.

La disparidad entre los sitios del Rancho Pozas Azules se vio al analizar los linajes exclusivos de cada sitio. En PA se encontraron géneros de los que se han reportado cepas extremófilas, como *Lysinibacillus*, que se ha asociado a microorganismos alcalífilos (Zhao *et al.*, 2015); o *Methylobacterium*, que es capaz de producir un biofilm que les confiere resistencia a condiciones adversas como desecación y altas temperaturas (Kovaleva *et al.*, 2014); además de algunos taxa asociados con bacteremias extendidas, como *Aeromonas*, *Gordonia* y *Shewanella* (Tena *et al.*, 2007; López Aperador *et al.*, 2016; Muñoz-Peña *et al.*, 2016). Sin embargo, el hecho de que una especie bacteriana esté ligada a actividad patogénica no necesariamente significa que todos los aislados de ésta sean virulentas, pues se han reportado cepas patógenas y no patógenas dentro de la misma especie en organismos más estudiados como *Xanthomonas arboricola* o *Escherichia coli* (Cesbron *et al.*, 2015; Kaito *et al.*, 2020).

De manera contrastante, géneros que solo se encontraron en AD se consideran mayormente halotolerantes, como *Marinobacter*, *Halomonas*, *Desulfonatronovibrio*, *Alkalihalobacillus* y *Salinarimonas* (Liu *et al.*, 2010; Schwaiger *et al.*, 2010; Sorokin *et al.*, 2012; Flores-Gallegos *et al.*, 2019; Joshi *et al.*, 2021). Esto sugiere que, a pesar de la corta distancia entre ambas pozas, y que la proporción de los *phyla* aislados es muy similar, la gran cantidad de sal reportada en la poza por Medina-Chávez *et al.* (2023) es un factor que selecciona la proliferación de linajes halotolerantes.

Pese a todo, el árbol filogenético Neighbour Joining encuentra que existe una relación cercana entre los microorganismos de PA y AD, siendo que realmente no forman clados únicos por poza. De facto, el árbol Maximum-Likelihood sugiere que los linajes de PA pudieran provenir de ancestros comunes originalmente localizados en AD. Es posible pensar incluso que un origen de carácter extremófilo para ambas pozas.

Algo muy interesante que se puede observar en ambos árboles es la manera en que los miembros identificados como parte del género *Bacillus* no se agrupan en un solo clado, sino que se reparten entre otros clados de la misma clase. El puntaje de bootstrapping libra de que se haya dado por un error técnico, y se han confluído dos razones que pudieran explicar este acomodo. La primera es sobre cómo recientemente los estudios de genoma completo y de secuencias proteicas han permitido observar más cercanamente las relaciones filogenéticas de este género en particular, lo que ha procedido en una continua reclasificación taxonómica (Gupta *et al.*, 2020; Patel y Gupta, 2020). La segunda es que se ha visto que las secuencias del *16S* ribosomal del género *Bacillus* son muy conservadas, lo que advierte una clara limitación en el uso de este marcador molecular para distinguir entre sus miembros, por lo que se ha optado por usar otros marcadores como *gyrB* (Jeyaram *et al.*, 2011; Shu y Yang, 2017).

8.3 Aislamiento selectivo de actinomicetos en condiciones de extremofilia

Los estudios de diversidad de los metagenomas del Churince y de los Domos del Arqueano, en conjunto con el presente estudio de diversidad dependiente de cultivo de la Poza Azul y los Domos, brindan el precedente para sugerir una alta diversidad de especies en las pozas

del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Souza *et al.*, 2018; Viladomat *et al.*, 2022; Medina-Chávez *et al.*, 2023).

Una alta diversidad bacteriana en un sitio determinado incrementa la probabilidad de aislar linajes que no se hayan encontrado con anterioridad, para así explorar el 99% de diversidad microbiana que, Locey y Lennon (2016) aseguran, no se ha rozado ni con la punta de los dedos. Y es justamente ahí donde pudieran encontrarse los nuevos antibióticos que contribuyan a combatir la crisis de resistencia actual (Hegemann *et al.*, 2022). Sobre todo, al aislar actinobacterias filamentosas, las cuales son las productoras del 64% de los antibióticos descubiertos a lo largo de la historia (Hutchings *et al.*, 2019).

Ya se ha encontrado una alta diversidad de actinomicetos en el Valle de Cuatro Ciénegas (Arocha *et al.*, 2017). Empero, la Laguna del Churince, de la cual se han obtenido la gran mayoría de éstos, es ahora un ecosistema en agonía, que está prácticamente seco (López, 2020). La gran riqueza que caracterizaba a Churince se ha perdido, por lo que las investigaciones se han movido a otros cuerpos de agua dentro del área, con la esperanza de encontrar historias similares en alguna de las interesantes pozas. La Poza Azul fue uno de los primeros candidatos en la mira, pero rápidamente descartado debido a que la presencia de estromatolitos vivos la ha vuelto una zona extremadamente protegida. Por ello, los estudios que se han realizado en los escasos muestreos a esta poza tienen un valor inimaginable.

Los Domos del Arqueano, un ambiente hipersalino recientemente descubierto, se han convertido en el sitio ideal para la búsqueda de microorganismos extremófilos. La combinación de este enfoque, en conjunto con el de la bioprospección de ambientes inexplorados, son estrategias que contribuyen a romper con el esquema que ha inducido a que en los últimos años se hayan aislado microorganismos ya estudiados, redescubriendo compuestos antimicrobianos previamente conocidos, a los que posiblemente ya se desarrollaran mecanismos de resistencia por parte de los patógenos (Hamedi *et al.*, 2017; Newman y Cragg, 2020; Schneider, 2021).

Se obtuvieron 12 aislados de actinomicetos extremotolerantes de los Domos del Arqueano, así como de otras pozas que aparentan una gran diversidad de microorganismos. Las Pozas Rojas, cuyas aguas son altamente alcalinas, aportaron 4 aislados; de la Poza La Becerra, que

contiene una grieta cálida cercana a su fondo, se obtuvieron 3; la Poza Verde, la cual contiene también estromatolitos vivos, sumó 4 aislados más; e incluso la Laguna del Churince, que aun estando seco contribuyó con el 20% de los aislados. En conjunto se obtuvieron 29 aislados de actinobacterias extremotolerantes provenientes de cinco pozas del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Se integraron exitosamente cuatro factores para favorecer el aislamiento de nuevos linajes de actinobacterias posiblemente extremófilas: 1) la bioprospección de sitios poco o nada explorados, 2) el muestreo de ambientes con características que sugieren la existencia de condiciones extremas, 3) el empleo de medios de cultivo con fuentes de nutrientes complejas, especiales para bacterias con rutas metabólicas distintas de lo usual, 4) el empleo de una combinación de pretratamientos que eliminaran a microorganismos no blanco.

Los pretratamientos químicos como el empleo de fenol o de antibióticos han mostrado un aislamiento selectivo de actinobacterias filamentosas, pues pueden eliminar a los bacilos esporulados, las bacterias gram-negativas, y a algunos otros taxa indeseados (Jiang et al., 2016; Bundale *et al.*, 2018).

De todos los medios utilizados, únicamente tres de ellos fueron efectivos para el aislamiento de actinobacterias extremófilas: medio ácidos húmicos con vitaminas, medio quitina y agar glicerol tirosina (ISP5). El medio de ácidos húmicos y el medio de quitina ya se han reportado como algunos de los mejores para el aislamiento de actinobacterias raras, pues sus complejas fuentes de nutrientes seleccionan a los microorganismos filamentosos (Seong *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2008; Lacombe-Harvey *et al.*, 2018; Alvarez Godínez, 2021). Lo mismo sucede con el ISP5, el cual ya se ha utilizado para la obtención de actinobacterias halófilas (Gajula Swarna *et al.*, 2016). En sí, los medios escasos en nutrientes han mostrado una mayor efectividad para aislar actinomicetos raros que los medios más ricos (Subramani y Sipkema, 2019).

El pH de estos tres medios también fue un factor que influyó en la obtención de aislados, pues se observó una asociación significativa en el número de morfologías obtenidas y el pH de los medios utilizados, destacando el papel de los medios HV a pH 10 e ISP5 a pH 11 como buenos selectores de actinobacterias alcalífilas. Exponer a las bacterias por primera vez a un

medio artificial de condiciones alcalinas ya ha sido previamente reportado como un método efectivo para la obtención de estos microorganismos (Delgado-García *et al.*, 2018; Merino *et al.*, 2019; Gómez-Acata *et al.*, 2021).

Cabe agregar que se siguió la recomendación de Lagier *et al.* (2015) sobre realizar de manera muy rigurosa el aislamiento inmediatamente después de obtener la muestra de manera muy literal, por lo que una de las muestras de los Domos del Arqueano fue sembrada en medios de cultivo 10 minutos después de haberse colectado, en un área improvisada, a unos cuantos metros de la poza. Este método arcaico resultó en la obtención de 10 de los 12 aislados provenientes de dicha poza.

8.4 Caracterización morfológica de las actinobacterias

En sus inicios, la clasificación taxonómica de los microorganismos se realizaba exclusivamente por descripción de la morfología colonial y celular, además de algunas pruebas bioquímicas (Lechevalier, 1976). Shirling y Gottlieb (1966) propusieron una serie de medios especiales para realizar esto en los actinomicetos, enfocándose en el género *Streptomyces*. Uno de ellos es el agar malta y extracto de levadura (ISP2), el cual es la base para la identificación y mantenimiento del cultivo de los actinomicetos.

Los aspectos para evaluar en el crecimiento en placa Petri de los actinomicetos son el color de los micelios vegetativo y aéreo, además de la producción de pigmento soluble (Li *et al.*, 2016). El color del micelio vegetativo es excesivamente variable. No así con el micelio de los aislados obtenidos del Valle de Cuatro Ciénegas, los cuales en su mayoría rondan los tonos amarillos y blancos, exceptuando a los coloridos aislados obtenidos de las Pozas Rojas.

Kämpfer (2012) menciona que el género *Streptomyces*, el más común dentro de los actinomicetos, produce micelio vegetativo con aspecto liquenoide, micelio aéreo que puede ser de apariencia floccoso, granular, polvoriento o aterciopelada, ambos muy abundantes, y puede o no expulsar pigmentos solubles. La mayor parte de los aislados obtenidos en la presente investigación cumplieron con el micelio vegetativo liquenoide y el micelio aéreo

tanto flocoso, polvoriento y aterciopelado, exceptuando a PR-XJ11, CH-XJ29, PR-XJ30 y PR-XJ31, por las razones expuestas a continuación.

A nivel microscópico los *Streptomyces* se componen de células filamentosas ramificadas (Kumar *et al.*, 2011). La tinción Gram permitió observar estas estructuras gram-positivas en todos los aislados excepto PR-XJ30. Esta evidencia, en conjunto con su morfología colonial, imposibilita clasificar a este aislado en el grupo de los actinomicetos. Sin embargo, el hecho de ser gram-positivo no descarta por completo su pertenencia al *phylum* Actinomycetota, pues géneros como *Rhodococcus* o *Gordonia* presentan características similares a las de este aislado (Barka *et al.*, 2016).

Además, a pesar de que la observación microscópica sugiere que son actinobacterias filamentosas gram-positivas, el tamaño de la colonia del aislado CH-XJ29, y la ausencia de micelio aéreo visible en los aislados PR-XJ11, y PR-XJ31, son pruebas que aluden a que estos tres aislados no forman parte del género *Streptomyces*, aunado además a su lento crecimiento en los medios ISP. No obstante, no existe la suficiente evidencia para llegar a una conclusión más definitiva. Esto porque hace falta la caracterización polifásica, la cual simboliza la integración de la caracterización morfológica y la identificación genómica, son ahora la base para la correcta clasificación de los actinomicetos (Nouioui *et al.*, 2018). Por lo tanto, será necesario complementar con los análisis faltantes para todos los aislados.

8.5 Capacidad extremófila de las actinobacterias

La gran amplitud de los rangos de crecimiento en diferentes valores de pH y concentraciones de sal muestra una destacada capacidad extremófila de los actinomicetos provenientes de las distintas pozas. Los aislados de los Domos del Arqueano mostraron los rangos más estrechos, a pesar de los valores de salinidad y pH que se han registrado en la poza (Medina-Chávez *et al.*, 2023). Esto puede ser debido a que los aislados obtenidos de este sitio en particular se encontraban en forma de espora, y al encontrar en el medio de aislamiento un ambiente más adecuado, lograron proliferar (Bobek *et al.*, 2017).

La esporulación en *Streptomyces* puede estar ligada a distintos factores, pero los más evidentes en el caso podrían ser la depleción de los nutrientes en el medio y el estrés provocado por condiciones adversas (Bush *et al.*, 2015). De este modo, la esporulación en medio a distintas concentraciones de sal podría tomar tres vías principales: 1) el microorganismo encuentra un ambiente favorable, por lo que su crecimiento es abundante, y el rápido agotamiento de los nutrientes induce que comience a generar micelio aéreo; 2) el ambiente no es favorable, pero encuentra suficientes factores que induzcan su crecimiento, por lo que se desarrolla en el medio, pero rápidamente produce esporulación; 3) el ambiente es favorable y el crecimiento no se extiende tanto, por lo que se adapta correctamente al medio y le toma más tiempo comenzar a generar esporas.

La biomasa observada en ausencia de sal fue en general más oscura y traslúcida que cuando sí contaban con ésta en el medio. Esto sugiere un cambio en la morfología inducido por estrés (Foster, 2005). Posiblemente la sal no sea un compuesto que los aislados obtenidos requieran necesariamente para su desarrollo, pero sí para que exista un crecimiento óptimo.

Así podemos asegurar que el aislamiento con enfoque extremófilo de actinobacterias provenientes de las pozas del Valle de Cuatro Ciénegas obtuvo exitosamente aislados de actinobacterias filamentosas halotolerantes, alcalitolerantes y haloalcalitolerantes. Este último término es la forma de nombrar a aquellos microorganismos que sobreviven a la mesofilia y a altas concentraciones de sal y altos niveles de pH (Keshri *et al.*, 2013; Daebeler *et al.*, 2020). Alvarez Godínez (2021) ya había reportado la obtención de actinomicetos por aislamiento selectivo de extremofilia, provenientes de los Domos del Arqueano y las Pozas Rojas, con lo que el presente trabajo confirma que actinobacterias tanto de estas pozas como de la Poza Verde, el Churince seco y la Poza La Becerra pueden ser obtenidas por un aislamiento con dicho sesgo.

Además, aunque los dos aislados obtenidos por un enfoque mesófilo presentaron capacidad extremotolerante equiparable a los del aislamiento selectivo, no brindan la suficiente evidencia para asegurar que la capacidad extremófila de los aislados es independiente del enfoque que se le dé a la recolección, sin embargo, el hecho da pie a que se realicen análisis posteriores para tratar de explicar esta asociación.

8.6 Capacidad antagonista de las actinobacterias extremotolerantes contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos

Los seis aislados clínicos utilizados para los ensayos de antagonismo presentan resistencia a cuatro o más categorías de antibióticos, lo que los coloca como MDR. De ellos, los más resistentes son *S. haemolyticus*, y *S. epidermidis* 17-1758, que sobreviven ante 10 categorías de antibióticos, seguidos de *S. cohnii* con 8, *S. epidermidis* 16-1928 con 5 y finalmente ambas cepas de *S. aureus* con 4 categorías (Correa Oviedo, 2023).

Aislados de actinobacterias filamentosas de las pozas del Valle de Cuatro Ciénegas, tanto las obtenidas de manera selectiva como en aislamiento mesófilo, tuvieron actividad antagonista contra ambas cepas de *S. epidermidis*, mas la cepa 17-1758 fue uno de los patógenos más resistentes entre los que se probaron. No obstante, mientras los actinomicetos de la Poza Azul, de los Domos del Arqueano y de la Poza La Becerra únicamente lograron inhibir a estas dos cepas, hubo aislados provenientes de la Poza Verde y el Churince seco que tuvieron actividad antimicrobiana contra alguno de los otros cuatro patógenos probados. Los más destacados fueron los aislados PR-XJ13 y PR-XJ30, dimanantes de las Pozas Rojas, que antagonizaron a todos los patógenos MDR evaluados. Un estudio más profundo podría dilucidar si existe una asociación entre la actividad antimicrobiana y la poza de origen.

Los actinomicetos del presente estudio fueron además caracterizados en sus rangos de extremofilia, lo cual permite confirmar que son extremotolerantes. Esto significa entonces existen en el Desierto Chihuahuense, actinobacterias extremotolerantes, aisladas de ambientes inexplorados o adversos, con actividad antimicrobiana ante patógenos ESKAPE MDR, homólogas a aquellas aisladas del Desierto de Atacama o del Sahara que también han presentado actividad (Djinni *et al.*, 2019; Xie y Pathom-aree, 2021).

9. CONCLUSIONES

El presente estudio acentúa que las comunidades bacterianas que se encuentran en las pozas del Valle de Cuatro Ciénegas tienen una alta diversidad, y a partir de ellas es posible aislar actinobacterias extremotolerantes con actividad antimicrobiana contra microorganismos multidrogoresistentes causantes de enfermedades infecciosas.

Se recuperaron 124 cepas bacterianas de la Poza Azul a partir de diez unidades muestrales, de las cuales 104 pusieron asociarse a los *phyla* Bacillota, Actinobacteria y Pseudomonadota.

El análisis de las secuencias del gen *16S* ribosomal, obtenidas de microorganismos cultivables provenientes de la Poza Azul y los Domos del Arqueano, indica que no existe diferencia en los números de diversidad al compararlas entre sí, pero que ésta es más alta al compararlas con otros estudios de la misma naturaleza.

Los géneros asociados con las secuencias obtenidas de microorganismos cultivables de los Domos del Arqueano se relacionan con más linajes de naturaleza extremófila que aquellos asociados con las bacterias aisladas de la Poza Azul.

Se aislaron 22 cepas de actinobacterias haloalcalitolerantes facultativas, 6 haloalcalitolerantes y 3 halotolerantes dimanantes de las Pozas Rojas, los Domos del Arqueano, la Poza Azul, la Poza Verde, la Poza la Becerra y el Churince, ubicadas en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Se identificaron 22 cepas de actinobacterias extremotolerantes con actividad antimicrobiana contra al menos una cepa MDR de origen clínico.

10. PERSPECTIVAS

Existen reportes de actividad antimicrobiana por parte de bacilos gram-positivos esporulados, por lo que sería interesante analizar a los *Bacillus* aislados de la Poza Azul en este contexto.

La producción de compuestos antimicrobianos puede depender del medio de cultivo, de modo que ensayos en otros medios de las actinobacterias extremotolerantes aisladas, antagonizando contra patógenos multidrogosresistentes, podría aumentar la efectividad de la actividad antimicrobiana.

La secuenciación del genoma completo de las actinobacterias podría ayudar no sólo a lograr una caracterización polifásica de éstas, sino a ver más claramente la existencia de clústeres biosintéticos responsables de la producción de antibióticos, para así optimizar los estudios exploratorios.

La secuenciación del metagenoma de un tapete microbiano proveniente de las Pozas Rojas podría aportar evidencias que explicaran la diversidad del sitio y conocer los linajes capaces de sintetizar productos naturales antimicrobianos que existen en el sitio.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdelkader MSA, Philippon T, Asenjo JA, Bull AT, Goodfellow M, Ebel R, Jaspars M, Rateb ME. 2018. Asenjonamides A–C, antibacterial metabolites isolated from *Streptomyces asenjonii* strain KNN 42.f from an extreme-hyper arid Atacama Desert soil. *The Journal of Antibiotics* 71(4):425–431. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-017-0012-0>

Alcaraz LD, Olmedo G, Bonilla G, Cerritos R, Hernández G, Cruz A, Ramírez E, Putonti C, Jiménez B, Martínez E, López V, Arvizu JL, Ayala F, Razo F, Caballero J, Siefert J, Eguiarte L, Vielle J-P, Martínez O, Souza V, Herrera-Estrella A, Herrera-Estrella L. 2008. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(15):5803–5808. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0800981105>

Almalki MA. 2020. Isolation and characterization of polyketide drug molecule from *Streptomyces* species with antimicrobial activity against clinical pathogens. *Journal of Infection and Public Health* 13(1):125-130. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2019.07.002>

Alvarez Godínez CE. 2021. Bioprospección de géneros raros de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León].

Amin DH, Abdallah NA, Abolmaaty A, Tolba S, Wellington EMH. 2020. Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre* 44(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>

Aref MAM, Taj RJA. 2012. Recent analog of gypsified microbial laminites and stromatolites in solar salt works and the Miocene gypsum deposits of Saudi Arabia and Egypt. *Arabian Journal of Geosciences* 6(11):4257–4269. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12517-012-0684-5>

Arocha-Garza HF, Canales-Del Castillo R, Eguiarte LE, Souza V, De la Torre-Zavala S. 2017. High diversity and suggested endemism of culturable Actinobacteria in an extremely

oligotrophic desert oasis. PeerJ 5:e3247. Available from: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.3247>

Austin B. 2017. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 110:1247–1256. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0840-8>

Bahamas Marine EcoCentre [BME]. 2018. Stromatolites. Bahamas Marine EcoCentre, [Online]. Available from: <https://bahamas-marine-ecocentre.org/stromatolites/>

Baltz RH. 2006. Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 33(7):507–513. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0077-9>

Bargues MD, Schofield C, Dujardin J-P. 2017. Classification and systematics of the Triatominae. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease*, Telleria J, Tibayrenc M (eds). Elsevier, pp. 113–143. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801029-7.00006-x>

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(1):1–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00019-15>

Battistuzzi FU, Feijao A, Hedges SB. 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology* 4:44. Available from: <https://bmcevol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-4-44>

Beatson SA, Walker MJ. 2014. Tracking antibiotic resistance. *Science* 345(6203):1454–1455. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1260471>

Ben-Jacob E, Cohen I, Levine H. 2000. Cooperative self-organization of microorganisms. *Advances in Physics* 49(4):395–554. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/000187300405228>

Bobek J, Šmídová K, Čihák M. 2017. A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in Streptomyces. *Frontiers in Microbiology* 8:2205. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02205>

Brower, J.E., Zar, J.H., von Ende, C.N. 1998. *Field and Laboratory Methods for General Ecology*. McGraw-Hill, Boston.

Brown CT, Hug LA, Thomas BC, Sharon I, Castelle CJ, Singh A, Wilkins MJ, Wrighton KC, Williams KH, Banfield JF. 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature* 523(7559):208–211. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14486>

Bundale S, Singh J, Begde D, Nashikkar N, Upadhyay A. 2018. Culturable rare actinomycetes from Indian forest soils: Molecular and physicochemical screening for biosynthetic genes. *Iranian Journal of Microbiology* 10(2):132-142. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6039449/>

Bush MJ, Tschowri N, Schlimpert S, Flärdh K, Buttner MJ. 2015. c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomycetes. *Nature Reviews Microbiology* 13(12):749–760. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3546>

Capece MC, Clark E, Saleh JK, Halford D, Heinl N, Hoskins S, Rothschild LJ. 2013. Polyextremophiles and the Constraints for Terrestrial Habitability. In: *Polyextremophiles Life Under Multiple Forms of Stress*, Seckbach J, Oren A and Stan-Lotter H (eds). Springer: New York, pp. 7-59. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-007-6488-0_1

Castelle CJ, Banfield JF. 2018. Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell* 172(6):1181-1197. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.016>

Cavicchioli R, Amils R, Wagner D, McGenity T. 2011. Life and applications of extremophiles. *Environmental Microbiology* 13(8):1903–1907. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02512.x>

Cesbron S, Briand M, Essakhi S, Gironde S, Boureau T, Manceau C, Fischer-Le Saux M, Jacques M-A. 2015. Comparative Genomics of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Unveil Molecular and Evolutionary Events Linked to Pathoadaptation. *Frontiers in Plant Science* 6:1126. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>

Chao A, Chiu C-H, Jost L. 2010. Phylogenetic diversity measures based on Hill numbers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1558):3599–3609. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0272>

Chao, A. 1984. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11(4):265–270. Available from: <http://www.jstor.org/stable/4615964>

Chao, A. 1987. Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability. *Biometrics* 43(4):783–791. Available from: <https://doi.org/10.2307/2531532>

Chauhan NM, Gutama AD, Aysa A. 2019. Endophytic fungal diversity isolated from different agro-ecosystem of Enset (*Ensete ventricosum*) in Gedeo zone, SNNPRS, Ethiopia. *BMC Microbiology* 19(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-019-1547-y>

Chen J, Guo Y, Jia Y, Liu G, Li D, Xu D, Wang B, Zhou L, Peng L, Zhao F, Zhu Y, Sun J, Ye C, Wang J, Zhang H, Liu S, Seim I, Liu X, Xu X, Yang H, GOMP Consortium, Kristiansen K, Fan G. 2021. Diversity, function and evolution of marine microbe genomes. *bioRxiv* 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/2021.10.26.465843>

Colwell RK. 2013. EstimateS: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples. Version 9. User's Guide and Application. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs. Available from: <http://purl.oclc.org/estimates>

Correa Oviedo CD. 2023. Estudio de antagonismo de actinobacterias raras de Cuatro Ciénegas, Coahuila [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Available from: <http://eprints.uanl.mx/25592/>

Daebeler A, Kitzinger K, Koch H, Herbold CW, Steinfeder M, Schwarz J, Zechmeister T, Karst SM, Albertsen M, Nielsen PH, Wagner M, Daims H. 2020. Exploring the upper pH limits of nitrite oxidation: diversity, ecophysiology, and adaptive traits of haloalkalitolerant *Nitrospira*. *The ISME Journal* 14(12):2967–2979. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-020-0724-1>

Daly A, Baetens J, De Baets B. 2018. Ecological Diversity: Measuring the Unmeasurable. *Mathematics* 6(7):119. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/math6070119>

de la Haba RR, Antunes A, Hedlund BP. 2022. Editorial: Extremophiles: Microbial genomics and taxogenomics. *Frontiers in Microbiology* 13:984632. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.984632>

De Mandal S, Chatterjee R, Kumar NS. 2017. Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology* 17(1):90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-017-1002-x>

Delgado-García M, Contreras-Ramos SM, Rodríguez JA, Mateos-Díaz JC, Aguilar CN, Camacho-Ruiz RM. 2018. Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon* 4(11):e00954. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954>

DeLong DC. 1996. Defining Biodiversity. *Wildlife Society Bulletin* 24(4):738–49. Available from: <http://www.jstor.org/stable/3783168>

Diario Oficial de la Federación [DOF]. 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, Agua para uso y consumo humano, Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Secretaría de Salud, [Online]. Available from: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2063863&fecha=31/12/1969#gsc.tab=0

Diario Oficial de la Federación [DOF]. 2018. Acuerdo por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. Consejo de

Salubridad General, [Online]. Available from: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525043&fecha=05/06/2018

Divakar G, Sameer RS, Bapuji M. 2018. Screening of Multi-Metal Tolerant Halophilic Bacteria for Heavy Metal Remediation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7(10):2062-2076. Available from: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.238>

Djinni I, Defant A, Kecha M, Mancini I. 2019. Actinobacteria Derived from Algerian Ecosystems as a Prominent Source of Antimicrobial Molecules. *Antibiotics* 8(4):172. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics8040172>

Doerder FP, Brunk C. 2012. Natural Populations and Inbred Strains of *Tetrahymena*. In: *Tetrahymena thermophila*, Collins K (ed) . Elsevier, pp. 277–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-385967-9.00009-8>

Dunne JA, Williams RJ. 2009. Cascading extinctions and community collapse in model food webs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1524):1711-1723. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2008.0219>

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792–1797. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Escalante Espinosa T. 2003. ¿Cuántas especies hay? Los estimadores no paramétricos de Chao. *Elementos: ciencia y cultura* 52:53-56. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/294/29405209.pdf>

Espinosa-Asuar L, Monroy-Guzmán C, Madrigal-Trejo D, Navarro-Miranda M, Sánchez-Pérez J, Buenrostro Muñoz J, Villar J, Cifuentes Camargo JF, Kalambokidis M, Esquivel-Hernandez DA, Viladomat Jasso M, Escalante AE, Velez P, Figueroa M, Martinez-Cardenas A, Ramirez-Barahona S, Gasca-Pineda J, Eguiarte LE, Souza V. 2022. Diversity of an uncommon elastic hypersaline microbial mat along a small-scale transect. *PeerJ* 10:e13579. Available from: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.13579>

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2008. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clinical infectious diseases* 46(7):1121-1122. Available from: <http://dx.doi.org/10.1086/528867>

Flores-Gallegos AC, Delgado-García M, Ascacio-Valdés JA, Villareal-Morales S, Michel-Michel MR, Aguilar-González CN, Rodríguez-Herrera R. 2019. Hydrolases of Halophilic Origin With Importance for the Food Industry. In: *Enzymes in Food Biotechnology*, Kuddus M (ed.). Elsevier: India, pp. 197–219. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00013-x>

Foster PL. 2005. Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569(1–2):3–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.017>

Founou RC, Founou LL, Essack SY. 2017. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *Public Library of Science One* 12(12):e0189621. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>

Gajula Swarna K, Prasada Babu G, Jaya Kumar K, Charan Teja P, Veena D, Paramageetham C. 2016. Stress Tolerance and Characterization of Actinomycetes from Salt Pan Soils of Nellore District, Andhra Pradesh. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 7(5):1426-1435.

Galhardo RS, Rosenberg SM. 2009. Extreme genome repair. *Cell* 136:998–1000. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.008>

Gaur RK. 2017. Antibiotic resistance: Alternative approaches. *Indian Journal of Pharmacology* 49(2):208-210. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5497446>

Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. 2013. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana,

Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(6):426-35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60092-1](http://dx.doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60092-1)

Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. 2019. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology* 27(4):323–338. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>

Gilliland MG, Erb-Downward JR, Bassis CM, Shen MC, Toews GB, Young VB, Huffnagle GB. 2012. Ecological Succession of Bacterial Communities during Conventionalization of Germ-Free Mice. *Applied and Environmental Microbiology* 78(7):2359–2366. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.05239-11>

Glöckner FO, Yilmaz P, Quast C, Gerken J, Beccati A, Ciuprina A, Bruns G, Yarza P, Peplies J, Westram R, Ludwig W. 2017. 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology* 261:169-176. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1198>

Gómez-Acata ES, Ayala-Gómez LM, García-Covarrubias R, Torres-Núñez MY, Vargas-López L, Hernández-Camargo S, Becerril-Rojas IG, León-Domínguez M, Zurita-García L, Navarro-Noya YE, Conde-Barajas E, Dendooven L. 2021. Bioprospecting of haloalkaliphilic microorganisms isolated from a dried-out maar in the volcano “Hoya Rincón de Parangueo.” *Nova Scientia* 13:26. Available from: <http://dx.doi.org/10.21640/ns.v13i26.2553>

Gribaldo S [@SGribaldo]. 2023, February 22. Need an up-to-date #TreeofLife for teaching/conferences/wall paper? Talented PhD student @BasileBeaud drew a schematic consensus ToL from the most recently [Image attached] [Tweet]. Twitter. <https://twitter.com/SGribaldo/status/1628431492459241472>

Gronstal A, Tambe Y. 2019. Surviving as an Endospore over Time. *Astrobiology at NASA, Life in the Universe*, [Online]. Available from: <https://astrobiology.nasa.gov/news/surviving-as-an-endospore-over-time/>

Grum-Grzhimaylo AA, Georgieva ML, Bondarenko SA, Debets AJM, Bilanenko EN. 2016. On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Diversity* 76(1):27–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-015-0320-2>

Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(11):5753–5798. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>

Hall TA. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

Hamed J, Poorinmohammad N, Wink J. 2017. The Role of Actinobacteria in Biotechnology. In: *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, Wink J, Mohammadipanah F, Hamed J (eds.). Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp. 269–328. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1_10

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):9.

Hanafy AM, Al-Mutairi AA, Al-Reedy RM, Al-Garni SM. 2016. Phylogenetic affiliations of *Bacillus amyloliquefaciens* isolates produced by a bacteriocin-like substance in goat milk. *Journal of Taibah University for Science* 10(4):631–641. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2016.02.007>

Harirchi S, Sar T, Ramezani M, Aliyu H, Etemadifar Z, Nojoumi SA, Yazdian F, Awasthi MK, Taherzadeh MJ. 2022. Bacillales: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms* 10(12):2355. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10122355>

Hatcher NN, Moon S. 2014. Partial Characterization of a Novel Bacteriocin from *Bacillus cereus* GS1, a Soil Isolate. *Journal of the Kentucky Academy of Science* 75(1):37–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.3101/kyac-75-01-37-46.1>

Haynes M. 2008. Metagenomics. In: *Encyclopedia of Ecology*, Faith B (ed). Elsevier, pp. 153–156. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63768-0.00933-1>

He Y, Caporaso JG, Jiang X-T, Sheng H-F, Huse SM, Rideout JR, Edgar RC, Kopylova E, Walters WA, Knight R, Zhou H-W. 2015. Stability of operational taxonomic units: an important but neglected property for analyzing microbial diversity. *Microbiome* 3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0081-x>

Hegemann JD, Birkelbach J, Walesch S, Müller R. 2022. Current developments in antibiotic discovery. *EMBO reports* 24(1):e56184. Available from: <http://dx.doi.org/10.15252/embr.202256184>

Hill MO. 1973. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54(2):427–432. Available from: <http://dx.doi.org/10.2307/1934352>

Horikoshi K, Iida S. 1958. Lysis of fungal mycelia by bacterial enzymes. *Nature* 181(4613):917-918. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/181917a0>

Horikoshi K. 2016. *Extremophiles, Where It All Began*. Springer: Tokyo, pp. 53-78. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55408-0>

Hsieh TC, Ma KH, Chao A. 2016. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7(12):1451-1456. Available from: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>

Huang L, Wu T. 2018. Novel neural network application for bacterial colony classification. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 15(22). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12976-018-0093-x>

Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, Butterfield CN, Hermsdorf AW, Amano Y, Ise K, Suzuki Y, Dudek N, Relman DA, Finstad KM, Amundson

R, Thomas BC, Banfield JF. 2016. A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1(5):16048. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>

Hui ML-Y, Tan LT-H, Letchumanan V, He Y-W, Fang C-M, Chan K-G, Law JW-F, Lee L-H. 2021. The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiotics* 10(6):682. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10060682>

Hutcheson, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology* 29:151-154.

Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* 51:72-80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

Idris H, Goodfellow M, Sanderson R, Asenjo JA, Bull AT. 2017. Actinobacterial Rare Biospheres and Dark Matter Revealed in Habitats of the Chilean Atacama Desert. *Scientific Reports* 7:8373. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08937-4>

Irshad A, Ahmad I, Kim SB. 2014. Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 45(2):563-71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822014005000050>

Irwin JA. 2020. Overview of extremophiles and their food and medical applications. In: *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, Salwan R and Sharma V (eds). Academic Press: India, pp. 65-87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-818322-9.00006-x>

Jacob JH, Hussein EI, Shakhathreh MAK, Cornelison CT. 2017. Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *MicrobiologyOpen* 6(5):e00500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.500>

Jeyaram K, Romi W, Singh TA, Adewumi GA, Basanti K, Oguntoyinbo FA. 2011. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance.

Journal of Microbiological Methods 87(2):161–164. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.08.011>

Jiang Y, Li Q, Chen X, Jiang C. 2016. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. In: Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications, Dhanasekaran D, Jiang Y (eds.). InTech:London, UK, pp. 39–57.

Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, Ramón-Pardo P, Melano RG. 2019. Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. Revista Panamericana de Salud Pública 43:e65. Available from: <http://dx.doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>

Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong B-Y, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nature Communications 10:5029. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

Joshi A, Thite S, Karodi P, Joseph N, Lodha T. Alkalihalobacterium elongatum gen. nov. sp. nov.: An Antibiotic-Producing Bacterium Isolated From Lonar Lake and Reclassification of the Genus *Alkalihalobacillus* Into Seven Novel Genera. 2021. Frontiers in Microbiology 12:722369. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.722369>

Jost L. 2006. Entropy and diversity. Oikos 113(2):363–375. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>

Kaito C, Yoshikai H, Wakamatsu A, Miyashita A, Matsumoto Y, Fujiyuki T, Kato M, Ogura Y, Hayashi T, Isogai T, Sekimizu K. 2020. Non-pathogenic *Escherichia coli* acquires virulence by mutating a growth-essential LPS transporter. Public Library of Science Pathogens 16(4):e1008469. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008469>

Kämpfer P. 2012. Genus I. *Streptomyces*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Five The Actinobacteria, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME,

Suzuki K-i, Ludwig W, Whitman EB (eds.). Springer Science+Business Media: Athens, USA, pp. 1455-1767.

Kelly KL. 1964. Inter-society color council-national bureau of standards color-name charts illustrated with centroid colors. US Government Printing Office: Washington, DC.

Keshri J, Mishra A, Jha B. 2013. Microbial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics. *Microbiological Research* 168(3):165–173. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.09.005>

Khodamoradi S, Hahnke RL, Mast Y, Schumann P, Kämpfer P, Steinert M, Rückert C, Surup F, Rohde M, Wink J. 2021. *Streptomonospora litoralis* sp. nov., a halophilic thiopeptides producer isolated from sand collected at Cuxhaven beach. *Antonie van Leeuwenhoek* 114(10):1483–1496. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-021-01609-4>

Kirk Harris J, Gregory Caporaso J, Walker JJ, Spear JR, Gold NJ, Robertson CE, Hugenholtz P, Goodrich J, McDonald D, Knights D, Marshall P, Tufo H, Knight R, Pace NR. 2012. Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *The ISME Journal* 7(1):50–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.79>

Köberl M, Ramadan EM, Adam M, Cardinale M, Hallmann J, Heuer H, Smalla K, Berg G. 2013. *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad-spectrum antagonists against soilborne pathogens from arid areas in Egypt. *FEMS Microbiology Letters* 342(2):168-78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12089>

Kodzius R, Gojobori T. 2015. Marine metagenomics as a source for bioprospecting. *Marine Genomics* 24(1):21-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2015.07.001>

Kořwzan B, Adamiak W, Rybak J. 2011. *Sanitary Biology*. Printpap: Wrocław, Poland, pp. 4-13.

Kovaleva J, Degener JE, van der Mei HC. 2014. *Methylobacterium* and Its Role in Health Care-Associated Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 52(5):1317–1321. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03561-13>

Kumar M, Sarma DK, Shubham S, Kumawat M, Verma V, Nina PB, JP D, Kumar S, Singh B, Tiwari RR. 2021. Futuristic Non-antibiotic Therapies to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology* 12:609459. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.609459>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547–1549. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Kumar V, Bharti A, Gusain O, Bisht GS. 2011. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* without use of any chemical fixatives. *Scanning* 33(6):446–449. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/sca.20261>

Kurata A, Yamaguchi T, Kira M, Kishimoto N. 2019. Characterization and heterologous expression of an antimicrobial peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 33(1):886–893. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2019.1627246>

Lacombe-Harvey MÈ, Brzezinski R, & Beaulieu C. 2018. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(17):7219–7230. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9149-4>

Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. 2015. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 28(1):208–236. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00110-14>

Lajis AFB. 2020. Biomanufacturing process for the production of bacteriocins from Bacillaceae family. *Bioresources and Bioprocessing* 7:8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40643-020-0295-z>

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.). John Wiley & Sons: New York, NY, pp. 115-147.

Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78:399–405. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1010287600557>

Lechevalier MP. 1976. The taxonomy of the genus *Nocardia*: Some light at the end of the tunnel? In: *The Biology of the Nocardiae*, Goodfellow M, Brownell GH, Serrano JA (eds.). Academic Press:London, pp. 1–38.

Leon CG, Moraga R, Valenzuela C, Gugliandolo C, Lo Giudice A, Papale M, Vilo C, Dong Q, Smith CT, Rossello-Mora R, Yañez J, Campos VL. 2018. Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). Smidt H, editor. *Public Library of Science One* 13(5):e0195080. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0195080>

Letunic I, Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* [Internet]. Oxford University Press (OUP); Apr 22;49(W1):W293–W296. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab301>

Li Q, Chen X, Jiang Y, Jiang C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dhanasekaran D, Jiang Y (eds.). InTech. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/61461>

Liu J-H, Wang Y-X, Zhang X-X, Wang Z-G, Chen Y-G, Wen M-L, Xu L-H, Peng Q, Cui X-L. 2010. *Salinarimonas rosea* gen. nov., sp. nov., a new member of the α -2 subgroup of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(1):55–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.006981-0>

Lluka T, Stokes JM. 2022. Antibiotic discovery in the artificial intelligence era. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1519(1):74–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.14930>

Lo Grasso L, Martino DC, Alduina R. 2016. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*,

Dhanasekaran D and Jiang Y (eds). IntechOpen: Italy, pp. 96-112. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/61525>

Locey KJ, Lennon JT. 2016. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(21):5970–5975. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1521291113>

López Aperador C, Bosh Benitez-Parodi E, Díaz N, Chamorro Buchelli I, Guerra Rodriguez R, Auyanet Saavedra I, Toledo González A, Lago MM, García C. 2016. Peritonitis por *Shewanella putrefaciens*: a propósito de un caso. *Nefrología* 36(4):444–445. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.01.005>

López H. 2020. Agoniza la laguna Churince. *El Diario de Coahuila*, [Online]. Available from: <https://eldiariodecoahuila.com.mx/2020/07/24/agoniza-la-laguna-churince/>

Loreau M. 2010. The challenges of biodiversity science. In: *Excellence in Ecology*, Kinne O (ed). International Ecology Institute: Lüneburg, pp. 19-21.

Maayer PD, Aliyu H, Cowan DA. 2019. Reorganising the order Bacillales through phylogenomics. *Systematic and Applied Microbiology* 42(2):178–189. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.007>

Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, Madhusoodanan N, Kolesnikov A, Lopez R. 2022. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 *Nucleic Acids Research* 50(W1):W276-W279. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkac240>

Maiti PK, Mandal S. 2019. Majority of Actinobacterial Strains Isolated from Kashmir Himalaya Soil Are Rich Source of Antimicrobials and Industrially Important Biomolecules. *Advances in Microbiology* 9(3):220–238. Available from: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2019.93016>

Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. 2015. Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum* 3(2):TBS-0017-2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013>

Márquez MC, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2011. Halophilic and Haloalkaliphilic, Aerobic Endospore-forming Bacteria in Soil. In: Endospore-forming Soil Bacteria, Logan N, Vos P (eds). Springer: Berlin Heidelberg, pp. 309–339. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19577-8_16

Matusiak DM. 2016. Radiotolerant microorganisms – characterization of selected species and their potential usage. *Journal of Advances in Microbiology Research* 55(2):182-194. Available from: https://www.researchgate.net/publication/348446801_Radiotolerant_microorganisms_-_characterization_of_selected_species_and_their_potential_usage

McGinnis S, Madden TL. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32(Web Server):W20–W25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh435>

McIntosh RP. 1967. An Index of Diversity and the Relation of Certain Concepts to Diversity. *Ecology* 48(3):392–404. Available from: <http://dx.doi.org/10.2307/1932674>

McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. 2012. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11(1):33–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2921>

Medina-Chávez N-O, Viladomat-Jasso M, Zarza E, Islas-Robles A, Valdivia-Anistro J, Thalasso-Siret F, Eguiarte LE, Olmedo-Álvarez G, Souza V, De la Torre-Zavala S. 2023. A Transiently Hypersaline Microbial Mat Harbors a Diverse and Stable Archaeal Community in the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico. *Astrobiology* ahead of print. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ast.2021.0047>

Megrian D, Taib N, Jaffe AL, Banfield JF, Gribaldo S. 2022. Ancient origin and constrained evolution of the division and cell wall gene cluster in Bacteria. *Nature Microbiology* 7(12):2114–2127. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-022-01257-y>

Méheust R, Burstein D, Castelle CJ, Banfield JF. 2019. The distinction of CPR bacteria from other bacteria based on protein family content. *Nature Communications* 10:4173. Available from:

Merino N, Aronson HS, Bojanova DP, Feyhl-Buska J, Wong ML, Zhang S, Giovannelli D. 2019. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology* 10:780. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>

Metz M, Shlaes DM. 2014. Eight more ways to deal with antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(8):4253-6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12171-z>

Moore JC. 2013. Diversity, Taxonomic versus Functional. In: *Encyclopedia of Biodiversity*, Levin SA (ed). Elsevier: Amsterdam, pp. 648-656.

Müller R, Wink J. 2014. Future potential for anti-infectives from bacteria – How to exploit biodiversity and genomic potential. *International Journal of Medical Microbiology* 304(1):3–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.09.004>

Muñoz-Peña C, Ocaña-Cano MJ, Amores-Antequera C, Cantudo-Muñoz P. 2016. Infección cutánea por *Gordonia araii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 34(10):685–686. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.006>

Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Kashef Hamadani BH, Kumaran EAP, McManigal B, Achalapong S, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Babin F-X, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Berkley JA, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalheiro C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Clotaire Donatien R, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, De Luca M, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Duong Bich T, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garcia C, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Hsia Y, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Jenney AWJ, Khorana M, Khusuwan S, Kissoon N, Kobeissi E, Kostyanev T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Lim K, Limmathurotsakul

D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Manoharan A, Marks F, May J, Mayxay M, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Musila LA, Mussi-Pinhata MM, Naidu RN, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Ochoa TJ, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Ounchanum P, Pak GD, Paredes JL, Peleg AY, Perrone C, Phe T, Phommasone K, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Rattanaovong S, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rosenthal VD, Rudd KE, Russell N, Sader HS, Saengchan W, Schnall J, Scott JAG, Seekaew S, Sharland M, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Simpson AJ, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Tigoi C, Turner C, Turner P, van Doorn HR, Velaphi S, Vongpradith A, Vongsouvath M, Vu H, Walsh T, Walson JL, Waner S, Wangrangsimakul T, Wannapini P, Wozniak T, Young Sharma TEMW, Yu KC, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 399(10325):629–655. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)

Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, Hays JP, Mohsen Y, Adukkadukkam S, Awuah WA, Jose RAM, Sylvia N, Nansubuga EP, Tilocca B, Roncada P, Roson-Calero N, Moreno-Morales J, Amin R, Kumar BK, Kumar A, Toufik A-R, Zaw TN, Akinwotu OO, Satyaseela MP, van Dongen MBM. 2022. Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics* 11(2):200. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics11020200>

Newman DJ, Cragg GM. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* 83(3):770–803. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

Nimonkar YS, Godambe T, Kulkarni A, Patel T, Paul D, Paul D, Rale V, Prakash O. 2022. Oligotrophy vs. copiotrophy in an alkaline and saline habitat of Lonar Lake. *Frontiers in Microbiology* 4(13):939984. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.939984>

Nouioui I, Carro L, García-López M, Meier-Kolthoff JP, Woyke T, Kyrpides NC, Pukall R, Klenk H-P, Goodfellow M, Göker M. 2018. Genome-Based Taxonomic Classification of the

Phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology* 9:2007. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>

Oren A, Garrity GM. 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(10):005056. Available from: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>

Ortenberg E, Telsch B. 2003. Taste and odour problems in potable water. In: *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Mara D and Horan N (eds). Elsevier: Israel, pp. 777-793. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012470100-7/50043-1>

Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(11):5607–5612. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>

Patel S, Gupta RS. 2020. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(1):406–438. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>

Pérez Ortega R. 2020. Pools in the Mexican desert are a window into Earth's early life. *Science*, [Online]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.abd5785>

Pielou EC. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 13:131–144. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)

Pielou EC. 1969. *An introduction to mathematical ecology*. Wiley-Inter-science: New York, USA, pp. 200-210.

Poch T. 2018. Estromatolitos modernos del Salar de Atacama. Flickr, [Online]. Available from: <https://www.flickr.com/photos/tpochv/27375346637>

Poindexter JS. 2009. Low-Nutrient Environments. In: Encyclopedia of Microbiology (Third Edition), Schaechter M (ed). Academic Press: San Diego CA, pp. 240-257. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00284-4>

Poretzky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. 2014. Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. Public Library of Science (PLoS) 9(4):e93827. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>

Qamer S, Sandoe JAT, Kerr KG. 2003. Use of Colony Morphology To Distinguish Different Enterococcal Strains and Species in Mixed Culture from Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology 41(6):2644–2646. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.6.2644-2646.2003>

Qin S, Li W-J, Dastager SG, Hozzein WN. 2016. Editorial: Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles, and Environmental Adaptations. Frontiers in Microbiology 7:1415. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00944>

Qin Y, Wang Y, He Y, Zhang Y, She Q, Chai Y, Li P, Shang Q. 2019. Characterization of Subtilin L-Q11, a Novel Class I Bacteriocin Synthesized by *Bacillus subtilis* L-Q11 Isolated From Orchard Soil. Frontiers in Microbiology 10:484. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00484>

Qiu D, Ruan J, Huang Y. 2008. Selective Isolation and Rapid Identification of Members of the Genus *Micromonospora*. Applied and Environmental Microbiology 74(17):5593–5597. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00303-08>

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 41(D1):D590–D596. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Rampelotto PH. 2013. Extremophiles and Extreme Environments. Life 3:482-485. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/life3030482>

Rateb ME, Houssen WE, Arnold M, Abdelrahman MH, Deng H, Harrison WTA, Okoro CK, Asenjo JA, Andrews BA, Ferguson G, Bull AT, Goodfellow M, Ebel R, Jaspars M. 2011. Chaxamycins A–D, Bioactive Ansamycins from a Hyper-arid Desert *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products* 74(6):1491–1499. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/np200320u>

Rice LB. 2008. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases* 197(8):1079–1081. Available from: <http://dx.doi.org/10.1086/533452>

Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499(7459):431–437. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature12352>

Rodrigues CJC, de Carvalho CCCR. 2022. Cultivating marine bacteria under laboratory conditions: Overcoming the “unculturable” dogma. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10:964589. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.964589>

Rodríguez-Torres DM, Islas-Robles Á, Gómez-Lunar Z, Delaye L, Hernández-González I, Souza V, Travisano M, Olmedo-Álvarez G. 2017. Phenotypic Microdiversity and Phylogenetic Signal Analysis of Traits Related to Social Interaction in *Bacillus* spp. from Sediment Communities. *Frontiers in Microbiology* 8:29. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00029>

Rothschild LJ, Mancinelli RL. 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409:1092-1101. Available from: <https://doi.org/10.1038/35059215>

Runnegar B. 1987. Rates and modes of evolution in the Mollusca. In: Rates of evolution, Campbell KWS, Day MF (eds). Allen & Unwin: London, UK, pp. 39-60.

Salazar-Marroquín EL, Galán-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-López MÁ, Pereyra-Alfárez B. 2016. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and

potential applications. *Reviews in Medical Microbiology* 27(3):95–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/mrm.0000000000000076>

Sanders HL. 1968. Marine Benthic Diversity: A Comparative Study. *The American Naturalist* 102(925):243-282. Available from: <https://www.jstor.org/stable/2459027>

Sandoval Villalbazo A. 2016. El origen de la vida en la Tierra: nuevos paradigmas. Ibero, [Online]. Available from: <https://ibero.mx/prensa/el-origen-de-la-vida-en-la-tierra-nuevos-paradigmas>

Santajit S, Indrawattana N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Research International* 2016:2475067. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2475067>

Sarma J, Sengupta A, Laskar MK, Sengupta S, Tenguria S, Kumar A. 2023. Microbial adaptations in extreme environmental conditions. In: *Bacterial Survival in the Hostile Environment*, Kumar A and Tenguria S (eds). Academic Press: India, pp. 193-206. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91806-0.00007-2>

Schneider YK. 2021. Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics* 10(7):842. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10070842>

Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, McVeigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)* 2020:baaa062. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/database/baaa062>

Schwaiger K, Hölzel C, Mayer M, Bauer J. 2010. Notes on the almost unknown genus *Jeotgalicoccus*. *Letters in Applied Microbiology* 50(4):441–444. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2010.02811.x>

Seong CN, Choi JH, Baik KS. 2001. An improved selective isolation of rare Actinomycetes from forest soil. *The Journal of Microbiology* 39(1):17–23.

Shannon CE. 1948. A Mathematical Theory of Communication. Bell System Technical Journal 27(3):379–423. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>

Shen J-P, Chou C-F. 2016. Morphological plasticity of bacteria—Open questions. Biomicrofluidics 10(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4953660>

Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology 16(3):313–340. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>

Shu L-J, Yang Y-L. 2017. *Bacillus* Classification Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry—Effects of Culture Conditions. Scientific Reports 7:15546. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15808-5>

Sikora A, Zahra F. 2021. Nosocomial Infections. StatPearls [Online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/>

Simon S, Chai K, Drescher M, Chaves-Campos J. 2022. Bacteria associated with leaf-cutter ants drive natural antibiotic resistance in soil bacteria. Journal of Tropical Ecology 38(6):410–415. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/s0266467422000323>

Simpson EH. 1949. Measurement of Diversity. Nature 163(4148):688–688. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/163688a0>

Singh P, Jain K, Desai C, Tiwari O, Madamwar D. 2018. Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment. In: Microbial Diversity in the Genomic Era, Das S and Dash H (eds). Academic Press: Chennai, pp. 323-332. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00018-6>

Somsap O-a, Bangrak P, Bhoopong P, Lertcanawanichakul M. 2015. Antibacterial Activity and Purification of Bacteriocin Produced by *Brevibacillus laterosporus* SA14. Walailak Journal of Science and Technology 13(1):55–65. Available from: <https://wjst.wu.ac.th/index.php/wjst/article/view/1345>

Song CW, Rathnasingh C, Park JM, Lee J, Song H. 2018. Isolation and Evaluation of *Bacillus* Strains for Industrial Production of 2,3-Butanediol. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(3):409–417. Available from: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1710.10038>

Sorokin DY, Tourova TP, Abbas B, Suhacheva MV, Muyzer G. 2012. *Desulfonatronovibrio halophilus* sp. nov., a novel moderately halophilic sulfate-reducing bacterium from hypersaline chloride–sulfate lakes in Central Asia. *Extremophiles* 16:411–417. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-012-0440-5>

Sousa AM, Machado I, Pereira MO. 2011. Phenotypic switching: an opportunity to bacteria thrive. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, Mendez-Vilas A (ed.). Formatex: Braga, pp. 252-263. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/55621847.pdf>

Souza V, Eguiarte LE, Siefert J, Elser JJ. 2008. Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nature Reviews Microbiology* 6(7):559-564. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1917>

Souza V, Escalante A, Espinoza L, Valera A. 2004. Cuatro Ciénegas, un laboratorio natural de astrobiología. *Ciencias* 75:4-12. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/644/64407502.pdf>

Souza V, Espinosa-Asuar L, Escalante AE, Eguiarte LE, Farmer J, Forney L, Lloret L, Rodríguez-Martínez JM, Soberón X, Dirzo R, Elser JJ. 2006. An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(17):6565–6570. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601434103>

Souza V, Moreno-Letelier A, Travisano M, Alcaraz LD, Olmedo G, Eguiarte LE. 2018. The lost world of Cuatro Ciénegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis. *Elife* 7:e38278. Available from: <http://dx.doi.org/10.7554/elife.38278>

Souza V, Siefert JL, Escalante AE, Elser JJ, Eguiarte LE. 2012. The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: an astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology* 12(7):641-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ast.2011.0675>

Stackebrandt E, Liesack W. 1993. Nucleic acids and classification. In: Handbook of new bacterial systematics, Goodfellow M, O'Donnell AG (eds.). Academic Press: London, England, pp. 152-189.

Stirling A. 2007. A general framework for analysing diversity in science, technology and society. *Journal of The Royal Society Interface* 4(15):707–719. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2007.0213>

Subramani R, Sipkema D. 2019. Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine Drugs* 17(5):249. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/md17050249>

Suhartatik N, Nurjanah M, Kuswanto KR. 2018. Isolation and Identification of Osmophilic Yeast from Unripe Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.). *Indonesian Journal of Agricultural Research* 1(3):269-279. Available from: <http://dx.doi.org/10.32734/injar.v1i3.507>

Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. 2012. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 25(3):450-70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.05041-11>

Tasaki S, Nakayama M, Shoji W. 2017. Self-organization of bacterial communities against environmental pH variation: Controlled chemotactic motility arranges cell population structures in biofilms. *Public Library of Science One* 12(3):e0173195. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0173195>

Tena D, González-Praetorius A, Gimeno C, Teresa Pérez-Pomata M, Bisquert J. 2007. Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25(4):235–241. Available from: <http://dx.doi.org/10.1157/13100463>

Terreni M, Tacconi M, Pregnolato M. 2021. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules* 26(9):2671. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26092671>

Tilman D, Isbell F, Cowles JM. 2014. Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. *Annual Reviews* 45(1):471–493. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091917>

Trenozhnikova L, Azizan A. 2018. Discovery of Actinomycetes from Extreme Environments with Potential to Produce Novel Antibiotics. *Central Asian Journal of Global Health* 7(1):337. Available from: <http://dx.doi.org/10.5195/cajgh.2018.337>

Tronolone H, Gardner JM, Sundstrom JF, Jiranek V, Oliver SG, Binder BJ. 2018. TAMMiCol: Tool for analysis of the morphology of microbial colonies. *Public Library of Science Computational Biology* 14(12):e1006629. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006629>

Tsurumaki M, Saito M, Tomita M, Kanai A. 2022. Features of smaller ribosomes in candidate phyla radiation (CPR) bacteria revealed with a molecular evolutionary analysis. *RNA* 28(8):1041-1057. Available from: <http://dx.doi.org/10.1261/rna.079103.122>

Unterlass MM. 2017. Geomimetics and Extreme Biomimetics Inspired by Hydrothermal Systems—What Can We Learn from Nature for Materials Synthesis? *Biomimetics* 2(8):1-19. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomimetics2020008>

van Teeseling MCF, de Pedro MA, Cava F. 2017. Determinants of Bacterial Morphology: From Fundamentals to Possibilities for Antimicrobial Targeting. *Frontiers in Microbiology* 8:1264. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>

Viladomat M, García-Ulloa M, Zapata-Peñasco I, Eguiarte LE, Souza V. 2022. Metagenomic insight into taxonomic composition, environmental filtering, and functional redundancy for shaping worldwide modern microbial mats. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/2022.08.09.503407>

Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K, Whitman WB (eds.). 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media: New York, USA, pp. 21-128. Available from:

<https://books.google.com.mx/books?id=0-VqgLiCPFcC&lpg=PR1&ots=kIEfDYHp8v&lr&hl=es&pg=PR11#v=onepage&q&f=false>

Weeraphan T, Somphong A, Poengsungnoen V, Buaruang K, Harunari E, Igarashi Y, Tanasupawat S, Phongsopitanun W. 2023. Bacterial microbiome in tropical lichens and the effect of the isolation method on culturable lichen-derived actinobacteria. *Scientific Reports* 13:5483. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-32759-2>

Wei H, Peng C, Yang B, Song H, Li Q, Jiang L, Wei G, Wang K, Wang H, Liu S, Liu X, Chen D, Li Y, Wang M. 2018. Contrasting Soil Bacterial Community, Diversity, and Function in Two Forests in China. *Frontiers in Microbiology* 31(9):1693. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01693>

Witwinowski J, Sartori-Rupp A, Taib N, Pende N, Tham TN, Poppleton D, Ghigo J-M, Beloin C, Gribaldo S. 2022. An ancient divide in outer membrane tethering systems in bacteria suggests a mechanism for the diderm-to-monoderm transition. *Nature Microbiology* 7(3):411–422. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-022-01066-3>

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(12):4576–4579. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>

World Health Organization [WHO]. 2017a. Guidelines for Drinking-water Quality: Fourth Edition Incorporating the First Addendum. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Geneva, pp. 468-475. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>

World Health Organization [WHO]. 2017b. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News, [Online]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

World Health Organization [WHO]. 2017c. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including

tuberculosis. Publications, [Online]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>

Xie F, Pathom-aree W. 2021. Actinobacteria From Desert: Diversity and Biotechnological Applications. *Frontiers in Microbiology* 12:765531. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.765531>

Xiong L, Cao Y, Cooper R, Rappel W-J, Hasty J, Tsimring L. 2020. Flower-like patterns in multi-species bacterial colonies. *eLife* 9:e48885. Available from: <http://dx.doi.org/10.7554/elife.48885>

Yang S-J, Kang I, Cho J-C. 2015. Expansion of Cultured Bacterial Diversity by Large-Scale Dilution-to-Extinction Culturing from a Single Seawater Sample. *Microbial Ecology* 71(1):29–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0695-3>

Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12(9):635–645. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>

Youssef NH, Elshahed MS. 2008. Species richness in soil bacterial communities: A proposed approach to overcome sample size bias. *Journal of Microbiological Methods* 75(1):86–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.009>

Zhao F, Feng Y, Chen R, Zhang J, Lin X. 2015. *Lysinibacillus alkaliphilus* sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium, and emended description of genus *Lysinibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(8):2426–2431. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.000280>

Zhu D, Adebisi WA, Ahmad F, Sethupathy S, Danso B, Sun J. 2020. Recent Development of Extremophilic Bacteria and Their Application in Biorefinery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:483. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00483>

Zhu H, Swierstra J, Wu C, Girard G, Choi YH, van Wamel W, Sandiford SK, van Wezel GP. 2014. Eliciting antibiotics active against the ESKAPE pathogens in a collection of

actinomycetes isolated from mountain soils. *Microbiology (Reading)* 160(Pt 8):1714-1725.
Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.078295-0>

Zothanpuia, Passari AK, Leo VV, Chandra P, Kumar B, Nayak C, Hashem A, Abd_Allah EF, Alqarawi AA, Singh BP. 2018. Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. *Microbial Cell Factories* 17(68). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-0912-0>

12. ANEXOS

Anexo 1. Fenotipos PA

Tabla 13. Fenotipos observados en las cepas bacterianas aisladas de la Poza Azul (octubre 2020).

Fenotipo	Forma	Elevación	Borde	Color	Cant.
M1	Circular	Convexa	Redondeado	Amarillo colza	2
M2	Circular	Convexa	Redondeado	Amarillo de zinc	2
M3	Circular	Convexa	Redondeado	Amarillo melón	1
M4	Circular	Convexa	Redondeado	Amarillo naranja	1
M5	Circular	Convexa	Redondeado	Amarillo pastel	1
M6	Circular	Convexa	Redondeado	Beige verdoso	1
M7	Circular	Convexa	Redondeado	Blanco perla	1
M8	Circular	Convexa	Redondeado	Gris guijarro	1
M9	Circular	Convexa	Redondeado	Marfil	1
M10	Circular	Convexa	Redondeado	Marfil claro	3
M11	Circular	Convexa	Redondeado	Naranja brillante	1
M12	Circular	Convexa	Redondeado	Naranja pálido	4
M13	Circular	Convexa	Redondeado	Naranja tráfico	2
M14	Circular	Convexa	Redondeado	Rojo beige	1
M15	Circular	Convexa	Redondeado	Rojo claro anaranjado	3
M16	Circular	Convexa	Redondeado	Verde hoja	1
M17	Circular	Convexa	Rizoide	Amarillo pastel	1
M18	Circular	Papilada	Ondulado	Marfil claro	1
M19	Circular	Papilada	Redondeado	Marfil claro	1
M20	Circular	Papilada	Redondeado	Gris piedra	1
M21	Circular	Papilada	Redondeado	Naranja brillante	1
M22	Circular	Plana	Filamentoso	Blanco perla	1
M23	Circular	Plana	Ondulado	Marfil claro	1
M24	Circular	Plana	Redondeado	Amarillo azufre	1
M25	Circular	Plana	Redondeado	Marfil	2
M26	Circular	Plana	Redondeado	Marfil claro	1
M27	Circular	Plana	Redondeado	Amarillo avena	1

M28	Circular	Plana	Redondeado	Amarillo maíz	1
M29	Circular	Plana	Redondeado	Amarillo azafrán	1
M30	Circular	Plana	Rizoide	Oro perlado	1
M31	Circular	Planoconvexa	Filamentoso	Marfil claro	1
M32	Circular	Planoconvexa	Ondulado	Amarillo colza	1
M33	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Rojo viejo	1
M34	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo azafrán	3
M35	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo azufre	1
M36	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo colza	1
M37	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo de zinc	1
M38	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo melón	1
M39	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo señales	1
M40	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Blanco perla	1
M41	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Gris guijarro	1
M42	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Marfil	1
M43	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Marfil claro	7
M44	Circular	Planoconvexa	Redondeado	Naranja claro brillante	1
M45	Circular	Planoconvexa	Rizoide	Amarillo colza	1
M46	Circular	Umbilicada	Filamentoso	Blanco crema	1
M47	Filamentosa	Papilada	Filamentoso	Beige	2
M48	Filamentosa	Papilada	Filamentoso	Naranja perlado	1
M49	Filamentosa	Papilada	Filamentoso	Blanco perla	1
M50	Filamentosa	Papilada	Lobulado	Blanco crema	1
M51	Filamentosa	Papilada	Redondeado	Rojo fresa	1
M52	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Beige	1
M53	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Marfil claro	1
M54	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Blanco perla	1
M55	Filamentosa	Planoconvexa	Rizoide	Blanco perla	1
M56	Irregular	Convexa	Redondeado	Gris oliva	1
M57	Irregular	Convexa	Redondeado	Amarillo limón	1
M58	Irregular	Convexa	Redondeado	Marfil claro	1
M59	Irregular	Convexa	Redondeado	Gris guijarro	1
M60	Irregular	Convexa	Redondeado	Amarillo oro	2
M61	Irregular	Convexa	Redondeado	Rojo fresa	1

M62	Irregular	Papilada	Filamentoso	Naranja salmón	1
M63	Irregular	Papilada	Ondulado	Amarillo melón	1
M64	Irregular	Papilada	Ondulado	Amarillo retama	1
M65	Irregular	Papilada	Ondulado	Blanco perla	2
M66	Irregular	Papilada	Ondulado	Naranja pálido	1
M67	Irregular	Papilada	Redondeado	Marfil	1
M68	Irregular	Papilada	Redondeado	Amarillo melón	1
M69	Irregular	Papilada	Redondeado	Amarillo azafrán	1
M70	Irregular	Papilada	Rizoide	Marfil claro	1
M71	Irregular	Plana	Filamentoso	Marfil claro	1
M72	Irregular	Plana	Lobulado	Rojo beige	1
M73	Irregular	Plana	Lobulado	Blanco perla	2
M74	Irregular	Plana	Ondulado	Beige verdoso	2
M75	Irregular	Plana	Redondeado	Amarillo señales	2
M76	Irregular	Plana	Redondeado	Beige	4
M77	Irregular	Plana	Redondeado	Marfil claro	1
M78	Irregular	Plana	Rizoide	Amarillo de zinc	1
M79	Irregular	Plana	Rizoide	Rojo beige	1
M80	Irregular	Planoconvexa	Filamentoso	Marfil claro	1
M81	Irregular	Planoconvexa	Lobulado	Amarillo naranja	1
M82	Irregular	Planoconvexa	Lobulado	Amarillo colza	1
M83	Irregular	Planoconvexa	Ondulado	Amarillo sol	1
M84	Irregular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo señales	2
M85	Irregular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo avena	1
M86	Irregular	Planoconvexa	Redondeado	Amarillo melón	1
M87	Irregular	Planoconvexa	Redondeado	Gris oliva	1
M88	Irregular	Planoconvexa	Redondeado	Marfil claro	1
M89	Irregular	Planoconvexa	Rizoide	Amarillo azafrán	1
M90	Irregular	Umbilicada	Filamentoso	Blanco perla	1
M91	Rizoide	Papilada	Filamentoso	Rojo fresa	1
M92	Rizoide	Papilada	Filamentoso	Rosa claro	3
M93	Rizoide	Papilada	Filamentoso	Blanco perla	1

Anexo 2. Fenotipos con pretratamiento

Tabla 14. Fenotipos observados en los aislados PA en función de si pasaron por el pretratamiento de calor.

Pretratamiento	Fenotipos	Número total
Calor	M1, M4, M7, M11, M14, M16, M17, M19, M20, M22, M31, M32, M33, M37, M39, M48, M55, M56, M57, M59, M61, M64, M69, M81, M82, M83, M85, M86, M88, M89, M93	31
Directo	M3, M5, M6, M8, M9, M13, M18, M21, M23, M24, M25, M26, M27, M28, M29, M30, M35, M36, M38, M40, M41, M42, M43, M44, M45, M46, M47, M49, M50, M51, M52, M53, M54, M58, M62, M63, M65, M66, M67, M68, M70, M71, M72, M74, M77, M78, M79, M80, M87, M90, M91, M92	52
Ambos	M2, M10, M12, M15, M34, M60, M73, M75, M76, M84	10

Anexo 3. Fenotipos por punto

Tabla 15. Fenotipos de los aislados PA organizados por punto de muestreo, tratamiento y coincidencia taxonómica de GenBank.

Pdm	Pt	#	Fn	CBH	Clase	Phylum
PA1	Directo	PA-01-2020	M91	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-02-2020	M53	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-03-2020	M84	<i>Metabacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-04-2020	M86	<i>Metabacillus litoralis</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-05-2020	M33	<i>Paracraurococcus</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-07-2020	M35	<i>Arthrobacter tumbae</i>	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-08-2020	M43	-	-	-
	Directo	PA-10-2020	M42	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-11-2020	M3	<i>Kocuria</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-12-2020	M43	<i>Metabacillus litoralis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-13-2020	M12	<i>Paracoccus chinensis</i>	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
PA2	Directo	PA-14-2020	M23	<i>Bacillus endophyticus</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-15-2020	M92	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-16-2020	M25	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota

	Directo	PA-17-2020	M34	<i>Sutcliffeiella horikoshii</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-18-2020	M10	<i>Paracoccus</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-19-2020	M5	<i>Kocuria</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Calor	PA-20-2020	M19	<i>Brevibacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-21-2020	M31	<i>Priestia filamentosa</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-22-2020	M11	<i>Paracoccus chinensis</i>	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-23-2020	M52	<i>Virgibacillus marismortui</i>	Bacilli	Bacillota
PA3	Directo	PA-24-2020	M92	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-25-2020	M12	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-27-2020	M63	<i>Metabacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-28.1-2020	M74	<i>Bacillus aerius</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-28.2-2020	M65	<i>Bacillus stratosphericus</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-29.1-2020	M84	<i>Metabacillus litoralis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-29.2-2020	M67	<i>Metabacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-30-2020	M7	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Calor	PA-31-2020	M4	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-32-2020	M37	<i>Microbacterium</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
PA4	Directo	PA-34-2020	M92	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-36-2020	M43	<i>Cytobacillus firmus</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-37-2020	M74	<i>Metabacillus litoralis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-38-2020	M28	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-39-2020	M26	<i>Streptomyces abyssomicinicus</i>	Actinomycetes	Actinomycetota
	Calor	PA-40-2020	M88	-	-	-
	Calor	PA-41-2020	M12	-	-	-
	Calor	PA-42-2020	M10	<i>Paracoccus</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-43-2020	M81	-	-	-
PA5	Calor	PA-26-2020	M1	-	-	-
	Directo	PA-44-2020	M60	<i>Paracoccus hibisci</i>	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-45-2020	M29	<i>Paracoccus acridae</i>	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-46-2020	M15	<i>Kocuria</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-47-2020	M71	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-48-2020	M18	<i>Brevibacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-49-2020	M47	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-50-2020	M76	-	-	-
	Directo	PA-51.1-2020	M78	-	-	-
	Directo	PA-51.2-2020	M10	-	-	-
	Calor	PA-52-2020	M93	<i>Bacillus swezeyi</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-53-2020	M83	<i>Shewanella decolorationis</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-54-2020	M64	-	-	-
	Directo	PA-55-2020	M66	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-56-2020	M72	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-57-2020	M17	<i>Bacillus mesophilus</i>	Bacilli	Bacillota
PA6	Directo	PA-58-2020	M68	-	-	-
	Directo	PA-59-2020	M87	<i>Aeromonas veronii</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-60-2020	M25	<i>Rosellomorea aquimaris</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-61-2020	M47	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacilli	Bacillota

	Directo	PA-62-2020	M90	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-63-2020	M41	<i>Gordonia terrae</i>	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-64-2020	M8	<i>Williamsia muralis</i>	Actinomycetes	Actinomycetota
	Calor	PA-65-2020	M69	<i>Sutcliffiella horikoshii</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-66-2020	M48	-	-	-
	Calor	PA-67-2020	M56	<i>Peribacillus acanthi</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-68-2020	M89	<i>Metabacillus mangrovi</i>	Bacilli	Bacillota
PA7	Directo	PA-69-2020	M51	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-70-2020	M24	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-71-2020	M62	<i>Bacillus toyonensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-72-2020	M27	<i>Shewanella</i> sp.	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-73-2020	M45	<i>Sutcliffiella horikoshii</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-74-2020	M40	<i>Aeromonas veronii</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-75-2020	M73	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-76-2020	M59	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-79-2020	M22	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-80-2020	M1	-	-	-
	Calor	PA-81.1-2020	M85	<i>Lysinibacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-81.2-2020	M76	<i>Lysinibacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
Directo	PA-83-2020	M44	<i>Kocuria</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota	
PA8	Directo	PA-85-2020	M15	-	-	-
	Directo	PA-86-2020	M38	-	-	-
	Directo	PA-87-2020	M6	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-88-2020	M36	<i>Paracoccus</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-89-2020	M2	<i>Microbacterium</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-90-2020	M50	<i>Bacillus gaemokensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-91-1-2020	M14	<i>Microvirga</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-91-2-2020	M57	-	-	-
	Calor	PA-92-2020	M82	<i>Metabacillus idriensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-93-2020	M39	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-94-2020	M65	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-95-2020	M15	<i>Kocuria</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Calor	PA-97-2-2020	M20	-	-	-
Directo	PA-98-2020	M21	<i>Paracoccus marcusii</i>	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota	
PA9	Directo	PA-77.1-2020	M13	<i>Kocuria</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-77.2-2020	M13	-	-	-
	Directo	PA-78-2020	M43	<i>Metabacillus litoralis</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-84-2020	M75	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-100-2020	M77	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-101-2020	M49	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-102-2020	M79	<i>Bacillus haikouensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-103-2020	M46	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-104-2020	M75	<i>Bacillus coahuilensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-105-2020	M70	<i>Metabacillus litoralis</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-106-2020	M80	<i>Neobacillus niacini</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-107-2020	M58	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota

	Calor	PA-108-2020	M60	<i>Paracoccus</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-109-2020	M55	-	-	-
	Calor	PA-110-2020	M32	<i>Metabacillus idriensis</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-113-2020	M73	<i>Bacillus anthracis</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-114-2020	M2	-	-	-
	Calor	PA-115-2020	M76	<i>Rosellomorea aquimaris</i>	Bacilli	Bacillota
PA10	Directo	PA-116-2020	M76	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-117-2020	M30	<i>Shewanella decolorationis</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-118-2020	M54	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilli	Bacillota
	Directo	PA-119-2020	M43	-	-	-
	Directo	PA-120-2020	M43	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-121-2020	M43	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Gammaproteobacteria	Pseudomonadota
	Directo	PA-122-2020	M34	<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-123-2020	M16	<i>Streptomyces tabedae</i>	Actinomycetes	Actinomycetota
	Calor	PA-124-2020	M34	<i>Metabacillus mangrovi</i>	Bacilli	Bacillota
	Calor	PA-125-2020	M12	<i>Rhodococcus</i> sp.	Actinomycetes	Actinomycetota
	Directo	PA-128-2020	M9	<i>Paracoccus pueri</i>	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota
	Calor	PA-129-2020	M61	<i>Methylobacterium</i> sp.	Alphaproteobacteria	Pseudomonadota

#=número de aislamiento, Pt=pretratamiento, Fn=fenotipo, CBH=closest BLAST hit/coincidencia más cercana.

Anexo 4. Secuencias PA

Tabla 16. Datos completos de los aislados de PA y de las secuencias con las que encontraron coincidencia en la base de datos de NCBI.

#	Pt	Fn	pb	CBH	No. Acc.	% ID	Muestra	País
PA-01-2020	No	M91	1169	<i>Bacillus</i> sp.	KT316421.1	97.79%	Intestino de camello	China
PA-02-2020	No	M53	1195	<i>Bacillus cereus</i>	OP001382.1	96.80%	NA	China
PA-03-2020	H	M84	1202	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216116.1	97.25%	Salar	Portugal
PA-04-2020	H	M86	1196	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	97.36%	Agua marina	China
PA-05-2020	H	M33	967	<i>Paracraurococcus</i> sp.	MH547457.1	98.04%	NA	Corea del Sur
PA-07-2020	No	M35	1177	<i>Arthrobacter tumbae</i>	MK246881.1	97.40%	Agua marina	Antártica
PA-10-2020	No	M42	1104	<i>Bacillus</i> sp.	MG896909.1	85.38%	Sedimento	México
PA-11-2020	No	M3	1165	<i>Kocuria</i> sp.	JQ977414.1	97.38%	Rizósfera	China
PA-12-2020	No	M43	1151	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	98.48%	Agua marina	China
PA-13-2020	No	M12	1089	<i>Paracoccus chinensis</i>	LT853748.1	98.74%	Chimenea hidrotermal	Hungría
PA-14-2020	No	M23	1200	<i>Bacillus endophyticus</i>	KT153597.1	98.50%	Suelo rizosférico	India
PA-15-2020	No	M92	1193	<i>Bacillus</i> sp.	MT496942.1	97.26%	NA	México
PA-16-2020	No	M25	1176	<i>Bacillus</i> sp.	FJ188311.1	96.53%	NA	China
PA-17-2020	No	M34	1182	<i>Sutcliffeiella horikoshii</i>	OP055938.1	96.83%	Agua marina	India
PA-18-2020	No	M10	1170	<i>Paracoccus</i> sp.	FJ796075.1	96.21%	Agua marina	China
PA-19-2020	No	M5	1153	<i>Kocuria</i> sp.	MH935791.1	97.60%	Suelo	Venezuela
PA-20-2020	H	M19	1195	<i>Brevibacillus</i> sp.	KP795828.1	96.49%	Suelo árido	Arabia Saudita
PA-21-2020	H	M31	1156	<i>Priestia filamentosa</i>	OQ876691.1	97.01%	NA	China
PA-22-2020	H	M11	1050	<i>Paracoccus chinensis</i>	MT373637.1	97.63%	Estalactita	Hungría
PA-23-2020	No	M52	1174	<i>Virgibacillus marismortui</i>	MW642042.1	98.54%	Suelo	Egipto
PA-24-2020	No	M92	1107	<i>Bacillus</i> sp.	MT496942.1	95.89%	NA	México
PA-25-2020	No	M12	991	<i>Bacillus</i> sp.	MG896842.1	86.87%	Suelo	México
PA-27-2020	No	M63	1208	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216116.1	97.87%	Salar	Portugal
PA-28.1-2020	No	M74	1171	<i>Bacillus aerius</i>	KX388227.1	97.42%	Intestino de pez	India
PA-28.2-2020	No	M65	1202	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MG937687.1	97.09%	NA	Estados Unidos

PA-29.1-2020	No	M84	1191	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	97.90%	Agua marina	China
PA-29.2-2020	No	M67	841	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216105.1	97.43%	Salar	Portugal
PA-30-2020	H	M7	1190	<i>Arthrobacter</i> sp.	FJ719341.1	95.71%	Suelo	Australia
PA-31-2020	H	M4	956	<i>Bacillus</i> sp.	MG880929.1	86.46%	Agua de poza	México
PA-32-2020	H	M37	1183	<i>Microbacterium</i> sp.	OP442350.1	95.80%	Rizósfera	España
PA-34-2020	No	M92	1182	<i>Bacillus</i> sp.	ON520870.1	97.17%	NA	China
PA-36-2020	No	M43	1190	<i>Cytobacillus firmus</i>	LC019792.1	97.17%	Agua de lago	Indonesia
PA-37-2020	No	M74	1163	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	97.55%	Agua marina	China
PA-38-2020	No	M28	1112	<i>Bacillus</i> sp.	KF814116.1	96.62%	Salar	India
PA-39-2020	No	M26	1190	<i>Streptomyces abyssomicinicus</i>	LC495888.1	97.01%	Suelo	México
PA-42-2020	H	M10	1199	<i>Paracoccus</i> sp.	MH788988.1	96.65%	Cactus	India
PA-44-2020	No	M60	1163	<i>Paracoccus hibisci</i>	MZ674073.1	95.28%	Orquídea	China
PA-45-2020	No	M29	1178	<i>Paracoccus acridae</i>	MN004822.1	98.45%	Tormenta de polvo	India
PA-46-2020	No	M15	1190	<i>Kocuria</i> sp.	JX949816.1	96.17%	Glaciar	China
PA-47-2020	No	M71	1013	<i>Bacillus thuringiensis</i>	KT835652.1	97.78%	Alquitrán	Estados Unidos
PA-48-2020	No	M18	1209	<i>Brevibacillus</i> sp.	KP795828.1	97.95%	Suelo árido	Arabia Saudita
PA-49-2020	No	M47	1175	<i>Bacillus cereus</i>	EU161996.1	97.90%	Suelo de bosque	Taiwán
PA-52-2020	H	M93	1112	<i>Bacillus swezeyi</i>	MW642065.1	96.35%	Suelo	Egipto
PA-53-2020	H	M83	1181	<i>Shewanella decolorationis</i>	CP031775.3	97.66%	Lodo	China
PA-55-2020	No	M66	1190	<i>Bacillus</i> sp.	MZ957987.1	92.91%	NA	China
PA-56-2020	No	M72	1224	<i>Bacillus</i> sp.	KX019822.1	94.20%	Suelo	China
PA-57-2020	H	M17	1161	<i>Bacillus mesophilus</i>	OP741069.1	94.85%	NA	Corea del Sur
PA-59-2020	No	M87	876	<i>Aeromonas veronii</i>	KX828304.1	98.54%	Intestino de tilapia	Brasil
PA-60-2020	No	M25	1159	<i>Rosellomorea aquimaris</i>	LN881632.1	98.00%	Cueva	España
PA-61-2020	No	M47	1164	<i>Bacillus thuringiensis</i>	OQ216601.1	97.44%	NA	China
PA-62-2020	No	M90	1195	<i>Bacillus subtilis</i>	KT028686.1	97.09%	Rizósfera	India
PA-63-2020	No	M41	821	<i>Gordonia terrae</i>	LT978350.1	96.92%	Suelo	Italia
PA-64-2020	No	M8	1201	<i>Williamsia muralis</i>	AY986734.1	96.41%	Pulmón humano	España
PA-65-2020	H	M69	1158	<i>Sutcliffiella horikoshii</i>	MN179873.1	96.72%	Suelo contaminado	India
PA-67-2020	H	M56	910	<i>Peribacillus acanthi</i>	MK615770.1	98.47%	Rizósfera de acantácea	China
PA-68-2020	H	M89	1016	<i>Metabacillus mangrovi</i>	MZ950815.1	97.80%	Lodo marino	Corea del Sur
PA-69-2020	No	M51	1014	<i>Bacillus</i> sp.	FN555409.1	92.01%	Suelo	Alemania
PA-70-2020	No	M24	1078	<i>Arthrobacter</i> sp.	KY327809.1	95.67%	Agua con sedimento	México
PA-71-2020	No	M62	1197	<i>Bacillus toyonensis</i>	OP984165.1	96.15%	NA	China
PA-72-2020	No	M27	1194	<i>Shewanella</i> sp.	KF317755.1	97.39%	Agua de poza	México
PA-73-2020	No	M45	1094	<i>Sutcliffiella horikoshii</i>	MN179873.1	98.35%	Suelo contaminado	India
PA-74-2020	No	M40	1199	<i>Aeromonas veronii</i>	KJ396882.1	96.90%	Agua de río	Portugal
PA-75-2020	No	M73	1188	<i>Bacillus</i> sp.	OP989998.1	98.21%	Moras silvestres	China
PA-76-2020	H	M59	1157	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	MG208859.1	96.84%	Hígado de pez	China
PA-77.1-2020	No	M13	1182	<i>Kocuria</i> sp.	OQ300260.1	96.83%	Larvas	Chile
PA-78-2020	No	M43	1195	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	98.20%	Agua marina	China
PA-79-2020	H	M22	1155	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	MN689677.1	97.75%	Cuero cabelludo	India
PA-81.1-2020	H	M85	1187	<i>Lysinibacillus</i> sp.	ON520841.1	96.47%	NA	China
PA-81.2-2020	H	M76	1179	<i>Lysinibacillus</i> sp.	OQ221843.1	97.83%	Suelo contaminado	Francia
PA-83-2020	No	M44	1138	<i>Kocuria</i> sp.	MT921695.1	95.31%	Sistema hidrotermal	China
PA-84-2020	H	M75	1187	<i>Bacillus</i> sp.	FJ188311.1	96.99%	NA	China
PA-87-2020	No	M6	1183	<i>Arthrobacter</i> sp.	GU339256.1	94.37%	Suelo contaminado	India
PA-88-2020	No	M36	1200	<i>Paracoccus</i> sp.	MN822624.1	94.53%	Sedimento de lago	China
PA-89-2020	No	M2	1189	<i>Microbacterium</i> sp.	OP442346.1	96.52%	Rizósfera	España
PA-90-2020	No	M50	1181	<i>Bacillus gaemokensis</i>	MH260974.1	97.61%	Suelo de manglar	China
PA-91.1-2020	H	M14	1174	<i>Microvirga</i> sp.	OM884835.1	96.18%	NA	China
PA-92-2020	H	M82	1211	<i>Metabacillus idriensis</i>	MK240437.1	96.77%	Relave	China
PA-93-2020	H	M39	1175	<i>Bacillus</i> sp.	KX989347.1	96.12%	Sistema hidrotermal	China

PA-94-2020	No	M65	1000	<i>Bacillus</i> sp.	AJ717379.1	97.11%	Agua subterránea alcalina	Portugal
PA-95-2020	H	M15	1113	<i>Kocuria</i> sp.	MG254794.1	95.01%	NA	China
PA-98-2020	No	M21	978	<i>Paracoccus marcusii</i>	MT914235.1	95.58%	Chimenea hidrotermal	China
PA-100-2020	No	M77	1144	<i>Arthrobacter globiformis</i>	HF584930.1	95.46%	Raíz de vid	Italia
PA-101-2020	No	M49	1200	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MN704449.1	95.83%	Orégano	China
PA-102-2020	No	M79	1145	<i>Bacillus haikouensis</i>	MT305961.1	96.55%	Suelo industrial	España
PA-103-2020	No	M46	1170	<i>Bacillus</i> sp.	HQ699617.1	95.66%	Tabaco	China
PA-104-2020	No	M75	979	<i>Bacillus coahuilensis</i>	NR_115933.1	97.58%	Agua de poza	México
PA-105-2020	No	M70	1162	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	97.21%	Agua marina	China
PA-106-2020	No	M80	1216	<i>Neobacillus niacini</i>	MF177863.1	97.54%	Rizósfera de maragusano	China
PA-107-2020	No	M58	1210	<i>Arthrobacter</i> sp.	OK298777.1	95.69%	Rizósfera de cítrico	España
PA-108-2020	H	M60	1163	<i>Paracoccus</i> sp.	KC894855.1	97.29%	Suelo contaminado	China
PA-110-2020	H	M32	1183	<i>Metabacillus idriensis</i>	MT765172.1	98.07%	Suelo industrial	Hungría
PA-113-2020	H	M73	1188	<i>Bacillus anthracis</i>	KM261756.1	96.70%	Suelo de fuente termal	India
PA-115-2020	H	M76	1155	<i>Rosellomorea aquimaris</i>	KM355765.1	96.08%	Raíz de palma	Tunisia
PA-116-2020	No	M76	1112	<i>Bacillus</i> sp.	FJ751247.1	96.11%	Intestino de pepino de mar	China
PA-117-2020	No	M30	1171	<i>Shewanella decolorationis</i>	OP185338.1	95.75%	NA	China
PA-118-2020	No	M54	878	<i>Bacillus cereus</i>	MN227488.1	97.90%	Intestino de chinche	China
PA-120-2020	No	M43	1174	<i>Arthrobacter</i> sp.	HF954386.1	97.81%	Suelo	España
PA-121-2020	No	M43	1140	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	MN999989.1	97.70%	Roca	China
PA-122-2020	No	M34	1139	<i>Bacillus</i> sp.	MG896817.1	95.66%	Sedimento	México
PA-123-2020	H	M16	1191	<i>Streptomyces labedae</i>	MW558569.1	96.80%	Raíz de mangle	India
PA-124-2020	H	M34	1080	<i>Metabacillus mangrovi</i>	MZ950815.1	96.88%	Lodo marino	Corea del Sur
PA-125-2020	H	M12	1193	<i>Rhodococcus</i> sp.	MH681545.1	95.69%	Hoja de planta	China
PA-128-2020	No	M9	1191	<i>Paracoccus pueri</i>	MZ674074.1	97.10%	Orquídea	China
PA-129-2020	H	M61	1006	<i>Methylobacterium</i> sp.	EU360598.1	97.78%	Suelo de montaña	China

#=número de aislado, Pt=pretratamiento, Fn=fenotipo, pb=pares de bases, CBH=closest BLAST hit/coincidencia más cercana, No. Acc.=número de acceso en NCBI,%ID=porcentaje de identidad, NA=no aclarado.

Anexo 5. Secuencias AD

Tabla 17. Datos completos de los aislados de AD y de las secuencias con las que encontraron coincidencia en la base de datos de NCBI.

Secuencia	pb	CBH	No. Acc.	% ID	Muestra	País
AD_04_2017_1_p1775	894	<i>Bacillus safensis</i>	KT387597.1	96.10%	Sedimento alcalino	Polonia
AD_04_2017_10_p1775	896	<i>Bacillus alkalitelluris</i>	JF411278.1	99.33%	Álamo	China
AD_04_2017_101_p1775	888	<i>Virgibacillus marismortui</i>	KU194374.1	99.55%	Salar	México
AD_04_2017_102_p1775	948	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i>	MT125740.1	99.79%	NA	China
AD_04_2017_103_p1775	894	<i>Salinarimonas rosea</i>	NR_116487.1	98.43%	NA	China
AD_04_2017_104_p1775	889	<i>Rosellomorea</i> sp.	OQ927163.1	98.99%	Lago salado	China
AD_04_2017_105_p1775	903	<i>Bacillus</i> sp.	KF791524.1	99.78%	Orquídea	China
AD_04_2017_107_p1775	898	<i>Pontimonas salivibrio</i>	CP026923.1	98.89%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_109a_p1775	857	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461406.1	99.77%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_109b_p1775	904	<i>Bacillus</i> sp.	KY264972.1	100.00%	Suelo	China
AD_04_2017_11_p1775	868	<i>Bacillus safensis</i>	MN704393.1	100.00%	Orégano	China
AD_04_2017_110_p1775	858	<i>Cytobacillus luteolus</i>	MZ443834.1	98.98%	Microalga	China
AD_04_2017_111_p1775	887	<i>Virgibacillus marismortui</i>	KU194374.1	99.89%	Salar	México
AD_04_2017_112_p1775	930	<i>Metabacillus litoralis</i>	FJ188307.1	96.55%	Agua marina	China
AD_04_2017_113_p1775	882	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	MG264280.1	99.65%	Agua de poza	México

AD_04_2017_114_p1775	923	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i>	MN931378.1	99.53%	NA	China
AD_04_2017_115_p1775	914	<i>Virgibacillus marismortui</i>	MK873897.1	99.56%	Microbioma de alofita	Estados Unidos
AD_04_2017_117_p1775	917	<i>Halomonas</i> sp.	KC705340.1	99.67%	Lago hipersalino	Estados Unidos
AD_04_2017_118_p1775	877	<i>Marinobacter</i> sp.	MT457461.1	99.54%	Microalga	China
AD_04_2017_120_p1775	880	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461418.1	99.77%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_121_p1775	913	<i>Halomonas</i> sp.	KC705340.1	99.67%	Lago hipersalino	Estados Unidos
AD_04_2017_124_p1775	860	<i>Salirhabdus</i> sp.	LT934532.1	96.67%	Heces humanas	Francia
AD_04_2017_125_p1775	860	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461406.1	99.77%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_126_p1775	864	<i>Marinobacter</i> sp.	MT457461.1	99.65%	Microalga	China
AD_04_2017_127_p1775	880	<i>Bacillus</i> sp.	LN849690.1	99.77%	Sedimento hipersalino	Bahamas
AD_04_2017_128_p1775	885	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN756646.1	100.00%	Suelo	China
AD_04_2017_13_p1775	852	<i>Kocuria flava</i>	MH412993.1	99.52%	Sedimento	Australia
AD_04_2017_130_p1775	888	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	MG264280.1	99.65%	Agua de poza	México
AD_04_2017_131_p1775	852	<i>Bacillus</i> sp.	KX033820.1	99.53%	Lago salado	China
AD_04_2017_136_p1775	882	<i>Virgibacillus marismortui</i>	MK873897.1	99.77%	Microbioma de alofita	Estados Unidos
AD_04_2017_137_p1775	910	<i>Bacillus</i> sp.	KF791524.1	99.89%	Orquídea	China
AD_04_2017_138_p1775	821	<i>Bacillus</i> sp.	MK660034.1	99.88%	Hongos endófitos	China
AD_04_2017_14_p1775	859	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i>	MT125740.1	99.88%	NA	China
AD_04_2017_140_p1775	838	<i>Roseibium aggregatum</i>	MH881385.1	98.90%	Agua de lago	Ucrania
AD_04_2017_144_p1775	794	<i>Pseudomonas peli</i>	HQ848085.1	99.87%	Agua de río	China
AD_04_2017_147_p1775	922	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF317745.1	99.89%	Agua de poza	México
AD_04_2017_15_p1775	894	<i>Bacillus coreaensis</i>	OQ223398.1	99.06%	Suelo	India
AD_04_2017_16_p1775	863	<i>Rhizobium</i> sp.	JQ689943.1	99.30%	Agua marina	Corea del Sur
AD_04_2017_17_p1775	887	<i>Bacillus</i> sp.	MT496942.1	99.66%	NA	México
AD_04_2017_2_p1775	888	<i>Virgibacillus</i> sp.	MW429736.1	99.89%	Suelo salino	México
AD_04_2017_200_p1775	845	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461406.1	97.82%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_204_p1775	897	<i>Salinarimonas rosea</i>	NR_116487.1	98.09%	NA	China
AD_04_2017_210_p1775	827	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216116.1	98.90%	Salar	Portugal
AD_04_2017_212_p1775	888	<i>Metabacillus litoralis</i>	NR_043015.1	99.21%	Sedimento marino	Corea del Sur
AD_04_2017_219_p1775	767	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	MN685257.1	98.44%	Raiz de cebolla	Taiwán
AD_04_2017_220_p1775	817	<i>Bacillus</i> sp.	KY987152.1	99.27%	Suelo	China
AD_04_2017_223_p1775	812	<i>Nocardioides</i> sp.	MW570097.1	99.61%	Pelaje de murciélago	Estados Unidos
AD_04_2017_227_p1775	850	<i>Microvirga</i> sp.	MZ443700.1	98.54%	NA	India
AD_04_2017_229_p1775	837	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216116.1	99.64%	Salar	Portugal
AD_04_2017_232_p1775	844	<i>Bacillus coreaensis</i>	OQ223398.1	97.88%	Suelo	India
AD_04_2017_234_p1775	832	<i>Bacillus</i> sp.	MZ957987.1	98.55%	NA	China
AD_04_2017_235_p1775	823	<i>Micrococcus endophyticus</i>	OL514165.1	98.77%	NA	Irán
AD_04_2017_237_p1775	837	<i>Bacillus safensis</i>	MT501806.1	99.52%	Suelo salino	China
AD_04_2017_238a_p1775	882	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i>	MK346021.1	99.32%	Suelo salino	Kuwait
AD_04_2017_238b_p1775	859	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i>	MK346021.1	99.42%	Suelo salino	Kuwait
AD_04_2017_239_p1775	818	<i>Rosellomorea</i> sp.	OQ927163.1	98.89%	Lago salado	China
AD_04_2017_240_p1775	901	<i>Bacillus safensis</i>	MW876149.1	98.67%	Hongos endófitos	China
AD_04_2017_242_p1775	803	<i>Halomonas</i> sp.	KC705340.1	99.50%	Lago hipersalino	Estados Unidos
AD_04_2017_243_p1775	856	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	MG264280.1	99.52%	Agua de poza	México
AD_04_2017_244a_p1775	823	<i>Bacillus</i> sp.	MZ600408.1	97.70%	NA	Arabia Saudita
AD_04_2017_244b_p1775	873	<i>Bacillus coreaensis</i>	OQ223398.1	97.72%	Suelo	India
AD_04_2017_248_p1775	826	<i>Bacillus</i> sp.	LN849690.1	98.55%	Sedimento hipersalino	Bahamas
AD_04_2017_249_p1775	893	<i>Bacillus</i> sp.	MN176472.1	99.55%	Suelo	Corea del Sur
AD_04_2017_250_p1775	864	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461411.1	100.00%	Sedimento de lago	Estados Unidos

AD_04_2017_256b_p1775	843	<i>Bacillus</i> sp.	LT718642.1	95.69%	Sistema hidrotermal	Hungría
AD_04_2017_258_p1775	786	<i>Arthrobacter oxydans</i>	KR812324.1	95.21%	Suelo contaminado	China
AD_04_2017_259b_p1775	853	<i>Salinarimonas</i> sp.	MW970377.1	97.31%	Agua de lago	Canadá
AD_04_2017_260_p1775	900	<i>Arthrobacter</i> sp.	KT314151.1	98.54%	Suelo de bosque	España
AD_04_2017_263_p1775	752	<i>Arthrobacter</i> sp.	GU176051.1	97.05%	Agua marina	Antártica
AD_04_2017_264_p1775	805	<i>Planomicrobium</i> sp.	MT910386.1	96.68%	Arena rizosférica	China
AD_04_2017_266_p1775	842	<i>Bacillus licheniformis</i>	KY034391.1	99.00%	Almarjo	Arabia Saudita
AD_04_2017_268_p1775	847	<i>Bacillus</i> sp.	JN606109.1	96.81%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_270_p1775	786	<i>Bacillus</i> sp.	OK236153.1	95.03%	NA	China
AD_04_2017_275_p1775	857	<i>Bacillus</i> sp.	JN208098.1	99.16%	Salar	Marruecos
AD_04_2017_276_p1775	822	<i>Aurantimonas</i> sp.	FJ357425.1	99.51%	Mina de sal	China
AD_04_2017_278_p1775	807	<i>Microvirga</i> sp.	MN519634.1	98.14%	Sedimento de lago	China
AD_04_2017_280_p1775	864	<i>Paracoccus aerius</i>	MG778785.1	99.07%	Hojas de trepadora	Brasil
AD_04_2017_283_p1775	901	<i>Kocuria rosea</i>	LN774766.1	97.88%	Aire	España
AD_04_2017_284_p1775	912	<i>Nocardioides</i> sp.	KY436429.1	99.17%	Mangle	Arabia Saudita
AD_04_2017_286_p1775	827	<i>Arthrobacter tumbae</i>	LN774392.1	98.99%	Aire	España
AD_04_2017_287_p1775	812	<i>Bacillus</i> sp.	MG896842.1	98.15%	Suelo	México
AD_04_2017_288_p1775	823	<i>Bacillus</i> sp.	KP795825.1	99.15%	Suelo árido	Arabia Saudita
AD_04_2017_289_p1775	793	<i>Ectobacillus funiculus</i>	LT853766.1	95.92%	Sistema hidrotermal	Hungría
AD_04_2017_291a_p1775	815	<i>Ectobacillus funiculus</i>	LT853766.1	96.46%	Sistema hidrotermal	Hungría
AD_04_2017_291b_p1775	785	<i>Bacillus</i> sp.	MT496942.1	99.36%	NA	México
AD_04_2017_295c_p1775	837	<i>Bacillus</i> sp.	MW971701.1	99.16%	Sedimento marino	Colombia
AD_04_2017_296_p1775	764	<i>Microvirga indica</i>	MK726117.1	98.17%	Arena	China
AD_04_2017_299_p1775	837	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	MW828042.1	98.92%	Arena	China
AD_04_2017_3_p1775	840	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461400.1	98.69%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_301a_p1775	785	<i>Bacillus</i> sp.	MK873892.1	97.83%	NA	Estados Unidos
AD_04_2017_307_p1775	863	<i>Virgibacillus</i> sp.	KP795875.1	99.07%	Lodo de mangle	Arabia Saudita
AD_04_2017_31_p1775	894	<i>Alkalihalobacillus kruwichiae</i>	OM423188.1	96.56%	Agua de lago	Alemania
AD_04_2017_311_p1775	760	<i>Microvirga</i> sp.	MT911407.1	98.23%	Arena	China
AD_04_2017_313_p1775	903	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461431.1	97.78%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_314_p1775	801	<i>Aquibacillus kalidii</i>	NR_181475.1	96.65%	Rizósfera	China
AD_04_2017_315_p1775	828	<i>Bacillus</i> sp.	JN606109.1	96.46%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_317_p1775	856	<i>Bacillus</i> sp.	JN606109.1	95.43%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_318_p1775	853	<i>Agrococcus</i> sp.	MT910194.1	97.96%	Arena	China
AD_04_2017_319a_p1775	838	<i>Alkalihalobacillus</i> sp.	MZ905231.1	96.78%	NA	China
AD_04_2017_319b_p1775	799	<i>Bacillus</i> sp.	JN606109.1	96.61%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_321_p1775	845	<i>Bacillus</i> sp.	MH454613.1	96.92%	Sal	Corea del Sur
AD_04_2017_322_p1775	932	<i>Litchfieldia alkalitelluris</i>	NR_043210.1	98.27%	Arena	Corea del Sur
AD_04_2017_324_p1775	831	<i>Bacillus</i> sp.	GU377070.1	99.40%	Suelo contaminado	China
AD_04_2017_326_p1775	839	<i>Bacillus</i> sp.	KP795834.1	99.05%	Lodo de mangle	Arabia Saudita
AD_04_2017_327_p1775	922	<i>Bacillus</i> sp.	JN606109.1	97.48%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_330_p1775	923	<i>Bacillus subtilis</i>	MT240918.1	100.00%	Depósito de Pb y Zn	Turquía
AD_04_2017_331_p1775	891	<i>Bacillus</i> sp.	KF791524.1	100.00%	Orquídea	China
AD_04_2017_332_p1775	926	<i>Ectobacillus funiculus</i>	LT853766.1	97.00%	Sistema hidrotermal	Hungría

AD_04_2017_334_p1775	990	<i>Alkalihalobacillus alcalophilus</i>	MT125740.1	99.90%	NA	China
AD_04_2017_335_p1775	962	<i>Bacillus</i> sp.	LN846332.1	98.95%	Suelo costero	India
AD_04_2017_336_p1775	923	<i>Alkalihalobacillus okhensis</i>	KJ947157.1	97.44%	Sedimento hiper alcalino	Filipinas
AD_04_2017_337_p1775	970	<i>Terribacillus goriensis</i>	LN774578.1	99.79%	Aire	España
AD_04_2017_338_p1775	902	<i>Bacillus</i> sp.	KY987152.1	99.78%	Suelo	China
AD_04_2017_339_p1775	963	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216105.1	99.58%	Salar	Portugal
AD_04_2017_34_p1775	885	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	MG264280.1	99.77%	Agua de poza	México
AD_04_2017_342_p1775	966	<i>Metabacillus litoralis</i>	OP343490.1	99.69%	Agua marina	España
AD_04_2017_343_p1775	985	<i>Alkalihalobacillus okhensis</i>	KY623103.1	96.26%	Nave espacial	Estados Unidos
AD_04_2017_35a_p1775	849	<i>Bacillus</i> sp.	MT496942.1	99.06%	NA	México
AD_04_2017_35b_p1775	914	<i>Virgibacillus marismortui</i>	KU194374.1	99.89%	Salar	México
AD_04_2017_368_p1775	849	<i>Bacillus</i> sp.	JN606109.1	97.04%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_37_p1775	900	<i>Bacillus coreaensis</i>	OQ223398.1	98.94%	Suelo	India
AD_04_2017_371_p1775	926	<i>Desulfonatronovibrio halophilus</i>	NR_108637.1	98.60%	Lago salado	Rusia
AD_04_2017_38_p1775	928	<i>Bacillus</i> sp.	KP795866.1	99.78%	Suelo árido	Arabia Saudita
AD_04_2017_39_p1775	924	<i>Bacillus pumilus</i>	KY127313.1	98.92%	Regaliz	China
AD_04_2017_4_p1775	870	<i>Rosellomorea</i> sp.	OQ927133.1	99.19%	Lago salado	China
AD_04_2017_40_p1775	815	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216116.1	99.88%	Salar	Portugal
AD_04_2017_42_p1775	962	<i>Pontimonas salivibrio</i>	CP026923.1	98.96%	Salar marino	Corea del Sur
AD_04_2017_43_p1775	855	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	MG264280.1	99.76%	Agua de poza	México
AD_04_2017_44_p1775	882	<i>Marinobacter alkaliphilus</i>	MG264280.1	100.00%	Agua de poza	México
AD_04_2017_46_p1775	888	<i>Bacillus coreaensis</i>	OQ223398.1	98.46%	Suelo	India
AD_04_2017_49_p1775	891	<i>Salinarimonas rosea</i>	NR_116487.1	99.21%	NA	China
AD_04_2017_50_p1775	856	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461400.1	99.53%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_51_p1775	936	<i>Bacillus</i> sp.	KP795866.1	100.00%	Suelo árido	Arabia Saudita
AD_04_2017_53_p1775	898	<i>Metabacillus</i> sp.	OK216116.1	99.21%	Salar	Portugal
AD_04_2017_55_p1775	901	<i>Kocuria</i> sp.	JX502618.1	99.78%	Sal sin refinar	India
AD_04_2017_56_p1775	888	<i>Bacillus</i> sp.	KY987152.1	99.77%	Suelo	China
AD_04_2017_57_p1775	909	<i>Halomonas</i> sp.	MG461405.1	98.65%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_58_p1775	936	<i>Virgibacillus marismortui</i>	KU194374.1	99.79%	Salar	México
AD_04_2017_59_p1775	933	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN756646.1	99.89%	Suelo	China
AD_04_2017_61_p1775	936	<i>Virgibacillus</i> sp.	MG461430.1	99.78%	Sedimento de lago	Estados Unidos
AD_04_2017_62_p1775	951	<i>Arthrobacter tumbae</i>	KJ210634.1	99.58%	Álamo	China
AD_04_2017_63_p1775	933	<i>Jeotgaliococcus</i> sp.	KU644167.1	99.46%	Planta de biogás	Alemania
AD_04_2017_64_p1775	930	<i>Bacillus coreaensis</i>	OQ223398.1	98.99%	Suelo	India
AD_04_2017_65_p1775	909	<i>Bacillus</i> sp.	KT935059.1	100.00%	Costra de suelo	China
AD_04_2017_66_p1775	879	<i>Bacillus</i> sp.	KF791524.1	100.00%	Orquídea	China
AD_04_2017_67_p1775	911	<i>Bacillus</i> sp.	MN315392.1	99.78%	Suelo ornitogénico	China
AD_04_2017_7_p1775	835	<i>Bacillus</i> sp.	KP795866.1	99.28%	Suelo árido	Arabia Saudita
AD_12_2016_1_p1775	930	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.89%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_10_p1775	903	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN756646.1	100.00%	Suelo	China
AD_12_2016_11_p1775	898	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.89%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_12_p1775	851	<i>Bacillus</i> sp.	MT533980.1	99.65%	Intestino de colémbolo	China
AD_12_2016_13_p1775	801	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	MN918369.1	97.06%	NA	China
AD_12_2016_14_p1775	963	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN756646.1	99.69%	Suelo	China
AD_12_2016_15_p1775	902	<i>Bacillus thuringiensis</i>	MN087809.1	99.67%	Glaciar	China
AD_12_2016_16_p1775	935	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP053972.1	99.79%	NA	Estados Unidos
AD_12_2016_17_p1775	929	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.78%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_18_p1775	929	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.78%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_2_p1775	924	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.78%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos

AD_12_2016_3_p1775	920	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.78%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_4_p1775	927	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN756646.1	99.57%	Suelo	China
AD_12_2016_5_p1775	924	<i>Bacillus</i> sp.	MG470744.1	100.00%	Suelo	China
AD_12_2016_6_p1775	864	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.88%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_7_p1775	930	<i>Bacillus</i> sp.	AB533749.1	99.78%	Sedimento hipersalino	Estados Unidos
AD_12_2016_8_p1775	931	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN826564.1	100.00%	Rizósfera de quinoa	Perú
AD_12_2016_9_p1775	891	<i>Bacillus atrophaeus</i>	MN756646.1	100.00%	Suelo	China

pb=pares de bases, CBH=closest BLAST hit/coincidencia más cercana, No. Acc.=número de acceso en NCBI,%ID=porcentaje de identidad, NA=no aclarado.

Anexo 6. Aislamiento con enfoque extremófilo

Tabla 15. Resumen de los aislamientos con enfoque extremófilo exitosos para la obtención de actinobacterias.

Fecha de muestreo	Poza	Pretratamiento	Medio	Aislados
Septiembre 2021	AD	No	HV pH 10	10
		N+P	HV pH 10	2
	PR	N+P	HV pH 10	1
			ISP5 pH 9	1
Marzo 2022	CH	N+F+U	ISP5 pH 11	5
			HV pH 11	1
	PV	N+F	MQ pH 11	4
	PR	N+F	ISP5 pH 11	2
	PB	N+F	ISP5 pH 11	3

Los Domos del Arqueano (AD), Las Pozas Rojas (PR), La Poza Verde (PV), El Churince (CH), Poza La Becerra (PB), nistatina + polimixina B (N+P), nistatina + fenol (N+F), nistatina +fenol+UV (N+F+U), International *Streptomyces* Project 5 (ISP5), medio de ácidos húmicos y vitaminas (HV), medio de quitina (MQ).

Anexo 7. Fenotipos de actinobacterias

Tabla 16. Fenotipos observados en las actinobacterias aisladas del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Fenotipo	Forma	Elevación	Borde	Color	No. de aislados
X1	Rugosa y filamentosa	Convexa	Encrespado	Amarillo narciso y violeta pastel	3
X2	Irregular y filamentosa	Papilada	Encrespado	Amarillo azafrán y violeta pastel	4

X3	Irregular	Crateriforme	Ondulado	Amarillo tráfico y blanco crema	1
X4	Irregular y rugosa	Papilada	Ondulado	Amarillo dalia y blanco puro	1
X5	Filamentosa	Acuminada	Filamentoso	Amarillo azafrán y violeta pastel	1
X6	Irregular y compleja	Acuminada	Entero	Rojo claro anaranjado	1
X7	Irregular y concéntrica	Convexa	Encrespado	Amarillo oro y blanco crema	1
X8	Redonda y rugosa	Papilada	Ciliado	Marfil claro y blanco crema	1
X9	Irregular y concéntrica	Crateriforme	Encrespado	Marfil claro y blanco crema	1
X10	Rugosa y filamentosa	Papilada	Ondulado	Pardo ocre y blanco perla	1
X11	Irregular y rugosa	Papilada	Ondulado	Amarillo azafrán y gris musgo	1
X12	Redonda y filamentosa	Papilada	Ondulado	Gris caqui y oliva grisáceo	1
X13	Redonda y filamentosa	Convexa	Encrespado	Marfil claro y blanco crema	2
X14	Redonda y filamentosa	Convexa	Encrespado	Gris caqui y oliva grisáceo	2
X15	Redonda y concéntrica	Convexa	Filamentoso	Caoba y blanco crema	1
X16	Redonda	Acuminada	Filamentoso	Amarillo oro y blanco crema	1
X17	Irregular	Plana	Lobulado	Pardo ocre y blanco crema	2
X18	Redonda y rugosa	Acuminada	Filamentoso	Amarillo maíz y blanco crema	1
X19	Irregular y rugosa	Crateriforme	Filamentoso	Marfil claro y blanco crema	1
X20	Redonda y rugosa	Acuminada	Filamentoso	Marfil claro y blanco crema	1
X21	Irregular y rugosa	Papilada	Ondulado	Pardo arcilla y blanco crema	1
X22	Redonda	Convexa	Entero	Amarillo curry y pardo corzo	1
X23	Irregular y compleja	Papilada	Entero	Naranja pálido y amarillo pastel	1

Anexo 8. Actinobacterias de Cuatro Ciénegas

Tabla 17. Información completa de las actinobacterias extremotolerantes aisladas del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Nombre	Poza	Pdm	Medio	pH	Pt	Fecha	Fn
AD-XJ01	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X1
AD-XJ02	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X2
AD-XJ03	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X3
AD-XJ04	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X4
AD-XJ05	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X2
AD-XJ06	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X5
AD-XJ07	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X1
AD-XJ08	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X2
AD-XJ09	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X1
AD-XJ10	AD	ADS-1	HV	10.0	No	Sep-21	X2
PR-XJ11	PR	PR-2B	ISP5	9.0	N+P	Sep-21	X6
AD-XJ12	AD	ADS-3	HV	10.0	N+P	Sep-21	X7
PR-XJ13	PR	PR-2B	HV	10.0	N+P	Sep-21	X8
AD-XJ14	AD	ADS-3	HV	10.0	N+P	Sep-21	X9
PA-XJ15	PA	PA-4	MM	6.8	No	Oct-20	X10
PA-XJ16	PA	PA-8	MM	6.8	H	Oct-20	X11
PV-XJ17	PV	PV-1	MQ	11.0	N+F	Mar-22	X12
CH-XJ18	CH	CH-1	ISP5	11.0	N+F +U	Mar-22	X13
PV-XJ19	PV	PV-1	MQ	11.0	N+F	Mar-22	X14
PB-XJ20	PB	PB-1	ISP5	11.0	N+F	Mar-22	X15
CH-XJ21	CH	CH-1	ISP5	11.0	N+F +U	Mar-22	X16
CH-XJ22	CH	CH-1	ISP5	11.0	N+F +U	Mar-22	X13
PB-XJ23	PB	PB-1	ISP5	11.0	N+F	Mar-22	X17
PV-XJ24	PV	PV-1	MQ	11.0	N+F	Mar-22	X14

CH-XJ25	CH	CH-1	ISP5	11.0	N+F +U	Mar-22	X18
PV-XJ26	PV	PV-1	MQ	11.0	N+F	Mar-22	X19
CH-XJ27	CH	CH-1	ISP5	11.0	N+F +U	Mar-22	X20
PB-XJ28	PB	PB-1	ISP5	11.0	N+F	Mar-22	X17
CH-XJ29	CH	CH-1	HV	11.0	N+F +U	Mar-22	X21
PR-XJ30	PR	PR-3	ISP5	11.0	N+F	Mar-22	X22
PR-XJ31	PR	PR-3	ISP5	11.0	N+F	Mar-22	X23

Anexo 9. Caracterización morfológica de actinobacterias en ISP2

Tabla 18. Descripción morfológica de las actinobacterias aisladas, evaluada en medio ISP2 los días 2, 5 y 12 de incubación a 27° C.

Día 2					
Cepa	Crecimiento	Color reverso	MA	Color MA	PS
AD-XJ01	+	Gris seda	+	Blanco crema	No
AD-XJ02	+	Marfil claro	+	Blanco crema	No
AD-XJ03	+	Gris tele 4	No	NA	No
AD-XJ04	+	Marfil claro	No	NA	No
AD-XJ05	+	Gris seda	+	Blanco crema	No
AD-XJ06	+	Marfil claro	No	NA	No
AD-XJ07	+	Marfil claro	+	Blanco crema	No
AD-XJ08	+	Marfil claro	No	NA	No
AD-XJ09	+	Marfil claro	No	NA	No
AD-XJ10	+	Gris seda	+	Blanco crema	No
PR-XJ11	+	Rojo claro anaranjado	No	NA	No
AD-XJ12	+	Blanco perla	+	Blanco puro	No
PR-XJ13	+	Gris guijarro	+	Blanco crema	No
AD-XJ14	+	Gris seda	+	Blanco puro	No
PA-XJ15	+	Marfil claro	No	NA	No
PA-XJ16	+	Marfil claro	No	NA	No
PV-XJ17	+	Marfil claro	+	Blanco crema	No
CH-XJ18	+	Gris seda	No	NA	No
PV-XJ19	+	Marfil claro	No	NA	No
PB-XJ20	+	Gris seda	++	Blanco tráfico	No

CH-XJ21	+	Gris guijarro	+	Blanco grisáceo	No
CH-XJ22	+	Gris guijarro	++	Blanco grisáceo	No
PB-XJ23	+	Marfil claro	++	Blanco señales	No
PV-XJ24	+	Marfil claro	No	NA	No
CH-XJ25	+	Blanco grisáceo	No	NA	No
PV-XJ26	+	Blanco grisáceo	+	Blanco señales	No
CH-XJ27	+	Blanco grisáceo	+	Blanco señales	No
PB-XJ28	+	Marfil claro	++	Blanco crema	No
CH-XJ29	+	Blanco puro	++	Blanco crema	No
PR-XJ30	+	Marfil	No	NA	No
PR-XJ31	+	Amarillo pastel	No	NA	No

Día 5

Cepa	Crecimiento	Color reverso	MA	Color MA	PS
AD-XJ01	++	Amarillo azafrán	++	Blanco crema	No
AD-XJ02	++	Amarillo azafrán	++	Blanco crema	No
AD-XJ03	++	Amarillo tráfico	+	Blanco puro	No
AD-XJ04	++	Amarillo tráfico	+	Blanco puro	No
AD-XJ05	++	Amarillo azafrán	++	Blanco crema	No
AD-XJ06	++	Amarillo azafrán	++	Blanco puro	No
AD-XJ07	++	Amarillo azafrán	++	Blanco crema	No
AD-XJ08	++	Amarillo azafrán	++	Blanco crema	No
AD-XJ09	++	Amarillo azafrán	++	Blanco puro	No
AD-XJ10	++	Amarillo azafrán	++	Blanco crema	No
PR-XJ11	+	Naranja tráfico	No	NA	No
AD-XJ12	++	Blanco perla	+	Blanco puro	No
PR-XJ13	++	Gris guijarro	++	Blanco crema	No
AD-XJ14	++	Gris seda	+	Blanco puro	No
PA-XJ15	++	Marfil claro	No	NA	No
PA-XJ16	++	Marfil claro	No	NA	No
PV-XJ17	++	Marfil claro	+	Blanco crema	No
CH-XJ18	++	Gris seda	No	NA	No
PV-XJ19	++	Marfil claro	No	NA	No
PB-XJ20	++	Gris seda	+	Blanco tráfico	No
CH-XJ21	++	Gris guijarro	++	Blanco señales	No

CH-XJ22	++	Gris guijarro	++	Blanco señales	No
PB-XJ23	++	Marfil claro	++	Blanco señales	No
PV-XJ24	++	Marfil claro	+	Blanco perla	No
CH-XJ25	++	Blanco grisáceo	++	Blanco puro	No
PV-XJ26	++	Blanco grisáceo	++	Blanco señales	No
CH-XJ27	++	Blanco grisáceo	++	Blanco señales	No
PB-XJ28	++	Marfil claro	++	Blanco crema	No
CH-XJ29	++	Blanco puro	++	Blanco crema	No
PR-XJ30	++	Amarillo oliva	No	NA	Beige perlado
PR-XJ31	+	Naranja pálido	No	NA	No

Día 12

Cepa	Crecimiento	Color reverso	MA	Color MA	PS
AD-XJ01	++	Amarillo narciso	++	Gris luminoso	No
AD-XJ02	++	Amarillo azafrán	++	Gris seda	No
AD-XJ03	++	Amarillo tráfico	+	Blanco tráfico	No
AD-XJ04	++	Amarillo dalia	+	Blanco señales	No
AD-XJ05	++	Amarillo azafrán	++	Gris seda	No
AD-XJ06	++	Amarillo azafrán	++	Gris seda	No
AD-XJ07	++	Amarillo narciso	++	Gris seda	No
AD-XJ08	++	Amarillo azafrán	++	Blanco papiro	No
AD-XJ09	++	Amarillo narciso	++	Gris seda	No
AD-XJ10	++	Amarillo azafrán	++	Gris seda	No
PR-XJ11	+	Rojo claro anaranjado	No	NA	No
AD-XJ12	++	Amarillo oro	+	Gris tele 4	No
PR-XJ13	++	Rosa	++	Gris tele 5	No
AD-XJ14	++	Marfil claro	+	Blanco puro	No
PA-XJ15	++	Pardo ocre	+	Marfil claro	No
PA-XJ16	++	Amarillo azafrán	+	Blanco perla	No
PV-XJ17	++	Gris caqui	++	Gris señales	No
CH-XJ18	++	Marfil claro	++	Gris luminoso	No
PV-XJ19	++	Gris caqui	++	Gris agata	No
PB-XJ20	++	Caoba	++	Blanco tráfico	No
CH-XJ21	++	Amarillo oro	++	Blanco papiro	No
CH-XJ22	++	Marfil claro	++	Blanco papiro	No

PB-XJ23	++	Pardo ocre	++	Blanco grisáceo	No
PV-XJ24	++	Gris caqui	++	Gris ventana	No
CH-XJ25	++	Amarillo maíz	++	Gris ventana	No
PV-XJ26	++	Marfil claro	++	Gris agata	No
CH-XJ27	++	Marfil claro	++	Gris tele 4	No
PB-XJ28	++	Pardo ocre	++	Blanco crema	No
CH-XJ29	++	Pardo arcilla	++	Blanco crema	No
PR-XJ30	++	Verde helecho	No	NA	Negro tráfico
PR-XJ31	+	Naranja pálido	No	NA	No

++ =Bueno, + =Escaso, MA=Micelio aéreo, PS=Pigmento soluble, NA=No aplica.

Anexo 10. Densidad óptica a diferentes valores de pH

Tabla 19. Promedio y desviación estándar de la densidad óptica corregida del medio a diferentes valores de pH, la cual fue medida a una longitud de onda de 600 nm, después de diez días de haber sido inoculado con los aislados de actinomicetos.

pH	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
AD-XJ01	0	0.006±0.003	0	0.694±0.545	0.4±0.135	1.041±0.235	0.933±0.406	1.929±0.044	0.549±0.511	0.55±0.475	0
AD-XJ02	0.024±0.013	0.022±0.017	0.143±0.048	0.394±0.172	0.895±0.351	0.58±0.273	0.911±0.232	0.988±0.163	0.894±0.194	0.37±0.131	0.255±0.086
AD-XJ03	0.013±0.002	0.02±0.007	0.286±0.091	1.16±0.413	0.777±0.407	0.259±0.029	0.528±0.378	0.322±0.257	0.256±0.362	0.378±0.261	0.043±0.028
AD-XJ04	0	0.008±0.008	0.066±0.209	0.82±0.182	0.546±0.247	1.271±0.423	1.333±0.059	1.907±0.006	0.708±0.175	0.567±0.115	0
AD-XJ05	0	0.013±0.008	0.184±0.28	0.779±0.332	1.344±0.395	0.736±0.473	1.252±0.517	0.567±0.594	1.263±0.699	0.584±0.17	0.153±0.115
AD-XJ06	0.027±0.012	0.008±0.004	0.015±0.02	0.958±0.624	1.083±0.589	1.072±0.501	1.233±0.69	1.871±0.012	1.073±0.655	0.602±0.36	0.181±0.09
AD-XJ07	0.034±0.004	0.008±0.005	0.287±0.127	0.484±0.071	0.723±0.612	0.284±0.035	0.309±0.237	0.649±0.458	0.474±0.159	0.451±0.053	0.43±0.093
AD-XJ08	0	0.003±0.002	0	1.056±0.535	0.681±0.285	1.473±0.277	1.6±0.173	1.101±0.746	1.357±0.446	0.369±0.282	0

AD-XJ09	0	0.005±0	0.01±0.037	1.794±0.057	1.857±0.029	1.063±0.684	1.778±0.113	0.496±0.047	1.052±0.223	0.163±0.13	0
AD-XJ10	0	0.077±0.151	0	0.002±0.002	0.192±0.254	0.58±0.311	0.292±0.429	0.279±0.308	0.44±0.183	0.027±0.011	0.129±0.152
AD-XJ12	0	0.01±0.005	0.009±0.004	0.043±0.059	0.028±0.006	0.142±0.099	0.122±0.122	0.179±0.081	0.082±0.046	0.218±0.098	0.056±0.075
AD-XJ14	0.011±0.019	0.011±0.011	0.043±0.068	0.116±0.04	0.168±0.092	0.095±0.027	0.09±0.074	0.13±0.005	0.104±0.071	0.086±0.017	0.112±0.035
PV-XJ17	0.001±0.001	0	0	0	0.742±0.556	0.806±0.375	1.811±0.595	0.396±0.595	0.443±0.411	0.01±0.008	0.46±0.438
PV-XJ19	0	0.003±0.002	0	0	0	0	0.046±0.076	0.011±0.003	0.016±0.003	0.018±0.001	0.039±0.042
PV-XJ24	0.005±0.014	0.009±0.007	0	0.003±0.007	0	0.126±0.235	0.92±0.8	0.555±0.458	0.826±0.544	0.077±0.047	0.129±0.045
PV-XJ26	0.016±0.02	0	0	0.005±0.003	0.723±0.932	0	0.022±0.038	0.13±0.065	0.223±0.313	0.741±0.443	0.184±0.098
PB-XJ20	0.003±0.001	0	0.01±0.001	0.535±0.261	0.427±0.137	0.393±0.093	0.471±0.161	0.335±0.178	0.317±0.272	0.022±0.012	0.6±0.624
PB-XJ23	0	0.003±0.008	0	0.011±0.005	0	0	0.736±1.064	0.359±0.076	0.434±0.025	0.108±0.07	0.163±0.034
PB-XJ28	0.009±0.014	0.001±0.004	0	0.003±0.002	0.001±0.003	0	0.001±0.006	0	0	0.022±0.046	0.127±0.012
CH-XJ18	0.008±0.002	0.196±0.312	1.771±0.033	1.779±0.036	1.815±0.019	1.948±0.011	1.775±0.007	1.744±0.135	1.67±0.151	0.476±0.097	0.386±0.079
CH-XJ21	0.011±0.004	0	0.046±0.041	0.384±0.173	0.387±0.229	0.355±0.039	0.303±0.038	0.433±0.063	0.913±0.083	0.773±0.243	0.45±0.332
CH-XJ22	0.003±0.002	0.009±0.007	0.005±0.004	0.508±0.344	0.13±0.098	0.519±0.233	1.284±0.816	0.56±0.395	0.445±0.281	0.714±0.842	0.562±0.701
CH-XJ25	0.026±0.031	0	1.686±0.043	1.771±0.037	1.865±0.053	1.891±0.009	1.014±0.057	0.476±0.069	0.454±0.09	1.847±0.147	1.722±0.037

CH-XJ27	0.008±0 .03	0	0	0.552±0 .447	0.392±0 .244	0.285±0 .283	0.887±0 .403	0	0	0.753±0 .322	1.087±0 .289
CH-XJ29	0.012±0 .016	0	0.054±0 .021	0.056±0 .006	0.045±0 .023	0.102±0 .017	0.052±0 .066	0.114±0 .074	0.028±0 .044	0.322±0 .214	0.259±0 .043
PR-XJ11	0	0.003±0 .026	0.012±0 .006	0.013±0 .023	0.002±0 .004	0.078±0 .029	0.048±0 .029	0.072±0 .027	0.097±0 .114	0.091±0 .065	0.047±0 .067
PR-XJ13	0.006±0 .001	0	0.103±0 .078	0.333±0 .144	0.264±0 .364	0.4±0.2 95	0.314±0 .221	0.413±0 .15	0.718±0 .373	0.368±0 .272	0.04±0. 098
PR-XJ30	0.005±0 .01	0	0.043±0 .002	0.077±0 .009	0.292±0 .066	0.48±0. 136	0.911±0 .418	0.573±0 .089	0.41±0. 037	1.35±0. 135	1.105±0 .094
PR-XJ31	0.039±0 .011	0.008±0 .028	0.013±0 .006	0.019±0 .019	0.01±0. 009	0.001±0 .004	0.017±0 .02	0.037±0 .022	0.018±0 .026	0	0
PA-XJ15	0.012±0 .008	0.006±0 .002	0.007±0 .001	0.933±0 .351	0.404±0 .217	0.759±0 .113	1.112±0 .175	1.035±0 .157	0.537±0 .077	0.633±0 .047	0.783±0 .27
PA-XJ16	0.007±0 .001	0.007±0 .003	0.006±0 .002	0.004±0 .003	0.648±0 .354	0.404±0 .172	0.765±0 .367	0.66±0. 26	0.576±0 .273	0.18±0. 212	0.882±0 .148

Anexo 11. Actividad antimicrobiana

Tabla 20. Promedio y desviación estándar de los milímetros de la inhibición que tuvieron las actinobacterias aisladas frente a las bacterias patógenas MDR.

	SA 20-402	SA 20-499	SC	SE 16-1928	SE 17-1758	SH
AD-XJ01	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ02	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ03	0	0	0	0	0	0
AD-XJ04	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ05	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ06	0	0	0	0	0	0
AD-XJ07	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ08	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ09	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ10	0	0	0	23±0	23±0	0
AD-XJ12	0	0	0	21.1±3.32	21.1±3.32	0

PV-XJ17	23±0	23±0	0	23±0	23±0	23±0
PV-XJ24	23±0	23±0	0	0	23±0	23±0
PV-XJ26	0	0	0	0	0	0
PB-XJ20	0	0	0	23±0	23±0	0
PB-XJ23	0	0	0	23±0	23±0	0
PB-XJ28	0	0	0	23±0	23±0	0
CH-XJ18	0	0	0	0	0	0
CH-XJ21	23±0	14.38±12.19	0	0	23±0	17.25±8.13
CH-XJ22	0	0	0	0	0	0
CH-XJ25	0	0	0	5.75±0	0	0
CH-XJ27	0	0	0	0	5.75±0	0
CH-XJ29	0	0	0	11.5±0	11.5±0	0
PR-XJ11	0	0	0	0	0	0
PR-XJ13	23±0	23±0	23±0	23±0	23±0	23±0
PR-XJ30	11.5±0	11.5±0	11.5±0	11.5±0	11.5±0	11.5±0
PR-XJ31	0	0	0	0	0	0
PA-XJ15	0	0	0	23±0	0	0
PA-XJ16	0	0	0	15.33±13.28	15.33±13.28	0

SA 20-402=*S. aureus* 20-402, SA 20-499=*Staphylococcus aureus* 20-499, SC=*Staphylococcus cohnii*, SE 16-1928=*S. epidermidis* 16-1928, SE 17-1758=*Staphylococcus epidermidis* 17-1758, SH=*Staphylococcus haemolyticus*.

Anexo 12. RAL

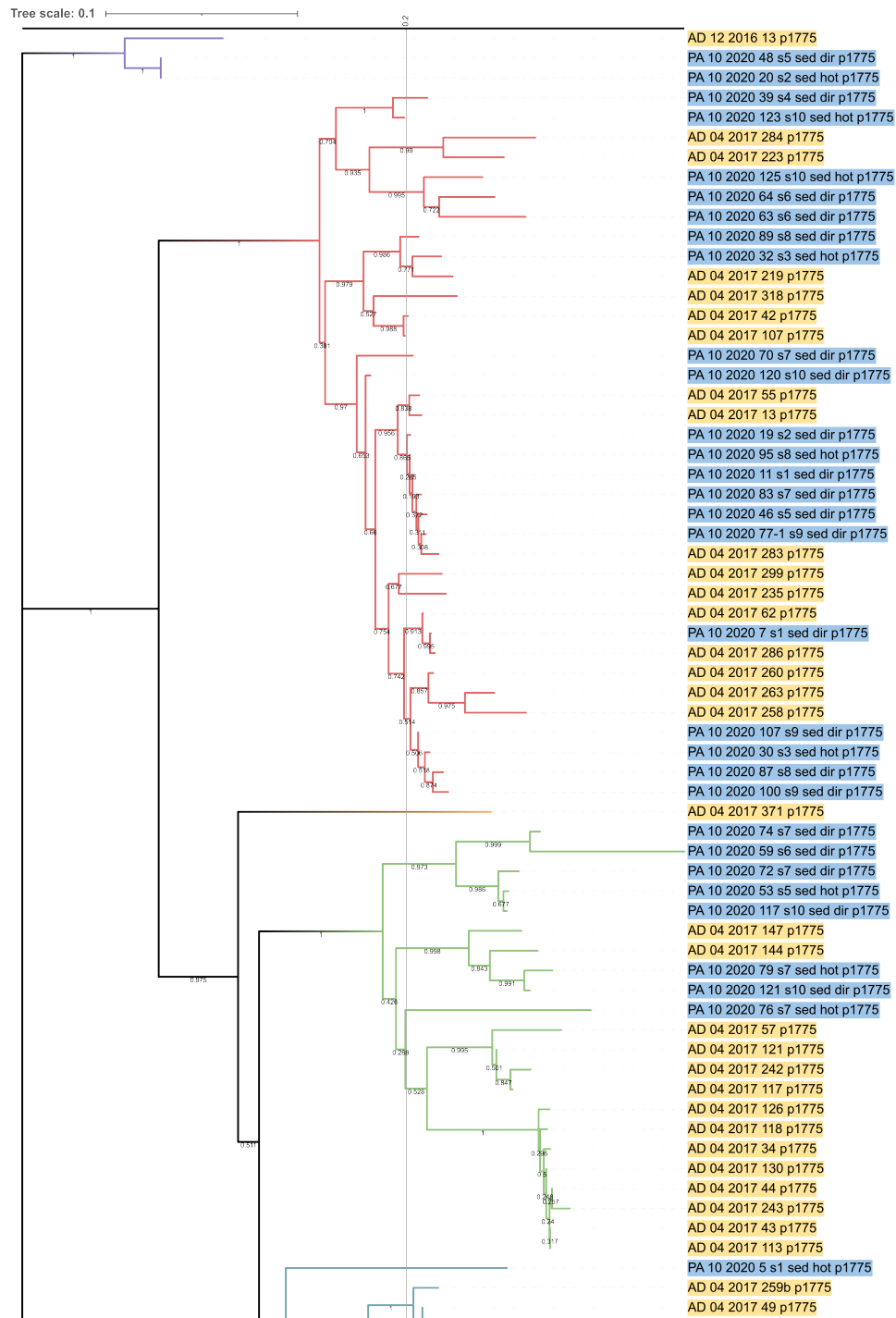
Tabla 21. Colores referenciados en el presente trabajo y su código correspondiente al sistema europeo de colores RAL Clásico 2017 (Kelly, 1964).

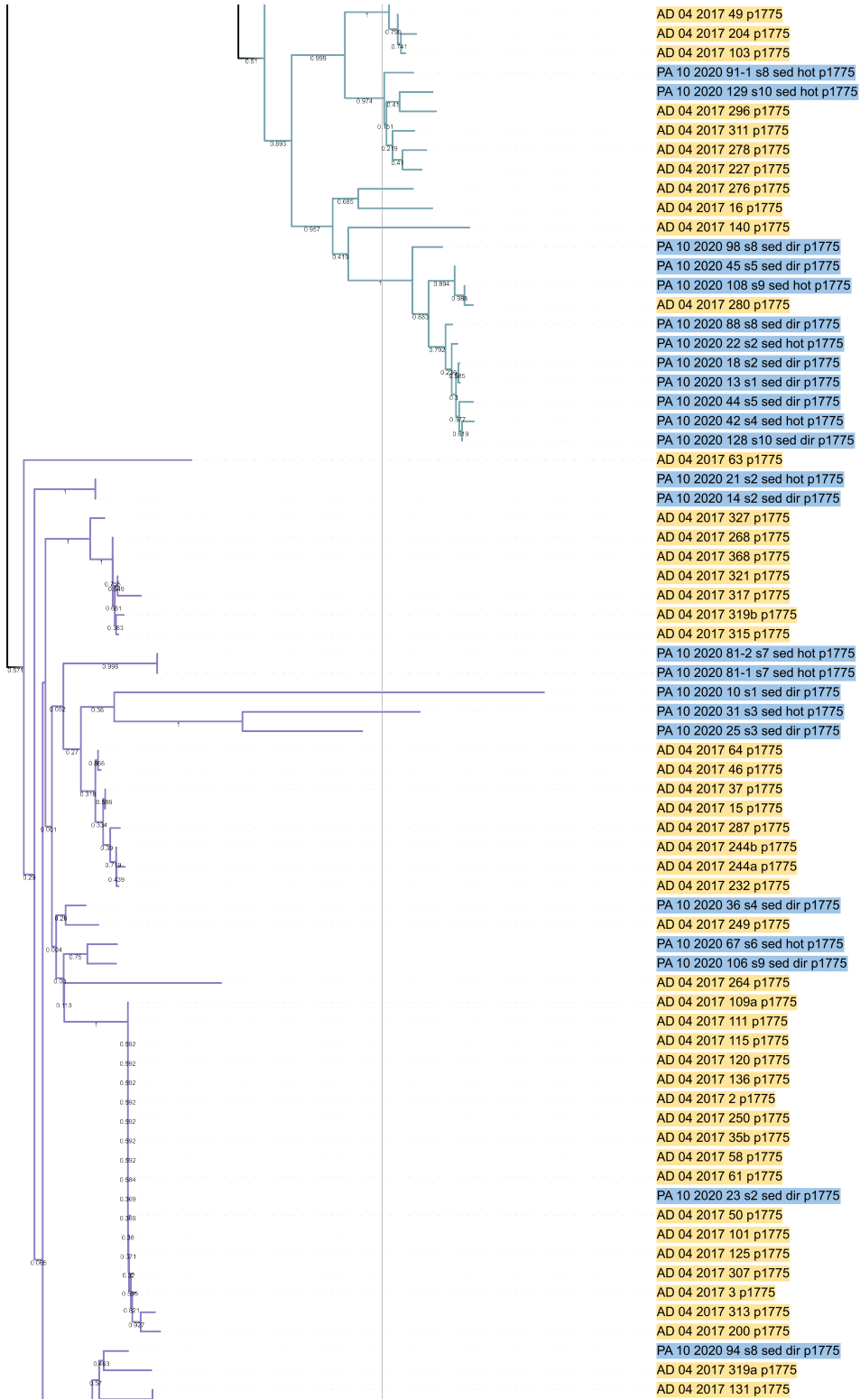
Color	#RAL	Color	#RAL
Beige verdoso	1000	Rojo beige	3012
Beige	1001	Rojo viejo	3014
Amarillo avena	1002	Rosa claro	3015
Amarillo señales	1003	Rosa	3017
Amarillo oro	1004	Rojo fresa	3018
Amarillo maíz	1006	Violeta pastel	4009
Amarillo narciso	1007	Verde hoja	6002
Amarillo limón	1012	Oliva grisáceo	6006
Blanco perla	1013	Verde helecho	6025
Marfil	1014	Gris oliva	7002
Marfil claro	1015	Gris musgo	7003
Amarillo azufre	1016	Gris señales	7004

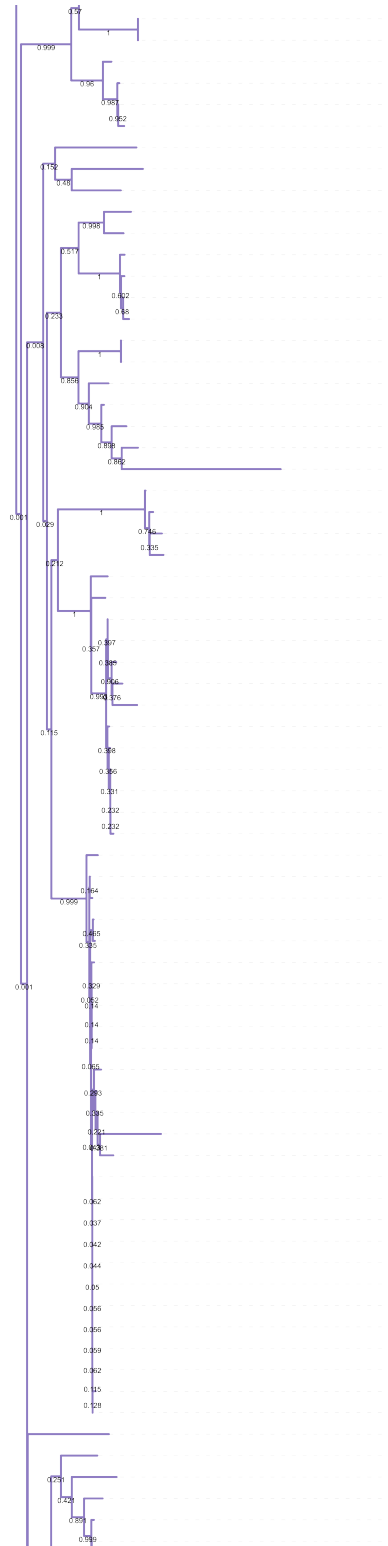
Amarillo azafrán	1017	Gris caqui	7008
Amarillo de zinc	1018	Gris piedra	7030
Amarillo oliva	1020	Gris guijarro	7032
Amarillo colza	1021	Gris luminoso	7035
Amarillo tráfico	1023	Gris agata	7038
Amarillo melón	1028	Gris ventana	7040
Amarillo retama	1032	Gris seda	7044
Amarillo dalia	1033	Gris tele 4	7047
Amarillo pastel	1034	Pardo ocre	8001
Oro perlado	1036	Pardo arcilla	8003
Amarillo sol	1037	Pardo corzo	8007
Amarillo naranja	2000	Caoba	8016
Naranja pálido	2003	Blanco crema	9001
Naranja brillante	2005	Blanco grisáceo	9002
Naranja claro brillante	2007	Blanco señales	9003
Rojo claro anaranjado	2008	Blanco puro	9010
Naranja tráfico	2009	Blanco tráfico	9016
Naranja salmón	2012	Blanco papiro	9018
Naranja perlado	2013		

Anexo 13. Árbol Neighbor-Joining extendido

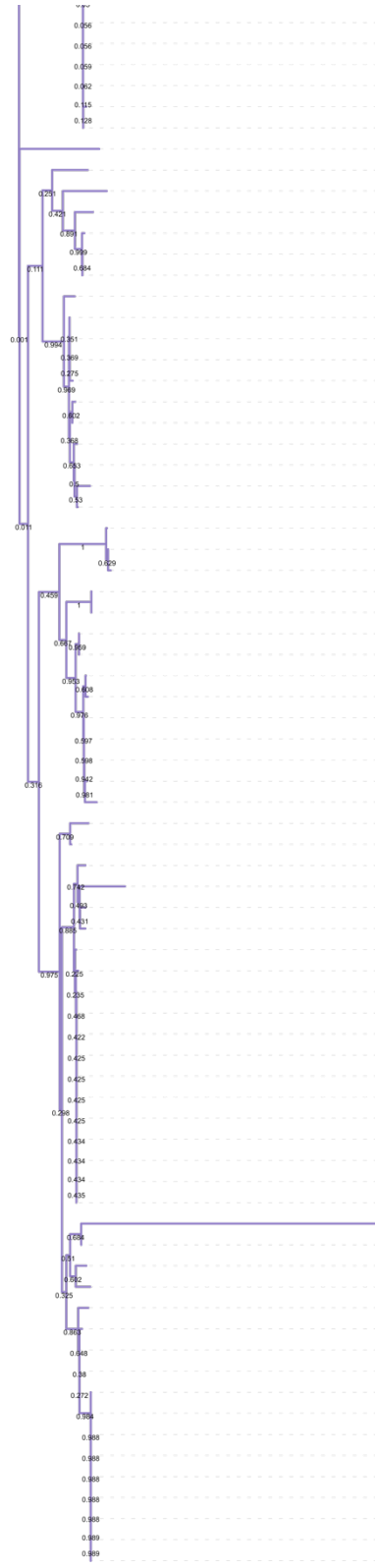
Figura 46. Árbol Neighbor-Joining extendido a la forma rectangular para poder apreciarse más a detalle.







- AD 04 2017 131 p1775
- AD 04 2017 114 p1775
- AD 04 2017 31 p1775
- AD 04 2017 336 p1775
- AD 04 2017 343 p1775
- AD 04 2017 1 p1775
- AD 04 2017 314 p1775
- AD 04 2017 337 p1775
- AD 04 2017 124 p1775
- AD 04 2017 322 p1775
- AD 04 2017 10 p1775
- PA 10 2020 93 s8 sed hot p1775
- PA 10 2020 65 s6 sed hot p1775
- PA 10 2020 73 s7 sed dir p1775
- PA 10 2020 17 s2 sed dir p1775
- AD 04 2017 335 p1775
- AD 04 2017 110 p1775
- PA 10 2020 38 s4 sed dir p1775
- PA 10 2020 57 s5 sed hot p1775
- AD 04 2017 234 p1775
- PA 10 2020 56 s5 sed dir p1775
- PA 10 2020 55 s5 sed dir p1775
- AD 04 2017 332 p1775
- AD 04 2017 291b p1775
- AD 04 2017 289 p1775
- AD 04 2017 256b p1775
- PA 10 2020 113 s9 sed hot p1775
- PA 10 2020 90 s8 sed dir p1775
- PA 10 2020 2 s1 sed dir p1775
- PA 10 2020 49 s5 sed dir p1775
- PA 10 2020 47 s5 sed dir p1775
- PA 10 2020 118 s10 sed dir p1775
- PA 10 2020 101 s9 sed dir p1775
- AD 12 2016 15 p1775
- PA 10 2020 75 s7 sed dir p1775
- AD 12 2016 16 p1775
- PA 10 2020 61 s6 sed dir p1775
- PA 10 2020 71 s7 sed dir p1775
- AD 12 2016 12 p1775
- AD 04 2017 7 p1775
- AD 04 2017 342 p1775
- AD 04 2017 212 p1775
- PA 10 2020 4 s1 sed hot p1775
- PA 10 2020 29-1 s3 sed dir p1775
- AD 04 2017 56 p1775
- AD 04 2017 338 p1775
- AD 04 2017 339 p1775
- AD 04 2017 51 p1775
- AD 04 2017 38 p1775
- AD 04 2017 220 p1775
- AD 04 2017 112 p1775
- AD 04 2017 229 p1775
- PA 10 2020 29-2 s3 sed dir p1775
- AD 04 2017 210 p1775
- AD 04 2017 105 p1775
- AD 04 2017 137 p1775
- AD 04 2017 331 p1775
- AD 04 2017 40 p1775
- AD 04 2017 53 p1775
- AD 04 2017 66 p1775
- PA 10 2020 105 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 12 s1 sed dir p1775
- PA 10 2020 27 s3 sed dir p1775
- PA 10 2020 3 s1 sed hot p1775
- PA 10 2020 78 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 37 s4 sed dir p1775
- AD 04 2017 270 p1775
- AD 04 2017 288 p1775
- PA 10 2020 104 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 102 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 116 s10 sed dir p1775
- PA 10 2020 60 s6 sed dir p1775



- PA 10 2020 105 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 12 s1 sed dir p1775
- PA 10 2020 27 s3 sed dir p1775
- PA 10 2020 3 s1 sed hot p1775
- PA 10 2020 78 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 37 s4 sed dir p1775
- AD 04 2017 270 p1775
- AD 04 2017 288 p1775
- PA 10 2020 104 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 102 s9 sed dir p1775
- PA 10 2020 116 s10 sed dir p1775
- PA 10 2020 60 s6 sed dir p1775
- PA 10 2020 115 s9 sed hot p1775
- AD 04 2017 4 p1775
- AD 04 2017 102 p1775
- AD 04 2017 334 p1775
- PA 10 2020 84 s9 sed hot p1775
- AD 04 2017 14 p1775
- PA 10 2020 16 s2 sed dir p1775
- AD 04 2017 104 p1775
- AD 04 2017 275 p1775
- AD 04 2017 238b p1775
- AD 04 2017 239 p1775
- AD 04 2017 238a p1775
- PA 10 2020 68 s6 sed hot p1775
- PA 10 2020 124 s10 sed hot p1775
- PA 10 2020 122 s10 sed dir p1775
- PA 10 2020 92 s8 sed hot p1775
- PA 10 2020 110 s9 sed hot p1775
- PA 10 2020 28-2 s3 sed dir p1775
- PA 10 2020 28-1 s3 sed dir p1775
- AD 04 2017 240 p1775
- AD 04 2017 237 p1775
- AD 04 2017 11 p1775
- AD 04 2017 138 p1775
- AD 04 2017 67 p1775
- PA 10 2020 103 s9 sed dir p1775
- AD 04 2017 39 p1775
- AD 04 2017 248 p1775
- AD 04 2017 127 p1775
- AD 04 2017 35a p1775
- AD 04 2017 301a p1775
- AD 04 2017 295c p1775
- AD 04 2017 295a p1775
- PA 10 2020 34 s4 sed dir p1775
- PA 10 2020 52 s5 sed hot p1775
- AD 04 2017 17 p1775
- AD 12 2016 1 p1775
- AD 12 2016 11 p1775
- AD 12 2016 17 p1775
- AD 12 2016 18 p1775
- AD 12 2016 2 p1775
- AD 12 2016 3 p1775
- AD 12 2016 6 p1775
- AD 12 2016 7 p1775
- PA 10 2020 24 s3 sed dir p1775
- PA 10 2020 15 s2 sed dir p1775
- PA 10 2020 69 s7 sed dir p1775
- PA 10 2020 1 s1 sed dir p1775
- AD 04 2017 326 p1775
- AD 04 2017 266 p1775
- AD 04 2017 324 p1775
- PA 10 2020 62 s6 sed dir p1775
- AD 04 2017 109b p1775
- AD 04 2017 330 p1775
- AD 04 2017 128 p1775
- AD 04 2017 59 p1775
- AD 04 2017 65 p1775
- AD 12 2016 10 p1775
- AD 12 2016 14 p1775
- AD 12 2016 4 p1775
- AD 12 2016 5 p1775
- AD 12 2016 9 p1775
- AD 12 2016 8 p1775

Anexo 14. Árbol Maximum-Likelihood extendido

Figura 47 Árbol Maximum-Likelihood extendido a la forma rectangular para poder apreciarse más a detalle.

