

Ciudad Juárez, Chihuahua a 3 de septiembre del 2021

ASUNTO:
INFORME DE ACTIVIDADES DE ESTANCIA SABÁTICA VIRTUAL

H. Consejo Técnico
Centro de Investigaciones Químicas
Universidad Autónoma de Estado de Morelos
PRESENTE

Respetables Académicos,

Por este medio me permito comunicarles las actividades y los resultados alcanzados durante la estancia sabática realizada bajo la dirección de la Dra. Sandra I. Ramírez Jiménez responsable del Laboratorio de Simulación de Ambientes Planetarios en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM. Las actividades se enmarcaron en el proyecto “Evaluación del comportamiento bacteriano en condiciones simuladas de microgravedad” y se desarrollaron en un periodo de 10 meses, comenzando en agosto de 2020. Las actividades experimentales tuvieron que adecuarse a los horarios y periodos de acceso al Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas del Instituto de Ciencias Biomédicas en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez ya que debido a la emergencia sanitaria provocada por el SARS-CoV2 (COVID-19) no fue posible realizar actividades presenciales en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM.

A continuación se describen, de manera cronológica, las actividades y los logros alcanzados a pesar de las particulares circunstancias de trabajo, disponibilidad de recursos y de infraestructura.

I) Actividades de investigación experimental
Agosto-Noviembre de 2020

Evaluación del crecimiento de las bacterias *Bacillus subtilis* y *Cobetia marina* en medios modificados con KClO_3 , NaClO_3 , NaClO_4 y $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ en condiciones de gravedad terrestre. Durante el mes de agosto se realizó la compra de KClO_3 , NaClO_3 , NaClO_4 y $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Al tratarse de materiales inflamables, su entrega se concretó hasta el mes de septiembre de 2020. Se realizaron ensayos con *B. subtilis* en dos condiciones de crecimiento distintas: aerobiosis (matraces con 50.0 mL de medios modificados, 36 °C, 150 rpm) y microaerofilia (tubos de ensayo con tapón de baquelita con 7.0 mL de medios modificados, 36 °C). El medio de cultivo modificado es caldo nutritivo suplementado con 0.15 M de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, 0.6 M de NaClO_4 ó 0.6 M de KClO_3 . Todos los cultivos se ajustaron a una densidad óptica inicial de 0.1, lambda de 630 nm (DO_{630}). En anaerobios y después de 72 h de incubación, se obtuvieron densidades de 0.5, 1.3 y 1.2 DO_{630} en cada medio modificado respectivamente. En condiciones estáticas de microaerofilia y después de 96 h de incubación, se obtuvieron densidades de 0.25, 0.2 y 0.25 DO_{630} en cada medio modificado respectivamente. Experimentos paralelos en microaerofilia, empleando resazurina como indicador del estado redox, señalaron la posible presencia de O_2 en esas condiciones.

Enero-Marzo de 2021

En la segunda etapa de experimentos se buscó desplazar al I O_2 inyectando N_2 a los tubos que contenían a los medios de cultivo. Se aumentó el volumen del medio modificado a 8.0 mL. Para estos experimentos se establecieron concentraciones de las sales oxidoradas equivalentes a las determinaciones de perclorato hechas por la misión *Phoenix* y el orbitador *Mars Reconnaissance*. Las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla 1.

Se ensayaron solo las concentraciones de $Mg(ClO_4)_2$ con las bacterias *B. subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Pseudomonas stutzeri*. Las especies de *Bacillus* se crecieron en caldo nutritivo, mientras que *P. stutzeri* se creció en Luria Bertani, ambos medios suplementados con la sal y las concentraciones indicadas en la tabla 1. Las condiciones de cultivo anaerobias son 36 °C, 150 rpm y 0.1 DO_{630} inicial.

| Tabla 1. Relación de las concentraciones molares de sales equivalentes al ion perclorato. | | | |
|---|---------------|-----------|-----------|
| ClO_4^- | $Mg(ClO_4)_2$ | ClO_3^- | $NaClO_3$ |
| 0.15 | 0.075 | 0.15 | 0.15 |
| 0.25 | 0.125 | 0.25 | 0.25 |
| 0.35 | 0.175 | 0.35 | 0.35 |
| 0.45 | 0.225 | 0.45 | 0.45 |
| ClO_4^- | $NaClO_4$ | ClO_3^- | $KClO_3$ |
| 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 0.35 | 0.35 | 0.35 | 0.35 |
| 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.45 |

Las tres bacterias son tolerantes a las concentraciones de perclorato estudiadas. Sin embargo, ninguna cepa logró un crecimiento acelerado en las condiciones ensayadas (Figuras 1 y 2).

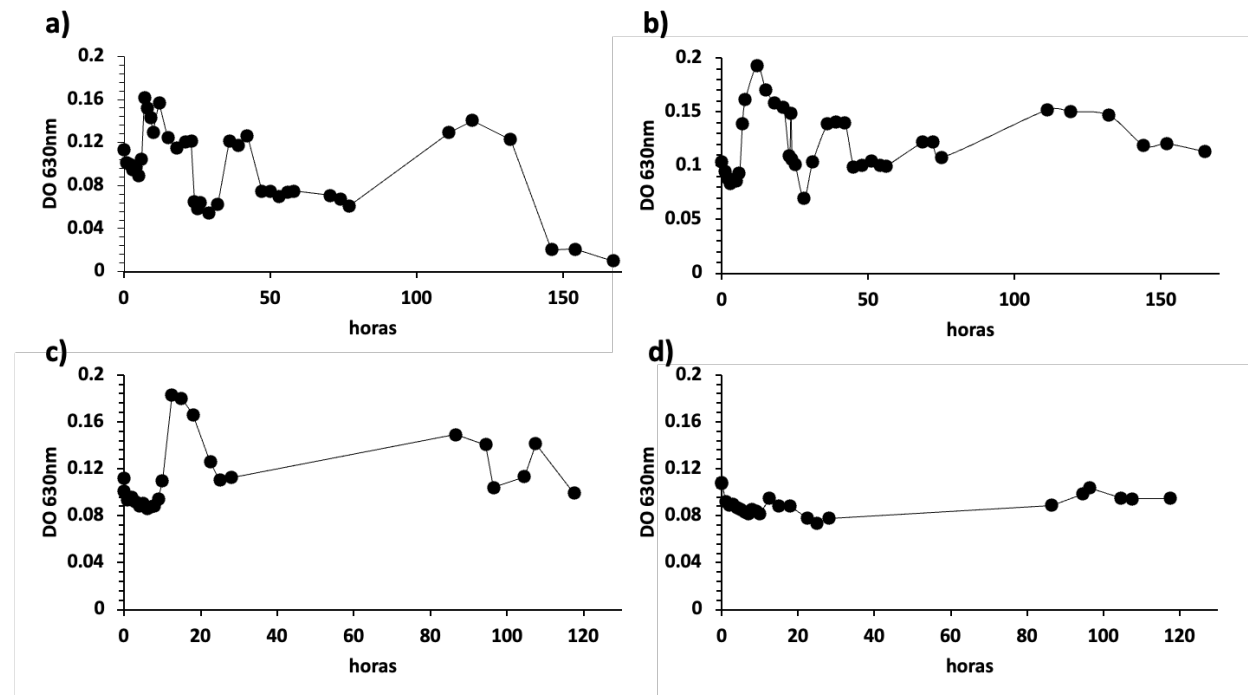


Figura 1. Densidad poblacional de *B. subtilis* en distintas concentraciones del ion perclorato. La bacteria se creció en caldo nutritivo suplementado con $Mg(ClO_4)_2$ a concentraciones equivalentes del ion ClO_4^- de 0.15 (a), 0.25 (b), 0.35 (c) y 0.45 M (d).

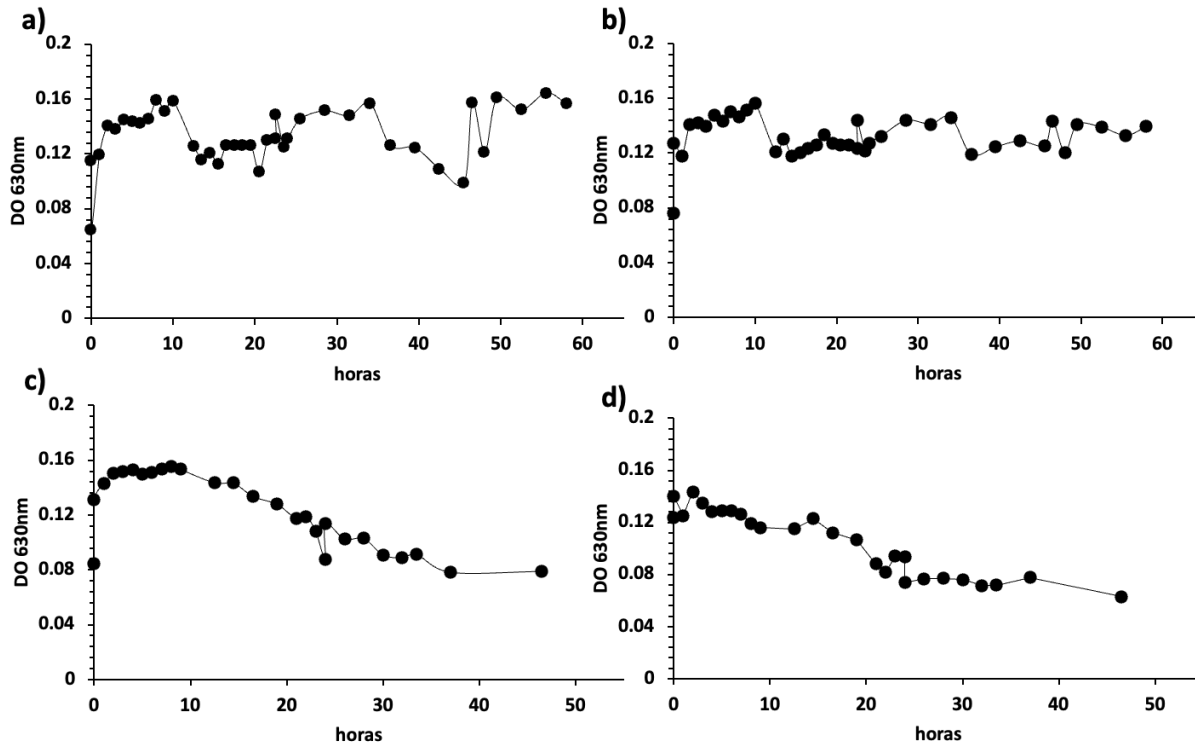


Figura 2. Densidad poblacional de *B. pumilus* y *P. stutzeri* a distintas concentraciones de perclorato. *B. pumilus* (a y b) y *P. stutzeri* (c y d) en caldo nutritivo suplementado con $Mg(ClO_4)_2$ a concentraciones equivalentes del ion ClO_4^- de 0.25 (a y c) y 0.35 M (b y d).

También se determinó el valor del pH al inicio y final de la incubación (Figura 3). Se encontró que *B. subtilis* acidifica moderadamente su medio en comparación con *P. stutzeri* que no presenta cambios.

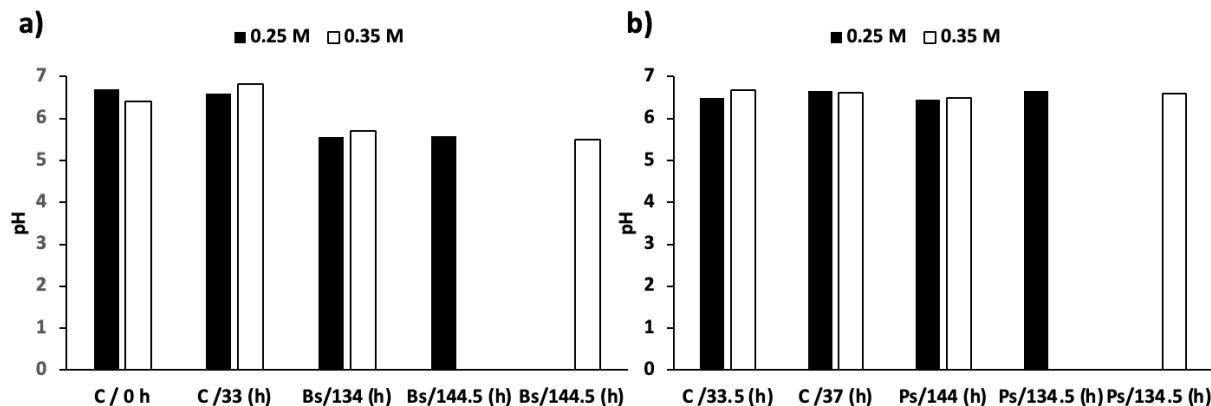


Figura 3. Cambios en el pH de los cultivos bacterianos. *B. subtilis* (a) se creció en caldo nutritivo y *P. stutzeri* (b) en Luria Bertani, ambos medios se suplementaron con $Mg(ClO_4)_2$ a concentraciones equivalentes del ion ClO_4^- .

En esta etapa también se estudiaron los cambios poblacionales bacterianos cuando se agrega a los cultivos suelo análogo a Marte. Para tal efecto, se montaron preparaciones para microscopía de fluorescencia (Figura 4). Las bacterias presentaron distintas morfologías, como filamentos que podrían indicar el estrés de la población bajo las condiciones ensayadas (Figuras 4a y b). Se observó también que las partículas de suelo son fluorescentes (Figura 4c), por lo que es necesario filtrar los cultivos previos a la tinción y posteriormente llevar a cabo el conteo celular. No se realizaron ensayos con la bacteria *C. marina* porque no se contaba con el medio adecuado para su crecimiento óptimo.

Durante esta etapa experimental se incorporaron el Dr. Pavel Martínez Pabello del Instituto de Geología de la UNAM y el estudiante Antonio López Ruiz de la Facultad de Biología de la UACJ. El Dr. Martínez-Pabello colaboró en los experimentos de crecimiento bacteriano generando el protocolo para el crecimiento en suelo simulado de Marte (MMS-2, *Green Garden*) y el sistema de detección de producción de cloruro en los medios de cultivo mediante titulación con nitrato de plata.

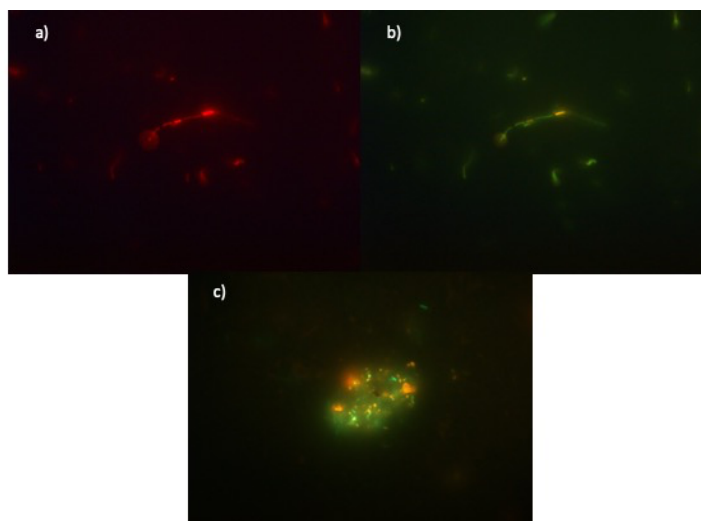


Figura 4. Micrografía de fluorescencia de los cultivos de *B. subtilis* en 0.35 M de perclorato y de *P. stutzeri* con suelo MMS-2. Las bacterias se tiñeron con el reactivo *live/dead* de *Invitrogen*.

Abril-Junio de 2021

Debido a los modestos cambios en la densidad poblacional observados en los cultivos a distintas concentraciones de perclorato, se decidió adicionar acetato de sodio al medio de cultivo, según lo indicado en la tabla 2, para favorecer la movilización de electrones en la cadena respiratoria bacteriana.

| Condición de cultivo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | [M] | | | | | | |
| Mg(ClO ₄) ₂ | 0 | 0.125 | 0.175 | 0.005 | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| CH ₃ COONa | 0 | 0 | 0 | 0.02 | 0.02 | 0.25 | 0.5 |
| (ClO ₄) ₂ ⁻ * | 0 | 0.25 | 0.35 | 0.01 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |

* Concentraciones molares equivalentes del ion.

Se prepararon cultivos de *B. pumilus* en caldo nutritivo suplementado con las distintas relaciones de las sales. Condiciones de los cultivos anaerobios: 36 °C, 150 rpm y 0.1 DO₆₃₀ inicial.

Se observó que *B. pumilus* aumenta moderadamente su crecimiento a 0.25 M de perclorato cuando se adiciona acetato de sodio al medio de cultivo (Figura 5). Sin embargo, estos cambios no se deben a la reducción de perclorato (Tabla 3), sino a la posible fermentación del acetato.

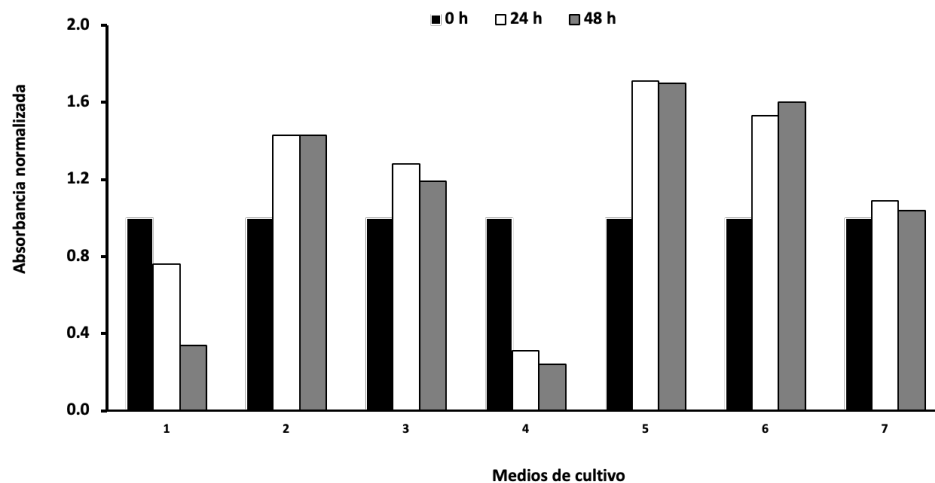


Figura 5. Crecimiento de *B. pumilus* a distintas relaciones de sales de perclorato y acetato de sodio. Los números indican los medios empleados (tabla 2) para crecer a la bacteria.

| Medios de cultivo* | 4 | 5 | 6 |
|--------------------|---------------------|-------|-------|
| | Cl ⁻ [M] | | |
| 0 h | 0.009 | 0.011 | 0.015 |
| 120 h | 0.003 | 0.01 | 0.008 |
| | pH | | |
| 0 h | 7.05 | 6.63 | 7.14 |
| 120 h | 6.22 | 5.82 | 6.42 |

* Suplementos del cultivo descritos en la tabla 1.

Identificación de la actividad de reductasas y dismutasas expresadas por *B. subtilis* y *C. marina* al exponerlas a medios modificados con KClO_3 , NaClO_3 , NaClO_4 y $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ en condiciones de gravedad terrestre. No se pudo concretar esta actividad debido a que ninguna de las especies ensayadas mostró un crecimiento franco bajo las condiciones experimentales. En el mismo sentido, el método de titulación argentométrica de cloruros resultó poco sensible para detectar cambios menores. Por lo que ha sido difícil asumir una actividad enzimática importante que implique el metabolismo del perclorato.

II) Actividades de docencia

Participación como Profesora invitada en la materia optativa de Astrobiología impartida en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UAEM. La participación se hizo a través de la plataforma virtual eUAEM durante los periodos lectivos de Septiembre-Diciembre de 2020 y Enero-Junio de 2021.

III) Actividades de investigación y extensión

Escritura de un artículo de investigación original que será enviado a la revista Environmental Microbiology para un número especial sobre extremófilos en ambientes extremos. En noviembre del 2020 se remitió del artículo "The potential habitability of Europa's ocean" por Eya C. Rodríguez Pupo, Daira G. Rubio Mendoza, José J. Olmos-Espejel, Perla Abigail, Figueroa González, Josue Vázquez Herrera, Marisela Aguirre-Ramírez, and Sandra I. Ramírez, en Environmental Microbiology (IF: 4.93), número especial Ecophysiology of extremophiles: Insights into extraterrestrial

environments. En enero del 2021 el artículo fue arbitrado, se sugirió atender las correcciones y enviar el manuscrito a la revista *Environmental Microbiology Reports* (IF: 2.975).

Participación en la Segunda Reunión de la Red Mexicana de Extremófilos. Los resultados de la primera etapa experimental se presentaron en el *International Workshop of Extremophile Organisms: Preserving the Biodiversity, Cosmovision and Cultural Heritage of the Extreme Ecosystems and 2d Meeting of the Mexican Association of Extremophiles*, celebrado en la Ciudad de Oaxaca, del 27 al 31 de octubre de 2020. Participación con el cartel "Growth of *Bacillus subtilis* into chlorinated oxyanions seemingly Mar's brines conditions" por Marisela Aguirre Ramírez y Sandra I. Ramírez Jiménez.

Preparación del protocolo "Caracterización de solutos compatibles de bacterias extremófilas mediante RMN" por Sandra I. Ramírez Jiménez y Marisela Aguirre Ramírez para ser publicado en Manual de Métodos para el Estudio de Extremófilos coordinado por la Red Mexicana de Extremófilos (2021).

Preparación de un artículo de divulgación. Manuscrito titulado "Estrategias de adaptación de organismos extremófilos ante oxianiones clorados en ambientes simulados de Marte" por Sandra I. Ramírez Jiménez y Marisela Aguirre Ramírez para ser publicado en el segundo número de la revista de nueva creación Ciencias y Humanidades de Frontera de CONACyT (2021).

Participación en la celebración del 25 Aniversario del Centro de Investigaciones Químicas, UAEM. Se elaboró el cartel "Cloratos y percloratos ¿amigos o enemigos de las bacterias halotolerantes?" por Sandra I. Ramírez Jiménez, Marisela Aguirre Ramírez, Pável U. Martínez Pabello y Víctor A. López Ruiz. El evento se llevó a cabo de manera virtual a través de canales de Twitter, el 3 de mayo del 2021.

Participación en el 3er. Congreso Latinoamericano de Astrobiología. Se elaboró el cartel "Tolerancia de *Bacillus pumilus* a percloratos: Implicaciones en la habitabilidad de Marte" por Marisela Aguirre R., Pável U. Martínez P., Víctor A. López R. y Sandra I. Ramírez J. El evento se organizó de manera virtual a través de la plataforma Meetanyway del 3 al 6 de agosto del 2021.

Agradezco su atención y les envío un cordial saludo.

Atentamente



Dra. Marisela Aguirre Ramírez
Profesora-Investigadora
Instituto de Ciencias Biomédicas, UACJ