



Trabajo Fin de Grado Experimental  
Aislamiento de nuevas  
cepas de *Spiribacter*.  
Estudio de los mecanismos  
de osmorregulación de  
*Spiribacter salinus*

**Salud Rodríguez Pallares**

Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla  
Julio de 2017







Universidad de Sevilla  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología y Parasitología  
Grado en Farmacia

## Trabajo Fin de Grado Experimental

Aislamiento de nuevas cepas de  
*Spiribacter*.

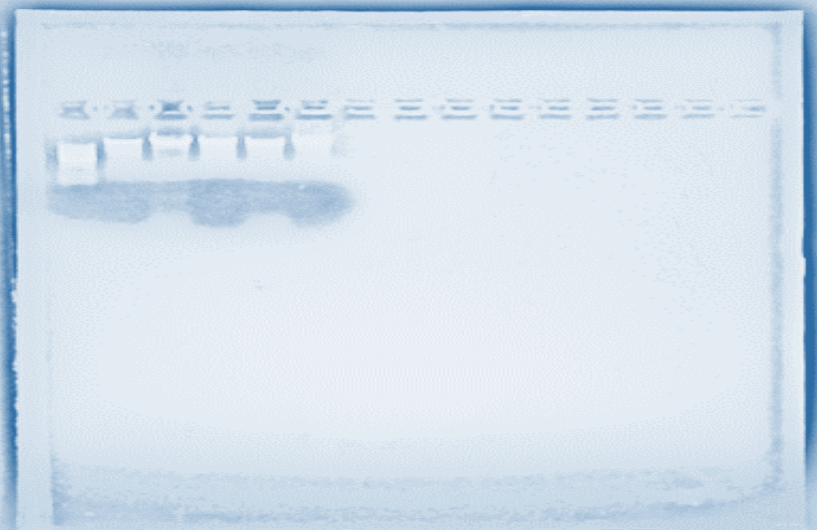
Estudio de los mecanismos de  
osmorregulación de *Spiribacter salinus*

**Salud Rodríguez Pallares**

**Presentado en:** Sevilla, Julio de 2017

**Tutores:** María José León León

Cristina Sánchez-Porro Álvarez





## AGRADECIMIENTOS

A **Antonio y Cristina** por concederme la oportunidad de haber entrado y estar actualmente realizando este proyecto, pero sobre todo por permitirme comenzar mi carrera investigadora, que aunque hasta ahora corta, espero que pueda seguir creciendo conmigo.

A **María José** por ser la persona que ha compartido conmigo todos sus conocimientos y sus preciados *Spiribacter*, permitiéndome desarrollarme, y no solo a nivel profesional sino también a nivel personal. He intentado que fueras mi ejemplo a seguir durante este tiempo en el que he trabajado en el laboratorio porque te has merecido serlo. A **Ana** por su compañía y su paciencia para explicarme las cosas, siempre con una sonrisa. A **Blanca** por su interés, compañía y ayuda durante estos últimos meses. A **Rafa** por su alegría constante al entrar, por sus vídeos *frikis* y por sus explicaciones siempre llenas de entusiasmo.

A **Carolina** por su ayuda para resolver todos mis problemas de forma totalmente altruista, sin tu implicación probablemente hoy no habría llegado a entregar este trabajo. Te has convertido en un gran referente para mí. A **Rosa, Emi y Lourdes** por ofrecerme su ayuda en todo momento en estos últimos meses.

A **mis padres** pues al fin y al cabo si no fuera por ellos hoy no estaría aquí, gracias por vuestro apoyo incondicional y por vuestra educación, gracias a la cual hoy he llegado a ser una parte de lo que quiero ser. A **mis hermanos**, una parte tan importante de mi vida que es prácticamente indescriptible, por vuestro apoyo desde cada uno de los lugares en los que os encontráis, por superar cada barrera que hemos tenido. A **Carmen y Pepe** por saber llevar las situaciones y apoyarme como si fuese vuestra "hija", nunca habría podido elegir unos mejores segundos padres.

A **Luis** pues sin ti probablemente no habría conseguido centrarme, por apoyarme incondicionalmente sin pedir nada más a cambio que mi compañía. Por revisar mi trabajo, por quitarme pesos innecesarios de encima y por no ver nada como imposible, pero sobre todo por hacer posible creer en un mundo diferente.

*"Esta vil arena que oprimís bajo los pies, echadla en el horno, que se convertirá en espléndido cristal; y gracias a él, Galileo y Newton descubrirán astros"*





## RESUMEN

El género *Spiribacter* se encuentra ampliamente distribuido en los sistemas acuáticos con salinidades intermedias. *Spiribacter salinus* M19-40 es la cepa representante del género, y es con ella con la que hemos realizado los estudios de osmorregulación, sometiéndola a altos niveles de estrés osmótico. Estos se han centrado en los sistemas de entrada, de síntesis y de uso como nutriente de los solutos compatibles, con el fin de comprender como sobrevive en los ecosistemas extremófilos donde se encuentra. Por los resultados obtenidos afirmamos que la glicina betaína es el soluto compatible que ejerce una mayor osmoprotección en esta especie, aunque también la ejercen la colina-O-sulfato, el dimetilsulfoniopropionato y la ectoína, aunque esta última no es tomada del medio, si no que la sintetiza de manera proporcional al estrés osmótico al que se encuentran sometidas las células de *S. salinus*. Además puede utilizar la glicina betaína como nutriente. Por el contrario, la colina ejerce un efecto tóxico sobre las células de *S. salinus*.

Con el fin de entender y conocer la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos salinos intermedios, se procedió al aislamiento de nuevas cepas de dichos ambiente. Hemos aislado las cepas SP30, SP10B, SP33B y SP62 de las salinas localizadas en Santa Pola. La cepa SP30 se ha sometido a una caracterización fenotípica, genotípica y quimiotaxonómica, tras la cuál proponemos a dicha cepa como una nueva especie del género *Spiribacter*, con el nombre *Spiribacter aquaticus* sp. nov. Se ha realizado un estudio filogenético y genotípico de la cepa SP10B, y a falta de terminar la caracterización, se propone como una nueva especie del género *Spiribacter*. Por último, las cepas SP33B y SP62 se proponen como dos nuevas cepas de la especie *Spiribacter salinus*.

**Palabras clave:** *Spiribacter*, bacterias halófilas, ambientes hipersalinos, osmorregulación.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>pág. 1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>pág. 3</b>
<b>I. 1. Ambientes extremos</b>	<b>pág. 3</b>
<i>I. 1. 1. Ambientes hipersalinos</i>	pág. 3
<b>I. 2. Microorganismos halófilos</b>	<b>pág. 4</b>
<i>I. 2. 1. Filogenia y taxonomía</i>	pág. 4
<i>I. 2. 2. Osmorregulación</i>	pág. 6
<b>I. 3. Salinas solares</b>	<b>pág. 8</b>
<i>I. 3. 1. Salinas “Bras del Port”</i>	pág. 9
<i>I. 3. 2. Salinas de Isla Cristina</i>	pág. 10
<b>I. 4. Caracterización taxonómica de especies microbianas</b>	<b>pág. 10</b>
<b>I. 5. Género <i>Spiribacter</i></b>	<b>pág. 11</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>pág. 12</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>pág. 12</b>
<b>III. 1. Estudio de los mecanismos de osmorregulación de <i>Spiribacter salinus</i></b>	<b>pág. 12</b>
<i>III. 1. 1. Rango de crecimiento en NaCl</i>	pág. 12
<i>III. 1. 2. Determinación de ectoína mediante HPLC</i>	pág. 13
<i>III. 1. 3. Solutos compatibles como protectores frente al estrés osmótico</i>	pág. 13
<i>III. 1. 4. Utilización de solutos compatibles como nutrientes</i>	pág. 13
<b>III. 2. Muestreo y tratamiento de las muestras</b>	<b>pág. 14</b>
<b>III. 3. Medios y condiciones de cultivo</b>	<b>pág. 14</b>
<i>III. 3. 1. Medio SMM</i>	pág. 14
<i>III. 3. 2. Medio SW</i>	pág. 14
<b>III. 4. Aislamiento de nuevas cepas del género <i>Spiribacter</i></b>	<b>pág. 14</b>
<b>III. 5. Extracción, purificación y determinación de la concentración y pureza del ADN</b>	<b>pág. 15</b>
<i>III. 5. 1. Extracción del ADN de las cepas aisladas</i>	pág. 15
<i>III. 5. 2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	pág. 16
<i>III. 5. 3. Determinación de la concentración y pureza del ADN</i>	pág. 16
<i>III. 5. 4. Amplificación de la secuencia del gen ARNr 16S por PCR</i>	pág. 16
<b>III. 6. Análisis filogenético de las cepas aisladas</b>	<b>pág. 17</b>
<b>III. 7. Caracterización taxonómica de las cepas aisladas</b>	<b>pág. 18</b>
<i>III. 7. 1. Determinación de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas</i>	pág. 18
<i>III. 7. 2. Estudio genotípico de las cepas seleccionadas</i>	pág. 19
<i>III. 7. 3. Estudio quimiotaxonómico de las cepas seleccionadas</i>	pág. 21
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>pág. 21</b>
<b>IV. 1. Estudio de los mecanismos de osmorregulación en <i>Spiribacter salinus</i></b>	<b>pág. 21</b>
<i>IV. 1. 1. Rango de crecimiento en NaCl</i>	pág. 22
<i>IV. 1. 2. Síntesis de ectoína</i>	pág. 23
<i>IV. 1. 3. Solutos compatibles como protectores frente al estrés osmótico</i>	pág. 24
<i>IV. 1. 4. Utilización de solutos compatibles como nutrientes</i>	pág. 26
<b>IV. 2. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas del género <i>Spiribacter</i></b>	<b>pág. 28</b>
<i>IV. 2. 1. Aislamiento y caracterización de la cepa SP30</i>	pág. 29
<i>IV. 2. 2. Aislamiento y caracterización de las cepas SP10B, SP33B y SP62</i>	pág. 33
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>pág. 34</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>pág. 34</b>



## I. INTRODUCCIÓN

### I. 1. Ambientes extremos

Es difícil encontrar una definición adecuada para el término “ambiente extremo”, aunque si podemos decir que en todas las definiciones descritas en la literatura definen estos ambientes como aquellos en los que encontramos unas condiciones de vida muy lejanas a las consideradas normales para el ser humano y organismos superiores, y en las que no todos los grupos taxonómicos pueden crecer (Brock, 1979; Ventosa, 2006). Por tanto, podríamos definir un ambiente extremo como aquel en el que coexisten valores extremos de uno o varios factores tales como el pH, la temperatura, la concentración de sales, la concentración de nutrientes o metales tóxicos, la concentración de oxígeno, el potencial redox o la actividad del agua (Rodríguez-Valera, 1988; Ventosa, 2006). Es en estas condiciones donde habitan los denominados organismos extremófilos (León, 2015). Dichos organismos presentan capacidades únicas, las cuáles les permiten vivir óptimamente en dichos ambientes extremos, y son estas las que los hacen tan interesantes desde un punto de vista biotecnológico en diversos ámbitos.

#### I. 1. 1. Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos constituyen un claro ejemplo de ambiente extremo, en los que el factor limitante principal de la vida es la elevada concentración de sales. Estos ecosistemas pueden presentar además elevadas o bajas temperaturas, valores de pH extremos, bajas concentraciones de oxígeno, limitación de nutrientes, metales pesados y otros compuestos tóxicos y estar sometidos a una intensa radiación solar (Javor, 1989; Rodríguez-Valera, 1993; Ventosa, 2006). Estos factores hacen que en dichos ambientes predominen los organismos procariontes y los virus, con la presencia de algunos organismos del dominio *Eukarya*, como es el alga verde *Dunaliella*, un importante productor de nutrientes (Luk et al., 2014; Ventosa et al., 2015) o el crustáceo *Artemia salina* (Luk et al., 2014; Ventosa et al., 2015).

Los ambientes hipersalinos están constituidos principalmente por sistemas acuáticos y suelos hipersalinos (Ventosa et al., 2006), aunque también se incluyen en esta categoría los depósitos de sal y una gran variedad de productos salados, entre otros (Ventosa, 2006; León et al., 2015).

A su vez, los ambientes acuáticos hipersalinos se clasifican en dos grandes grupos según su origen y la proporción de sales. Los ambientes acuáticos **talasosalinos** son aquellos que proceden del agua del mar y por tanto presentan una proporción de sales similar a la misma con un predominio de iones monovalentes. Las salinas, utilizadas para la producción de sal común por evaporación del agua del mar, son un claro ejemplo de ambientes hipersalinos talasosalinos. Por otro lado, los ambientes acuáticos **atalasosalinos** tienen su origen en la disolución de

depósitos minerales de origen continental, con un predominio de iones divalentes (León et al., 2015; Ventosa et al., 2015). Estos sistemas reflejan la geología, topología y condiciones climáticas del lugar de donde proceden (León et al., 2015). El Mar Muerto es un ejemplo de hábitat atalasalino, con una concentración de sales del 34 %.

Los suelos salinos son un hábitat menos estudiado, aunque se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta. Un ejemplo de este tipo de hábitat son los suelos de Rambla Salada (Murcia), en el sureste de España, o los suelos salinos presente en Isla Bacuta, Huelva.

## I. 2. Microorganismos halófilos

Etimológicamente, el término “halófilo” proviene del griego hals (sal) y phil (amigo, amor), es decir, “amante o amigo de la sal”. Los microorganismos halófilos son aquellos que no solo sobreviven a concentraciones de sales superiores a las consideradas normales, sino que las requieren para crecer y prosperar. Existen varias clasificaciones de microorganismos halófilos, siendo una de las más ampliamente utilizadas la propuesta por Kushner y Kamekura en el año 1988, basándose en la concentración de NaCl requerida para su crecimiento óptimo. Atendiendo a ella, los microorganismos se clasifican en:

- **No halófilos:** presentan un crecimiento óptimo a concentraciones inferiores a 0,2 M NaCl (inferior al 1 % NaCl). Algunos pueden tolerar elevadas concentraciones de sales y se les denomina **halotolerantes**.
- **Halófilos débiles:** su crecimiento óptimo tiene lugar entre 0,2 y 0,5 M NaCl (1-3 % NaCl).
- **Halófilos moderados:** crecen óptimamente entre 0,5 y 2,5 M NaCl (3-15 % NaCl).
- **Halófilos extremos:** con un crecimiento óptimo entre 2,5 y 5,2 M NaCl (15-32 % NaCl).

Hay que tener en cuenta que esta clasificación se basa en el crecimiento óptimo de los microorganismos en los medios de laboratorio, sin tener en cuenta la concentración de sales a la que se encuentran en su hábitat natural, de donde se aíslan los diferentes grupos de microorganismos (Ventosa et al., 2014).

### I. 2. 1. Filogenia y taxonomía

En los ambientes hipersalinos se encuentran representantes pertenecientes a los tres dominios de la vida, en los que se dividen atendiendo a la subunidad menor del ARN ribosómico (Ventosa, 2006; McGenity y Oren, 2012). Tradicionalmente solo se hablaba de dos grandes grupos presentes en estos ambientes; por un lado, las arqueas aerobias halófilas extremas (también denominadas haloarqueas), las cuáles habitan fundamentalmente los cristalizadores de las salinas, y por otro lado, las bacterias halófilas moderadas, presentes en los estanques con salinidades intermedias (de la Haba et al., 2011). Actualmente se sabe que existe una amplia

diversidad tanto fisiológica como metabólica de especies microbianas en estos ambientes, con especies pertenecientes a una gran variedad de grupos filogenéticos, presentes tanto en estanques cristalizadores como en los concentradores.

#### - **Taxonomía de *Archaea***

Las arqueas halófilas están incluidas dentro del filo *Euryarchaeota*. Se encuentran representadas por arqueas aerobias halófilas extremas, también conocidas como haloarqueas, pertenecientes a la clase *Halobacteria* (Grant et al., 2001) y por algunas arqueas metanógenas halófilas. Las haloarqueas se encuentran englobadas en una única clase, *Halobacteria*, la cual incluye tres órdenes: *Natrialbales*, *Haloferacales* y *Halobacteriales*, cada uno de ellos con una familia: *Natrialbaceae*, *Haloferacaceae* y *Halobacteriaceae*, respectivamente (Grant et al., 2001; Gupta et al., 2015).

#### - **Taxonomía de *Bacteria***

El dominio *Bacteria* es bastante más amplio y diverso que el dominio *Archaea*, con representantes halófilos moderados y extremos pertenecientes a una amplia variedad de taxones. Se trata de un grupo muy heterogéneo de microorganismos con diferentes propiedades bioquímicas, morfológicas, metabólicas y respiratorias.

Se han descrito especies de bacterias halófilas de al menos 8 fila: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* y *Thermotogate*, siendo la fila con un mayor número de representantes halófilos: *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Ventosa et al., 2012).

El filo *Proteobacteria* fue propuesto por Garrity y colaboradores (2005) basándose en el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. Dentro del filo *Proteobacteria* encontramos dos clases especialmente abundantes en ambientes hipersalinos: *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (de la Haba et al., 2011).

Actualmente, la caracterización taxonómica de bacterias y arqueas halófilas se basa en una combinación de un análisis filogenético y una caracterización fenotípica, genotípica y quimiotaxonómica.

#### - **Taxonomía de *Eukarya***

Los organismos eucariotas también se encuentran en los ambientes hipersalinos, aunque principalmente en aquellos con salinidades más bajas, puesto que su presencia disminuye al aumentar la salinidad del hábitat. Gracias a diferentes estudios se ha puesto de manifiesto la presencia de diversos organismos eucariotas, tales como algas, diatomeas, protozoos y hongos (Ventosa, 2006).

### - Taxonomía de virus

Los virus también están presentes en los ambientes hipersalinos. Son los sistemas acuáticos hipersalinos, de todos los ambientes estudiados hasta el momento, los que contienen una mayor densidad de partículas víricas (Atanasova et al., 2015). Los virus más abundantes en este ecosistema se conocen como haloarqueovirus, ya que infectan las haloarqueas (Luk et al., 2014).

#### I. 2. 2. Osmorregulación

La capacidad para detectar y responder de una forma adecuada a los cambios de osmolaridad del medio externo, tanto genética como fisiológicamente, es fundamental para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos (Kempf y Bremer, 1998; Wood et al., 2001).

Actualmente se conocen dos estrategias que son utilizadas por los microorganismos con el fin de equilibrar osmóticamente su citoplasma con el medio que les rodea (León, 2015):

- **“Salt-in”**. Consiste en la acumulación de sales inorgánicas en el citoplasma, principalmente KCl (Oren et al., 2002; Deole et al., 2013). Esta estrategia requiere de una adaptación de la maquinaria enzimática intracelular y de los componentes estructurales intracelulares, como las proteínas, las cuales tienen que mantener su conformación y actividad a concentraciones de sales muy elevadas. Estos microorganismos, la mayor parte de las veces, no sobreviven en ausencia o a bajas concentraciones de sales (Oren, 2008). Una de las modificaciones intracelulares que sufren estos microorganismos es la acidificación del proteoma debido al aumento de aminoácidos ácidos tales como el glutamato y el aspartato, con el fin de neutralizar las cargas positivas procedentes de las sales que acumulan en el interior (Vauclare et al., 2015). Además estos microorganismos presentan variaciones en la composición lipídica de la membrana, se ven aumentados los lípidos aniónicos y disminuidos los catiónicos (Russell y Kogut, 1985; Russell, 1989; Sutton et al., 1991; León, 2015).

Debemos tener en cuenta que actualmente hay descritos varios casos en los que esta acidificación del proteoma no está ligada al uso de esta estrategia, y microorganismos que a pesar de utilizar esta estrategia, sobreviven sin poseer un proteoma especialmente ácido (Bardavid y Oren, 2012).

Este mecanismo de osmoadaptación tiene lugar fundamentalmente en haloarqueas aunque no exclusivamente ya que también se ha detectado en bacterias anaerobias del orden *Halanaerobiales* (Firmicutes) y en especies de bacterias halófilas extremas del género *Salinibacter* (Bacteroidetes) (León, 2015).

- **"Salt-out"**. Consiste en la expulsión de sales desde el citoplasma al exterior celular y la acumulación en el interior de la célula de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, altamente solubles en agua y cuyas propiedades físico-químicas los hacen compatibles con la fisiología y bioquímica celular, conocidos como **solutos compatibles** (Widderich et al., 2014). Los microorganismos que utilizan esta estrategia a menudo son capaces de adaptarse a un intervalo sorprendentemente amplio de salinidad. Algunos de estos solutos compatibles son la glicina betaína, la ectoína, la hidroxiectoína y otros derivados de aminoácidos, azúcares y alcoholes (Widderich et al., 2014). Esta estrategia es ampliamente utilizada por miembros del dominio *Bacteria*, por algunos miembros del dominio *Archaea* como las arqueas metanógenas, y por algunos eucariotas como el alga *Dunaliella* (Ventosa y Arahal, 2002).

Las células microbianas acumulan estos compuestos en su citoplasma, bien procedentes del medio externo a través de sistemas de transporte específicos regulados osmóticamente, o bien, mediante las síntesis de *novo* (Ziegler et al., 2010). El contenido celular en solutos compatibles está determinado por el grado de estrés osmótico presente en el medio externo, alcanzando concentraciones molares en el interior de la célula a altas concentraciones de sales en el medio externo. En este último caso es un proceso lento ya que requiere la síntesis de proteínas específicas, por ello la vía de elección es la captación desde el medio externo (Wood, 2011).

Debido a las concentraciones extremadamente bajas de estos compuestos en los ambientes externos (nM o  $\mu$ M), se necesitan sistemas de transporte que posean una alta afinidad por ellos (Nau-Wagner et al., 1999; Pittelkow et al., 2011). Existe una gran cantidad de transportadores, y cada uno presenta diferentes especificidades de sustrato. Los representantes de las distintas familias de transportadores son (Gramman et al., 2002; Ziegler et al., 2010):

- **ABC** (ATP Binding Cassette Transporter): en esta familia se encuentran los transportadores ProU, OpuA, OpuB y OpuC. Estos transportadores son capaces de permitir el paso a una amplia variedad de solutos compatibles, la mayoría de ellos presentan especificidad frente a la glicina betaína, la prolina, la colina y el dimetilsulfopropionato (DMSP) entre otros. El transportador OpuB es específico de la colina.
- **BCCT** (Betaine-Choline-Carnitine Transporter): BetT/BetU, OpuD, BetP, EctP, LcoP y EctT son los transportadores pertenecientes a esta familia. Es una familia de transportadores que presentan una amplia gama de solutos compatibles afines a ellos, entre los que encontramos la colina, la glicina-betaína y la prolina, entre otros.
- **MFS** (Major Facilitator Superfamily): ProP y OusA son los componentes de este grupo. Esta familia facilita el paso de la glicina betaína, la prolina y la ectoína.

- **SSS** (Sodium-Solute Symporter Family): solo presenta un transportador, OpuE que permite el paso de prolina a través de la membrana.
- **TRAP** (Tripartite ATP-independent Periplasmic Transporter Family): TeaABC, que presenta tres proteínas homólogas (TeaA, TeaB y TeaC), es un transportador específico de ectoína.

Un soluto compatible ampliamente utilizado por miembros del dominio *Bacteria* es la glicina betaína. Muchas especies microbianas pueden utilizar este compuesto no solo como osmoprotector, sino también como fuente de carbono, nitrógeno y energía, gracias a la conversión de este en piruvato (Wargo, 2013). La síntesis se realiza en dos reacciones enzimáticas, catalizadas por las enzimas GbsB y GbsA, partiendo de la colina (Boch et al., 1996).

La ectoína y su derivado hidroxilado, la 5-hidroxiectoína, constituyen también solutos muy utilizados como protectores frente al estrés osmótico. La ectoína es sintetizada a partir de L-aspartato- $\beta$ -semialdehído, a través de tres reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas EctA, EctB y EctC, cuyos genes estructurales se organizan tradicionalmente formando un operón. Este es transcrito cuando tiene lugar un aumento en la osmolaridad del medio externo (Widderich et al., 2014).

El dimetilsulfoniopropionato (DMSP) es un compuesto orgánico que forma parte del ciclo del azufre de nuestro planeta (Kiene et al., 2000), y que es producido en gran cantidad en los ecosistemas marinos. Los microorganismos pueden utilizarlo como agente osmoprotector y/o nutriente (Broy et al., 2015).

### I. 3. Salinas solares

Las salinas solares constituyen modelos excelentes para llevar a cabo análisis centrados tanto en la diversidad como en la ecología de los organismos, proporcionando un amplio rango de concentraciones salinas que va desde la concentración salina del agua de mar hasta la concentración de saturación de las sales (Ventosa et al., 2014; León et al., 2016). Dichas salinas están formadas por varios estanques con diferentes concentraciones de sales, en los que el agua se transfiere desde los estanques menos concentrados a los más concentrados, hasta alcanzar los estanques cristalizadores donde precipitan las sales (Ventosa et al., 2014).

La mayoría de los estudios realizados en salinas solares han tenido lugar en los estanques cristalizadores (Antón et al., 2000; Oh et al., 2010), siendo el conocimiento de los estanques con salinidades intermedias mucho más limitado.



A pesar de los avances en el conocimiento de la ecología microbiana en las últimas décadas, en general, los métodos tradicionales de cultivo no han permitido obtener en cultivo puro los microorganismos más relevantes de los diferentes ambientes naturales, conduciendo al aislamiento de numerosas especies de rápido crecimiento, pertenecientes a taxones que en la mayoría de los casos no constituyen la población microbiana predominante en dichos ambientes.

Gran parte de las secuencias genéticas que codifican el gen ARNr 16S obtenidas mediante estudios metagenómicos a partir de estanques con salinidades intermedias no se han podido asignar hasta el momento a ningún grupo taxonómico (Oren, 2015). No obstante, en los últimos años se han aislado en cultivo puro determinados grupos taxonómicos que han mostrado ser grupos mayoritarios en estos ambientes, como es el caso del género *Spiribacter* (León et al., 2014). Aún queda mucho por recorrer hasta conocer la biodiversidad microbiana presente en estos ecosistemas.

### I. 3. 1. Salinas "Bras del Port"

Las salinas "Bras del Port" (*Figura 1*) localizadas en Santa Pola (Alicante) constituyen una de las salinas mejor estudiadas desde un punto de vista microbiológico. En estas salinas, la concentración de cada estanque se mantiene constante mediante una regulación artificial automática. La temperatura aumenta de forma proporcional a la concentración de sal de los estanques, con un intervalo de 30-45 °C, y el pH se mantiene en torno a 7,5 (Rodríguez-Valera et al., 1981; Ventosa et al., 2014).



**Figura 1.** Fotografía aérea de las salinas "Bras del Port" en Santa Pola, Alicante.

Los estudios dependientes de cultivo han permitido la caracterización taxonómica de un gran número de microorganismos halófilos, pero con el tiempo ha sido necesario complementarlos con técnicas moleculares tales como PCR, DGGE o FISH (Antón et al., 1999; Antón et al., 2000; Casamayor et al., 2000; Benlloch et al., 2001) y estudios metagenómicos (Ventosa et al., 2015). Estos estudios han puesto de manifiesto que las técnicas dependientes de cultivo son deficitarias cuando el fin de la investigación es conseguir una representación real de la biodiversidad de estos ambientes, ya que permiten el aislamiento un porcentaje muy pequeño de las especies presentes. Es por ello que este trabajo tiene como uno de sus objetivos el descubrimiento de nuevos taxones que están presentes en estanques de salinidades intermedias en una alta proporción, siendo grandes representantes de estas salinidades, basándonos en estudios metagenómicos realizados previamente.

### I. 3. 2. Salinas de Isla Cristina

Las salinas de Isla Cristina (*Figura 2*), situadas al suroeste de España, en la localidad de Isla Cristina, Huelva, han sido objeto de estudio en los últimos años por el grupo de investigación en el que he realizado mi Trabajo Fin de Grado.



**Figura 2.** Fotografía de las salinas de Isla Cristina (Huelva).

En 2014 se realizó un estudio metagenómico comparativo para determinar la diversidad taxonómica presente en las salinas "Bras del Port" y en las salinas de Isla Cristina. Para ello se tomó una muestra de un estanque con una salinidad del 21 % de las salinas de Isla Cristina, con la obtención de un metagenoma, designado IC21, y varias muestras de diferentes estanques de las salinas "Bras del Port" (al 13, 19, 33, 37 % de salinidad), con la obtención de varios metagenomas; designados SS13, SS19, SS33 y SS37, respectivamente. Tras la comparación de los metagenomas se pudo afirmar que los filas *Euryarchaeota* y *Bacteroidetes*, además de la clase *Gammaproteobacteria*, se encontraban presentes en SS19, SS33 e IC21. Dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, el género *Spiribacter* fue identificado como uno de los más abundantes tanto en SS19 como en IC21. Aunque a nivel de filo y clase IC21 presenta una mayor semejanza con SS33, a nivel de género se encontraron grandes diferencias entre el metagenoma IC21, y SS19 y SS33, tanto en biodiversidad como abundancia de cada taxón (Fernández et al., 2014b).

### I. 4. **Caracterización taxonómica de especies microbianas**

Actualmente ambos dominios *Archaea* y *Bacteria* se caracterizan taxonómicamente basándose en la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S y las características fenotípicas, genotípicas y quimiotaxonómicas (Ventosa et al., 2012; León, 2015). La caracterización fenotípica debe incluir no solo aspectos tradicionales como son la morfología del microorganismo y de las colonias que forma, la temperatura y pH óptimos de crecimiento y su capacidad para utilizar diferentes sustratos o hidrolizar diferentes compuestos, sino que debe hacer referencia a otros aspectos englobados bajo el término de características quimiotaxonómicas. Estas características hacen referencia a la composición química de las células. Algunos ejemplos son la determinación de ácidos grasos, lípidos polares o lipoquinonas respiratorias, y la presencia y tamaño de ácidos micólicos (Tindall et al., 2010). En el dominio *Archaea* cobra gran importancia el análisis de lípidos polares con enlaces de tipo éter en sus membranas celulares, ya que es una característica típica de este dominio, y pueden detectarse mediante cromatografía en capa fina. Este análisis permite realizar una diferenciación a nivel de género dentro del dominio (Ventosa et al., 2012; León, 2015).

### I. 5. Género *Spiribacter*

El desarrollo de las técnicas independientes de cultivo, como se ha mencionado anteriormente, ha puesto de manifiesto que los microorganismos clásicamente aislados en el laboratorio procedentes de ambientes hipersalinos, no son los realmente predominantes. Por tanto, estos microorganismos no son buenos modelos de estudio para conocer los mecanismos de adaptación que se producen en este tipo de ambientes.

En un estudio metagenómico llevado a cabo por Ghai y colaboradores (2011) se describió la diversidad microbiana presente en las salinas de Santa Pola analizando para ello los metagenomas obtenidos de dos estanques de dichas salinas, uno al 37 % y otro al 19 %, denominados SS37 y SS19, respectivamente. Como resultado del análisis de SS19 se obtuvieron una gran cantidad de secuencias metagenómicas que no se correspondían con microorganismos previamente aislados. Entre estas secuencias aparecían un gran número de secuencias (15 % de la población total) pertenecientes a una o varias bacterias de la clase *Gammaproteobacteria* relacionada filogenéticamente con los géneros *Alkalilimnicola* y *Nitrococcus*. No ha sido hasta 2014 cuando se ha aislado en cultivo puro y se ha secuenciado el genoma completo de la especie *Spiribacter salinus*, bacteria a la cual pertenecen un gran número de secuencias presentes en SS19 (León et al., 2014).

El género *Spiribacter* pertenece a la familia *Ectothiorhodospiraceae*, en el orden *Chromatiales*, clase *Gammaproteobacteria*, en el filo *Proteobacteria*. Incluye especies halófilas moderadas, Gram negativas, no móviles, aerobias estrictas, con una morfología de bacilo curvado que avanza a espiral al llegar a la fase estacionaria, y forman colonias de color rosa (León et al., 2014).

Actualmente hay tres especies descritas pertenecientes a este género: *Spiribacter salinus* M19-40 (León et al., 2014), *Spiribacter curvatus* UAH-SP71 (León et al., 2015) y *Spiribacter roseus* SSL50 (León et al., 2016).

Se ha secuenciado el genoma completo de todas las especies del género *Spiribacter* poniendo de manifiesto que presentan los genomas más pequeños (1,7-1,9 Mb) descritos hasta el momento para un miembro de la familia *Ectothiorhodospiraceae*. Presentan una gran simplicidad metabólica, aunque son capaces de explotar al máximo los recursos disponibles en su ambiente. Además poseen un tamaño celular reducido y un peptidoglicano muy simplificado. Constituyen un claro ejemplo de bacterias “streamlined” (López-Pérez et al., 2013).

## II. OBJETIVOS

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la biodiversidad de los ambientes hipersalinos intermedios es hasta ahora la menos conocida dentro de los ambientes acuáticos hipersalinos. Gracias a los diversos estudios metagenómicos realizados en diferentes salinas en estanques con una concentración moderada de sales, se ha comprobado que los microorganismos hasta ahora aislados en esas concentraciones no se corresponden con los más abundantes, sino con los que crecen fácilmente en los medios de cultivo en el laboratorio. Esto puede llevar a unas conclusiones erróneas sobre el ecosistema en sí, pues se toman como microorganismos representantes los menos abundantes, y por tanto aquellos cuya adaptación no es la más efectiva.

Es por ello que cobra gran importancia, no solo el estudio de los procesos adaptativos de los microorganismos halófilos moderados abundantes en estos ambientes, sino también el estudio taxonómico con el fin de poder definir la biodiversidad real. Los estudios básicos como son los aislamientos de nuevas especies o cepas, son necesarios para poder seguir avanzando en los estudios de los sistemas salinos extremos en futuras investigaciones.

Por todo lo descrito anteriormente, los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Estudio de los mecanismos de osmorregulación utilizados por *Spiribacter*, usando para ello la especie tipo *S. salinus*, con el fin de conocer como hace frente a las altas concentraciones de sal a las que se encuentran sometidos estos microorganismos.
2. Aislamiento de nuevas cepas y/o especies pertenecientes al género *Spiribacter*, que ha demostrado ser un género especialmente abundante en los ambientes acuáticos con salinidades intermedias, y hasta hace poco, desconocido.
3. Caracterización taxonómica detallada basada en un estudio filogenético, fenotípico, quimiotaxonómico y genotípico de los microorganismos aislados.

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### III. 1. Estudio de los mecanismos de osmorregulación de *Spiribacter salinus*

#### III. 1. 1. Rango de crecimiento en NaCl

Para determinar con precisión el rango y la concentración de NaCl óptima para el crecimiento de *S. salinus* M19-40, las células se cultivaron en el medio SMM suplementado con concentraciones crecientes de NaCl, que oscilaron entre 0 M y 2,0 M de NaCl. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica de los mismos a una longitud de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ). Realizamos el experimento utilizando 3 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas cada una de ellas.

### III. 1. 2. Determinación de ectoína mediante HPLC

Análisis del contenido celular de ectoína mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Para determinar el contenido de ectoína en un cultivo celular sometido a distintas concentraciones de NaCl, las células se cultivaron en el medio de cultivo SMM suplementado con concentraciones crecientes de NaCl que oscilaron entre 0 M NaCl y 2,0 M de NaCl. A continuación, se centrifugaron los cultivos celulares hasta la obtención de un sedimento celular al cual se le realizó una extracción de ectoína con etanol al 20 %. Finalmente se determinó el contenido intra y extracelular de ectoína mediante HPLC.

### III. 1. 3. Solutos compatibles como protectores frente al estrés osmótico

Para los ensayos de osmoprotección se prepararon soluciones stock de los distintos solutos compatibles, esterilizados por filtración, con una concentración de 100 mM y se añadieron a los medios de cultivo hasta alcanzar una concentración final de 1 mM. Este experimento se realizó en el medio SMM con una concentración final de 2,0 M de NaCl, concentración a la cual las células de *S. salinus* se encuentran sometidas a un elevado estrés osmótico. Se utilizaron los siguientes solutos compatibles: colina-o-sulfato (COS), dimetilsulfoniopropionato (DMSP), glicina betaína, colina, hidroxiectoína, carnitina y ectoína. Este estudio se realizó utilizando 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas. Se incubaron a 37 °C y 200 rpm, determinándose la DO<sub>600</sub> a intervalos de 24 horas durante un período de aproximadamente 120 horas.

### III. 1. 4. Utilización de solutos compatibles como nutrientes

Para determinar la capacidad de *S. salinus* M19-40 para utilizar la glicina betaína o el dimetilsulfoniopropionato como nutrientes, se utilizó una modificación del medio SMM con una concentración 0,8 M de NaCl, desprovisto de piruvato sódico. En su lugar, se añadió al medio glicina betaína o dimetilsulfoniopropionato con la misma molaridad de átomos de carbono que contiene cuando se le añade al medio piruvato sódico (10 mM), obteniendo una concentración final de cada soluto de 6 mM. Como control se utilizaron los mismos medios suplementados con concentraciones 1 mM de los solutos compatibles utilizados (concentración utilizada para determinar su efecto osmoprotector) y un medio no suplementado con solutos compatibles. Estos experimentos se realizaron utilizando 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas de cada una. Los matraces se incubaron en agitación a 37 °C. Se hizo un seguimiento del crecimiento de los cultivos midiendo la densidad óptica a 600 nm de los mismos.

### III. 2. Muestreo y tratamiento de las muestras

Para el aislamiento de nuevos grupos de bacterias relacionadas filogenéticamente con el género *Spiribacter* se han utilizado muestras de agua procedentes de las salinas "Bras del Port", en Alicante.

La toma de muestras tuvo lugar en mayo de 2015 y para ello se utilizaron recipientes estériles que fueron transportados al laboratorio en un breve período de tiempo, donde se realizó la siembra en placa mediante espátula de vidrio.

### III. 3. Medios y condiciones de cultivo

#### III. 3. 1. Medio SMM

El medio SMM fue descrito previamente por León y colaboradores (2014) para el cultivo de especies del género *Spiribacter*. El medio SMM está compuesto de una mezcla de sales ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ :  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 19,5 g;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30,5 g; KCl, 3,0 g; NaBr, 0,35 g;  $\text{NaHCO}_3$ , 0,1 g y  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 g) suplementada con piruvato sódico y digerido de caseína ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ : 1,1 y 5,0, respectivamente) a la cual se adiciona el NaCl a partir de una solución stock 5 M NaCl, en función de la concentración final de NaCl requerida. El pH se ajustó entre 7,5 y 7,6 con una solución 4 M de KOH, mediante un pH-metro Basic 20. Los cultivos se incubaron en agitación a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa bacteriana. Para obtener medios sólidos se añadió Agar Bacteriológico Europeo (Intron Biotechnology) a una concentración de 1,8 %.

El medio SMM a una concentración final 0,8 M NaCl se ha utilizado para el mantenimiento de los cultivos de las distintas cepas bacterianas en el laboratorio.

#### III. 3. 2. Medio SW

Para la determinación del rango salino de crecimiento de las cepas bacterianas estudiadas se ha utilizado una modificación del medio SW (Ventosa et al., 1982). El medio resultante consta de una solución de sales a diferentes concentraciones salinas: SW 3, SW 5, SW 7,5, SW 10, SW 12,5, SW 15, SW 17,5, SW 20, SW 25, preparadas a partir de una solución al 30 % de sales, y suplementadas con 0,5 % de digerido de caseína (BD Difco) y 0,11 % de piruvato sódico (Sigma-Aldrich). El pH se ajustó entre 7,5 y 7,6 con una solución 4 M de KOH.

### III. 4. Aislamiento de nuevas cepas del género *Spiribacter*

Se ha llevado a cabo un muestreo dirigido a aislar exclusivamente nuevas cepas bacterianas relacionadas con el género *Spiribacter* y otros taxones cercanos. Para ello se ha utilizado el medio de cultivo SMM en placa, medio óptimo para el cultivo de las especies ya descritas del género. El pH del medio se ajustó a 7,5 y la temperatura de incubación fue de 37 °C. Tras un mes de incubación, se seleccionaron aquellas colonias que presentaron una morfología y



pigmentación de las colonias similares a las de las especies de *Spiribacter* ya descritas. De este modo se seleccionaron aquellas colonias con tamaños menores a 1 mm y con una pigmentación rosada. Seguidamente se cultivaron en medio líquido. Tras un período de incubación de 7-10 días, se seleccionaron aquellos cultivos en los que se observó una mínima presencia de turbidez, mientras que se descartaron aquellos en los que la densidad óptica se encontraba alrededor o superior a 0,5. De este modo descartábamos las bacterias de rápido crecimiento y de fácil aislamiento en el laboratorio, generalmente pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Pseudomonas* y *Salinivibrio*, entre otros.

A continuación, cada una de las cepas así obtenidas se analizaron por microscopía óptica (Olympus CX41) (Figura 3). Continuamos el estudio con aquellas cepas que presentaron una morfología celular similar a la característica morfología en espiral de las especies del género *Spiribacter*.



Figura 3. Microscopio óptico Olympus CX41.

### III. 5. Extracción, purificación y determinación de la concentración y pureza del ADN

#### III. 5. 1. Extracción del ADN de las cepas aisladas

##### *Extracción del ADN mediante choque hiposmótico y térmico*

Este método se utilizó para la extracción de ADN a pequeña escala de las cepas aisladas, para la posterior amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S. Para ello se resuspendió con un palillo estéril una pequeña cantidad de un cultivo puro en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O mili Q y seguidamente se hirvió durante 8-10 segundos en baño María. El choque hiposmótico y térmico produce la plasmólisis de la célula y por consiguiente la liberación del ADN al exterior de la célula.

##### *Extracción del ADN mediante un kit comercial*

Este método se utilizó tanto para la extracción del ADN de aquellas cepas en las que no fue posible realizar la extracción mediante el choque hiposmótico y térmico, como para la obtención de las secuencias genómicas completas de las cepas del género *Spiribacter* aisladas. Para ello se utilizó el kit de extracción G-spin™ Total (Intron Biotechnology), siguiendo el protocolo que incluye el fabricante.

##### *Método de Marmur*

El método de Marmur (1961) se ha utilizado para la extracción de ADN genómico a gran escala, para posteriormente realizar estudios de hibridación ADN-ADN y la determinación del contenido de Guanina más Citosina (G+C) del ADN de las cepas microbianas aisladas.

### III. 5. 2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis de ADN en geles de agarosa nos permite visualizar el ADN tras separar los fragmentos del mismo atendiendo a su tamaño y conformación. Este método se utiliza para la verificación de la extracción del ADN, para comprobar que la amplificación de determinados fragmentos de ADN mediante PCR se ha realizado correctamente, y para asegurar la pureza de dichos fragmentos tras haber realizado la purificación.

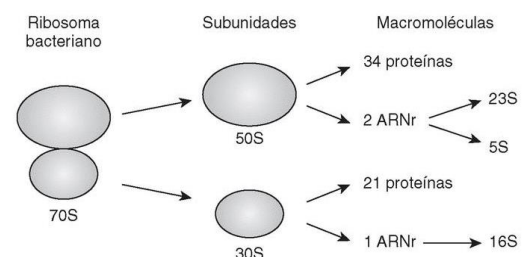
La electroforesis se ha realizado atendiendo al método descrito por Sambrook y Russell (2001).

### III. 5. 3. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Para la determinación de la concentración de ADN se utilizó el método de cuantificación por fluorescencia del bromuro de etidio en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001), mediante la comparación visual de la intensidad luminosa de las bandas de ADN. Cuando se requirió determinar con mayor precisión la concentración de las muestras de ADN se utilizaron los espectrofotómetros Nanodrop (Thermo Scientific) y Lambda 20 (Perkin-Elmer), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Para determinar la pureza del ADN se midió la absorbancia a 280 y 230 nm y se calcularon los cocientes A260/A280 y A260/A230.

### III. 5. 4. Amplificación del gen ARNr 16S por PCR

El ARNr 16S (*Figura 4*) es la macromolécula más utilizada en el estudio de las relaciones filogenéticas y en taxonomía (Rodicio y Mendoza, 2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite amplificar ácidos nucleicos y por ello nos permite de una manera rápida y fácil amplificar la secuencia del gen ARNr 16S para su



**Figura 4.** El ribosoma bacteriano. Esquema de su estructura, donde se indican las subunidades y macromoléculas que lo componen (Rodicio y Mendoza, 2001).

posterior comparación con las secuencias presentes en las bases de datos.

La PCR ha sido realizada según las directrices de Sambrook y Russell (2001), utilizando para ello el termociclador Mastercycler® Ep (Eppendorf). La enzima utilizada fue la ADN polimerasa modificada de *Thermus aquaticus* (Lawyer et al., 1989), *Taq* ADN polimerasa (Intron Biotechnology), y las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl, en tubos Eppendorf previamente esterilizados. Los componentes utilizados para realizar la PCR fueron los siguientes: Tampón de reacción 10X, 10 µl; MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µl; dNTPs (1,25 mM cada dNTP), 8,0 µl; Cebador directo F27 (12 µM), 2,5 µl; Cebador reverso R1488 (12 µM), 2,5 µl; ADN (50ng/µl), 5,0 µl; *Taq* ADN polimerasa (5 U/µl), 0,5 µl; Agua estéril, c. s. p. 50 µl.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo de forma general de acuerdo al siguiente esquema:

- Desnaturalización inicial del ADN molde: 5 minutos a 95 °C.
- 25-35 ciclos en los que se repiten tres fases:
  - o Desnaturalización: 30 - 60 segundos a 94 °C.
  - o Hibridación de los cebadores: normalmente la temperatura de hibridación es 5 °C menor que la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ) más baja de los dos cebadores.
  - o Elongación: se recomienda una temperatura de 68 o 72 °C y un tiempo de 1 min/Kb. Elongación final: 10 minutos a 68 o 72 °C, con el objetivo de conseguir la elongación completa de los productos de la reacción.

Finalmente, las muestras se conservan a 4 °C. Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron utilizando el kit de purificación MEGAquick-spin™ Total (Intron Biotechnology).

### III. 6. Análisis filogenético de las cepas aisladas

Inicialmente se realizó la amplificación y secuenciación parcial (con el cebador F27) del gen ARNr 16S de las cepas aisladas con el objetivo de determinar la posición filogenética de cada una de ellas. Una vez obtenidas las secuencias parciales del gen ARNr 16S, estas se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos con la ayuda del programa BLAST del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la aplicación EzTaxon-e (Yoon et al., 2017).

Para la secuenciación las muestras fueron enviadas a la empresa Stab Vida (Oeiras, Portugal). Las secuencias se editaron y analizaron mediante el programa ChromasPro.

Las cepas que presentaron porcentajes de semejanzas inferiores al 97-98 % o 95 % con respecto a las cepas tipo de especies pertenecientes al género *Spiribacter* fueron seleccionadas para continuar con su estudio, dado que se trata de los valores límite establecidos para considerar una cepa bacteriana como una nueva especie (Stackebrandt y Goebel, 1994) o género (Ludwig et al., 1998), respectivamente. Adicionalmente se seleccionaron aquellos aislados que aunque presentaron valores de semejanza superiores al 97 % con especies del género *Spiribacter*, presentaron características que claramente las diferenciaban de otras especies del género ya descritas.

Con el objetivo de determinar la posición filogenética exacta de las cepas seleccionadas se procedió a la secuenciación completa del gen ARNr 16S. Los cebadores utilizados para la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR fueron los mismos que se utilizaron para su amplificación (F27 y R1488), aunque para la secuenciación se utilizaron

adicionalmente los cebadores F530 y R343, como estrategia para intentar obtener un solapamiento completo de las secuencias parciales y poder de esta forma obtener la secuencia completa del gen ARNr 16S, utilizando para ello el programa ChromasPro que permite el solapamiento de las secuencias obtenidas por los diferentes cebadores en una única secuencia consenso mostrando automáticamente ambigüedades que pueden ser editadas manualmente.

Para la obtención de los árboles filogenéticos se utilizó el paquete informático ARB (Ludwig et al., 2004). Las secuencias de ARNr 16S se alinearon con las de las cepas tipo de las especies más relacionadas desde un punto de vista filogenético y cuyos nombres estaban válidamente publicados. Tras la alineación se obtuvo la matriz de distancias y se construyeron los correspondientes árboles filogenéticos. Los valores de distancia se corrigieron por cambios de bases múltiples en posiciones sencillas mediante la fórmula de Jukes y Cantor (1969). Para la construcción de los árboles se utilizaron tres métodos distintos: *neighbour-joining* (Saitou y Nei, 1987), *maximum-parsimony* (Fitch, 1971) y *maximum-likelihood* (Felsenstein, 1981). Con el objetivo de determinar la estabilidad de cada una de las ramas filogenéticas y en consecuencia la robustez de la topología de los árboles obtenidos se calcularon 1000 réplicas de cada uno de ellos (Felsenstein, 1985).

### **III. 7. Caracterización taxonómica de las cepas aisladas**

#### **III. 7. 1. Determinación de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas**

La determinación de la morfología celular y la motilidad tuvo lugar mediante microscopía óptica de contraste de fases utilizando un microscopio Olympus BX42 provisto de una cámara digital DP70 a partir de cultivos líquidos en la fase exponencial de crecimiento. La morfología, tamaño y pigmentación de las colonias se observó en placas de Petri, tras incubarlas en las condiciones óptimas de crecimiento de cada cepa.

Para determinar el rango y el óptimo de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, las cepas se cultivaron en medio SW líquido conteniendo 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 y 25 % (p/v) de NaCl. Una vez conocida la concentración de NaCl óptima para su crecimiento se cultivaron a la concentración de NaCl óptima establecida y se incubaron a 15, 20, 28, 30, 37, 40 y 45 °C. Finalmente se determinó el rango de pH ajustando el pH del medio a 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0 y 10,0, y se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento. El valor que se consideró óptimo para el crecimiento de cada cepa aislada de los tres parámetros fue aquel en el que primero se observó crecimiento. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm ( $DO_{600}$ ), realizando lecturas periódicas en un espectrofotómetro Spectronic 200 (Thermo Scientific)

La hidrólisis de la caseína, gelatina, almidón, Tween 80, ADN y esculina, la reducción de selenito, citrato de Simmons, Voges-Proskauer y rojo de metilo, y la reducción de nitratos y nitritos (Figura 5) se determinaron según la metodología descrita por Cowan y Steel (1965), utilizando medios con una solución de sales SW a la salinidad óptima establecida para las cepas estudiadas. La actividad catalasa se observó mediante la adición de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v) sobre células de un cultivo en medio sólido, y la actividad oxidasa mediante la adición del reactivo tetrametil-p-feniléndiamina (Kovacs, 1956) sobre células depositadas en un papel de filtro.



Figura 5. Pruebas bioquímicas previas a su inoculación.

Para determinar la producción de ácidos a partir de carbohidratos se cultivaron las distintas cepas en su medio óptimo de crecimiento, desprovisto de piruvato y suplementado con el indicador rojo fenol y el carbohidrato en cuestión, esterilizado por filtración y adicionado al medio a una concentración final del 1 % (p/v) (Ventosa et al., 1982).

Para analizar la capacidad de las distintas cepas bacterianas para utilizar una amplia gama de sustratos como única fuente de carbono y energía, o como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, se empleó el medio de Koser (1923) de acuerdo a la modificación descrita por Ventosa y colaboradores (1982). Su composición es la siguiente (l<sup>-1</sup>): 75 g NaCl, 2 g KCl, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g KNO<sub>3</sub>, 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,05 g de extracto de levadura. La solución del sustrato se añadió por filtración hasta alcanzar una concentración final de 1 g·l<sup>-1</sup> para los alcoholes, los ácidos orgánicos y los aminoácidos y una concentración final de 2 g·l<sup>-1</sup> para los carbohidratos. Cuando el sustrato era un aminoácido o derivado, el medio base se preparó sin KNO<sub>3</sub> ni (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

### III. 7. 2. Estudio genotípico de las cepas seleccionadas

#### *Determinación del contenido en Guanina más Citosina (G+C) del ADN*

La determinación del contenido en G+C del ADN se realizó a partir de la temperatura media de desnaturalización (T<sub>m</sub>), (Marmur y Doty, 1962) utilizando la ecuación descrita por Owen y Hill (1979). La temperatura media de desnaturalización se obtuvo mediante un espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin-Elmer) UV-Vis, a una longitud de onda de 260 nm, equipado con un sistema Peltier PTP-1, programado para aumentar la temperatura a una velocidad de 1 °C/minuto. La variación de la densidad óptica que se produce con la temperatura se registró mediante el programa Templab 2.0. La T<sub>m</sub> se determinó según el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976).

La  $T_m$  obtenida se introduce en la fórmula descrita por Owen y Hill (1979) para ADN disuelto en una solución salina citratada y agua destilada en proporción 1:10 (0,1 x SSC), con la que se obtiene el porcentaje de G+C:

$$\% G + C = (\% G + C)_{mr} + 2,08 \times (T_{mp} - T_{mr})$$

Donde:  $(\% G+C)_{mr}$ : % de G+C del ADN de una cepa de referencia;  $T_{mr}$ : temperatura media de desnaturalización de la cepa de referencia;  $T_{mp}$ : temperatura media de desnaturalización del ADN desconocido. Como cepa de referencia se utilizó *Escherichia coli* NCTC 9001<sup>T</sup>, cuyo ADN presenta un valor de G+C de 50,9 moles% y una  $T_m$  en 0,1 x SSC de 74,6 °C (Owen y Pitcher, 1985).

#### *Hibridación ADN-ADN*

La hibridación ADN-ADN nos da información sobre la relación existente entre los microorganismos. Esta se basa principalmente en el principio de que el grado de reasociación constituye un índice cuantitativo de la semejanza que existe entre secuencias de ADN procedentes de distintas cepas microbianas. La hibridación ADN-ADN se ha realizado en las cepas cuya semejanza de la secuencia del gen ARNr 16S con especies ya descritas fue superior al 97 %.

Para la realización de la hibridación se siguió el método de competición en filtro de membrana descrito por Johnson (1994). La hibridación ADN-ADN comprende una serie de procesos previos antes de la hibridación propiamente dicha:

1. Marcaje de ADN de la cepa problema. Se utilizó el kit comercial "Prime- $\alpha$ -Gene Labelling System" (Promega), sustituyendo la desoxicitidina por <sup>3</sup>H-dCTP (desoxi-[1', 2', 5'-<sup>3</sup>H] citidina trifosfato).
2. Preparación de los ADNs competidores. El ADN de cada una de las cepas, obtenidos por el método de Marmur (1961), se desnaturalizó calentando en baño María a 100 °C durante 10 minutos. Concluido este tiempo se colocaron en hielo y se sonicaron a una amplitud del 70 % mediante un homogeneizador ultrasónico LabSonic® M durante tres períodos de 15 segundos. A continuación, se distribuyeron en criotubos, a razón de 100 µg por vial y finalmente, se liofilizaron.
3. Preparación del filtro con ADN de la cepa problema.
4. Preincubación de los filtros con ADN.
5. Hibridación ADN-ADN. Se incuban a la temperatura óptima de hibridación durante 16 horas, el ADN de referencia, tanto en competidor como en el filtro de nitrocelulosa y los ADNs competidores de las cepas objeto de estudio. Por último, se determina la



radioactividad retenida en los filtros sin competidor, en los filtros con competidores de otras cepas y en los filtros con competidores con el ADN de referencia.

Una vez obtenidos los valores de radioactividad, se determinó el porcentaje de hibridación ADN-ADN según la fórmula descrita por Johnson (1994), dando como resultado un valor de semejanza en porcentaje entre la cepa problema y el resto de cepas a comparar.

### III. 7. 3. Estudio quimiotaxonómico de las cepas seleccionadas

#### *Análisis de ácidos grasos*

El análisis de los ácidos grasos se realizó por el Servicio de Identificación de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), en Valencia.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV. 1. Estudio de los mecanismos de osmorregulación en *Spiribacter salinus*

La secuencia del genoma completo de la especie *S. salinus* nos ha permitido obtener una gran cantidad de información sobre los mecanismos de respuesta celular de esta bacteria al estrés osmótico. Con el objetivo de determinar los eventos celulares y moleculares que permiten a las especies del género *Spiribacter* ser bacterias dominantes en ambientes hipersalinos, se han combinado estudios fisiológicos realizados en el laboratorio con los obtenidos a nivel genómico. Mi Trabajo Fin de Grado se ha centrado en el estudio de los mecanismos de osmorregulación utilizados por esta bacteria a nivel experimental en el laboratorio.

Los estudios realizados han puesto de manifiesto que *S. salinus* presenta una estrategia “*salt-out*”, es decir, acumula solutos compatibles en su interior para adaptarse a las altas concentraciones salinas en las que habita, y expulsa estos compuestos a través de transportadores específicos o a través de los canales mecanosensibles, para evitar la ruptura celular cuando disminuye la osmolaridad. Debido al gasto de energía que supone la síntesis de estos compuestos, siempre que sea posible son captados del medio externo. Dadas las bajas concentraciones de solutos compatibles en los ambientes naturales, en un rango de  $\mu\text{M}$  o  $\text{nM}$ , los microorganismos poseen sistemas de transporte con una gran especificidad por estos compuestos.

Todas las especies del género *Spiribacter* poseen el *cluster* completo de los genes responsables de la síntesis de ectoína, *ectABC*. Sin embargo, ninguna de las especies posee el gen *ectD* para la síntesis del derivado hidroxilado de la ectoína, la 5-hidroxiectoína.

La glicina betaína constituye otro soluto compatible ampliamente distribuido en el dominio *Bacteria*. Sin embargo en las especies del género *Spiribacter*, no se han encontrado los genes

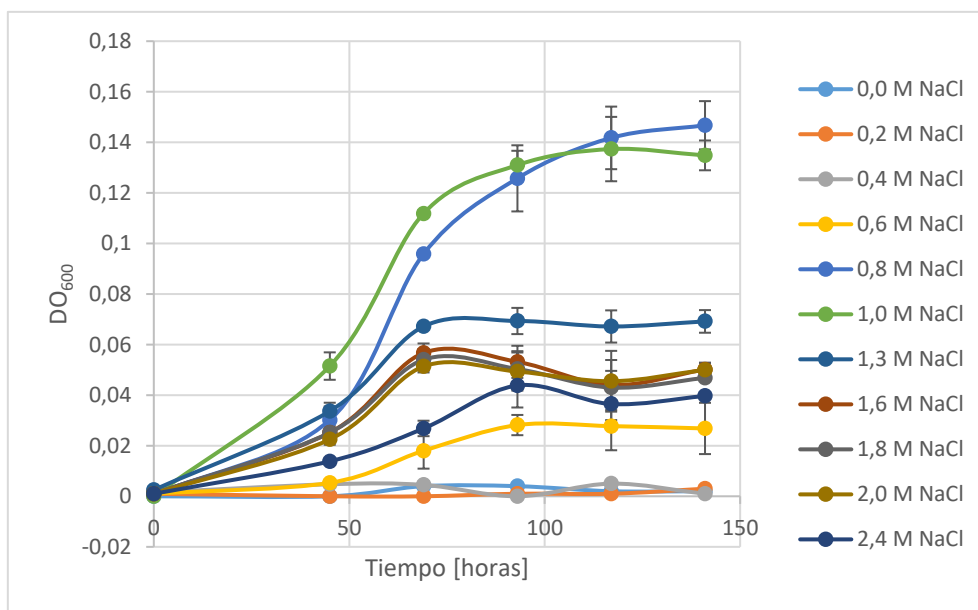
que codifican las enzimas responsables de la síntesis de este soluto compatible. En cambio, sí que se han localizado en el genoma de *S. salinus* los genes responsables de la degradación de este compuesto, lo que nos hizo pensar que podría utilizar este soluto compatible, no sólo como osmoprotector, sino también como fuente de carbono y energía.

El análisis genómico nos ha permitido tener una idea inicial sobre los mecanismos de osmorregulación en el género *Spiribacter*. No obstante estos datos tenían que ser corroborados con estudios experimentales en el laboratorio.

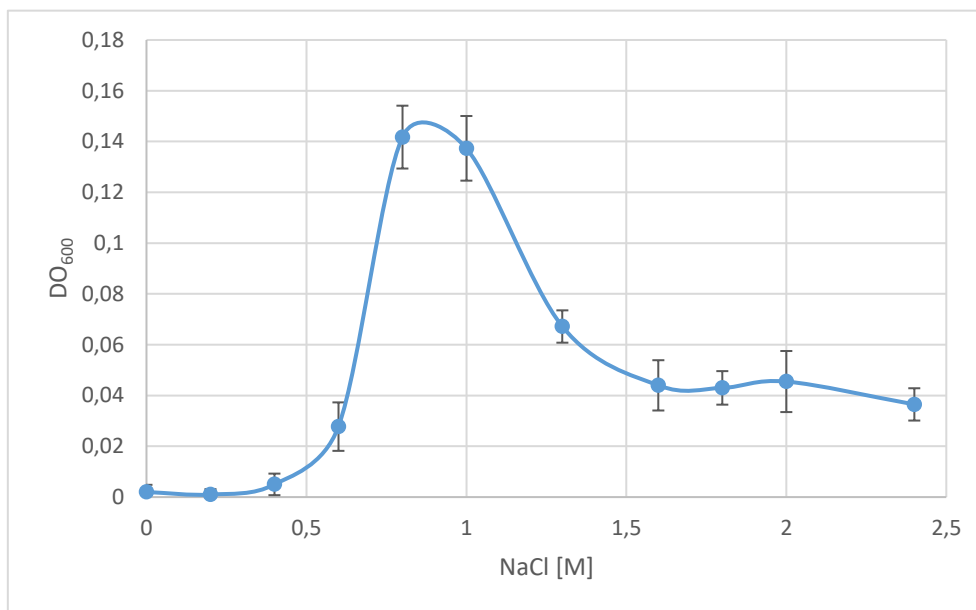
#### IV. 1. 1. Rango de crecimiento en NaCl

Para determinar la respuesta de *S. salinus* a diferentes concentraciones salinas, concretamente la influencia del NaCl en su crecimiento, las células se cultivaron en un medio químicamente definido con concentraciones crecientes de NaCl a 37 °C durante 120 horas.

Como se muestra en la *Figura 6A*, *S. salinus* crece a concentraciones de NaCl comprendidas entre 0,6 M de NaCl y 2,0 M de NaCl, presentando su óptimo de crecimiento a una concentración 0,8 M-1,0 M de NaCl, salinidades a las que se observan densidades ópticas superiores. A concentraciones inferiores a 0,4 M NaCl no se observa crecimiento. En la *Figura 6B* se observa que se trata de una bacteria con un crecimiento óptimo en un rango de salinidad muy estrecho, 0,8-1,3 M NaCl, poniendo de manifiesto que se trata de una auténtica bacteria halófila moderada. A concentraciones superiores a 1,3 M NaCl las células de *Spiribacter* se encuentran sometidas a un elevado nivel de estrés osmótico y como consecuencia, las densidades ópticas alcanzadas por los cultivos a estas concentraciones salinas son muy reducidas.



A



**B**

**Figura 6. (A)** Crecimiento de *S. salinus* M19-40 en respuesta a varias concentraciones de NaCl en el medio.

**(B)** DO<sub>600</sub> alcanzada por los cultivos de *S. salinus* a diferentes concentraciones de NaCl.

Gracias a este estudio podemos afirmar que *S. salinus* es una bacteria halófila, incapaz de crecer en ausencia de sales. Según la clasificación de Kushner y Kamekura (1988) se trata de una bacteria halófila moderada, con un crecimiento óptimo comprendido entre 0,5 y 2,5 M de NaCl.

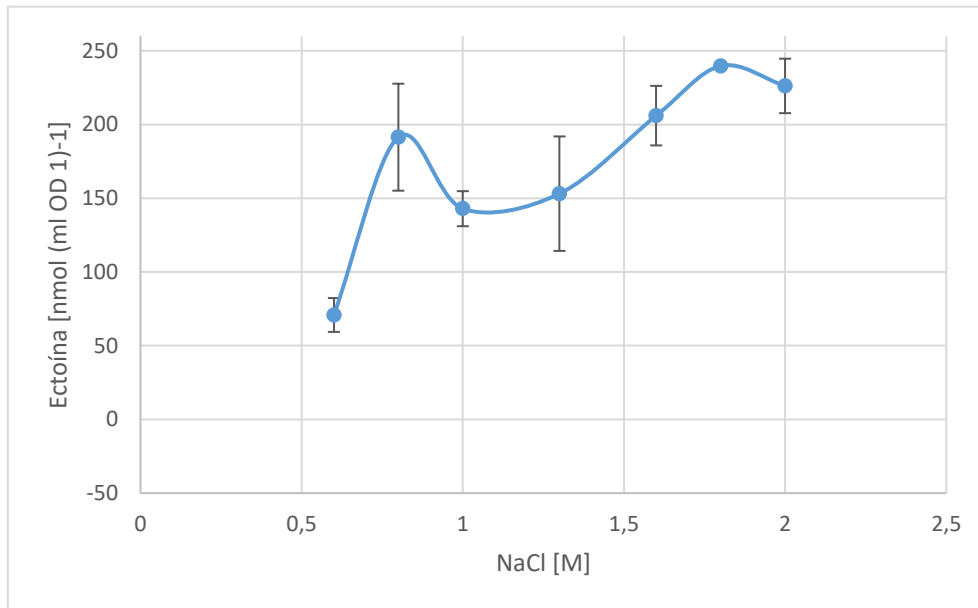
#### IV. 1. 2. Síntesis de ectoína

Durante la realización del presente Trabajo Fin de Grado, hemos realizado estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de C<sup>13</sup> (<sup>13</sup>C-NMR) para determinar la presencia de solutos compatibles en células de *Spiribacter* sometidas a diferentes concentraciones salinas (no se muestran los datos). Los espectros obtenidos ponen de manifiesto la presencia de ectoína en las células de *Spiribacter*, y por tanto, la capacidad de *S. salinus* para sintetizar este soluto compatible.

Para analizar con más detalle la síntesis de ectoína por *S. salinus*, las células de *S. salinus* se cultivaron en el medio mínimo SMM, con concentraciones crecientes de NaCl, comprendidas entre 0 M y 2,0 M de NaCl. Cuando los cultivos se encontraban en la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 70 horas después de la inoculación) se realizó una extracción de ectoína y se cuantificó la concentración de ectoína en el interior de las células mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los resultados de este análisis se muestran en la *Figura 7*. Se puede observar una clara tendencia ascendente en los niveles de ectoína en el interior celular, poniendo de manifiesto que *S. salinus* sintetiza este soluto compatible y ajusta el contenido intracelular del mismo en función del grado de estrés osmótico al que está sometido. *S. salinus* es una bacteria halófila que vive en

ambientes hipersalinos y sintetiza ectoína para sobrevivir en estos ambientes. En respuesta a los cambios que puedan tener lugar en la concentración salina del medio externo, sintetiza ectoína en mayor o en menor medida.



**Figura 7.** Síntesis de ectoína por *S. salinus* M19-40.

#### IV. 1. 3. Solutos compatibles como protectores frente al estrés osmótico

Una vez conocíamos qué solutos compatibles podían ser sintetizados por *S. salinus*, nuestro objetivo era determinar qué otros solutos compatibles podía utilizar para hacer frente a las altas concentraciones salinas como agentes osmoprotectores cuando estos se les proporcionaban en el medio externo. Para ello se han ensayado un amplio espectro de solutos compatibles: glicina betaína, colina, ectoína, carnitina, colina-o-sulfato (COS), dimetilsulfoniopropionato (DMSP), prolina e hidroxiectoína. Este estudio se ha realizado en el medio SMM a una concentración 2 M NaCl, en la que las células de *S. salinus* están sometidas a un elevado estrés osmótico. Este medio se suplementó con concentraciones 1 mM de cada uno de los solutos compatibles ensayados. Como control se utilizó un cultivo de *S. salinus* en medio SMM a 2,0 M NaCl que se incubó en las mismas condiciones. Se hizo un seguimiento del crecimiento de los cultivos a fin de ver en qué medida afectaban las altas concentraciones de sales al crecimiento de los cultivos, midiendo para ello la densidad óptica cada 24 horas, durante aproximadamente 120 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 8* y como se puede observar tanto la glicina betaína como el dimetilsulfoniopropionato, y en menor medida la colina-o-sulfato, ejercen un efecto osmoprotector en células que están sometidas a estrés osmótico. En las condiciones ensayadas, a una concentración 2 M NaCl, el crecimiento de *S. salinus* se ve fuertemente reducido, alcanzando densidades ópticas mínimas, siendo estas inferiores a las observadas en los medios que han sido suplementados con glicina betaína y dimetilsulfoniopropionato, en los

que la densidad óptica alcanzada es superior, poniendo de manifiesto el efecto osmoprotector ejercido por estos compuestos, especialmente por la glicina betaína. La carnitina, la hidroxiectoína y la ectoína no demuestran tener efecto osmoprotector en *S. salinus*. Presentan una  $DO_{600}$  similar a la que alcanzan los cultivos a los que no se les ha añadido ningún soluto compatible. Los resultados referentes a la colina demuestran, no solo que no actúa como osmoprotector, sino que además inhibe el crecimiento. Por ello pensamos que esta tiene un efecto tóxico sobre las células *S. salinus*.

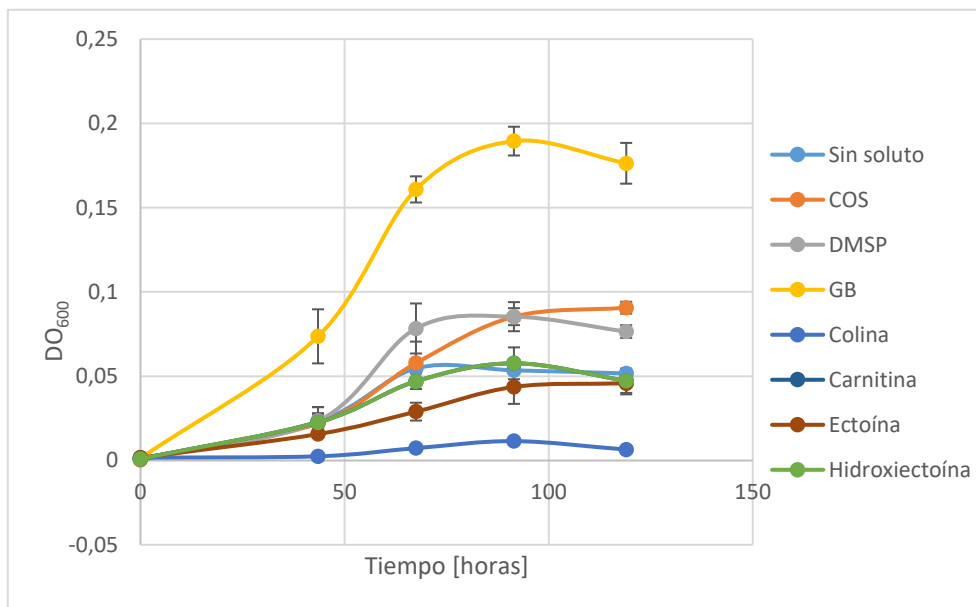
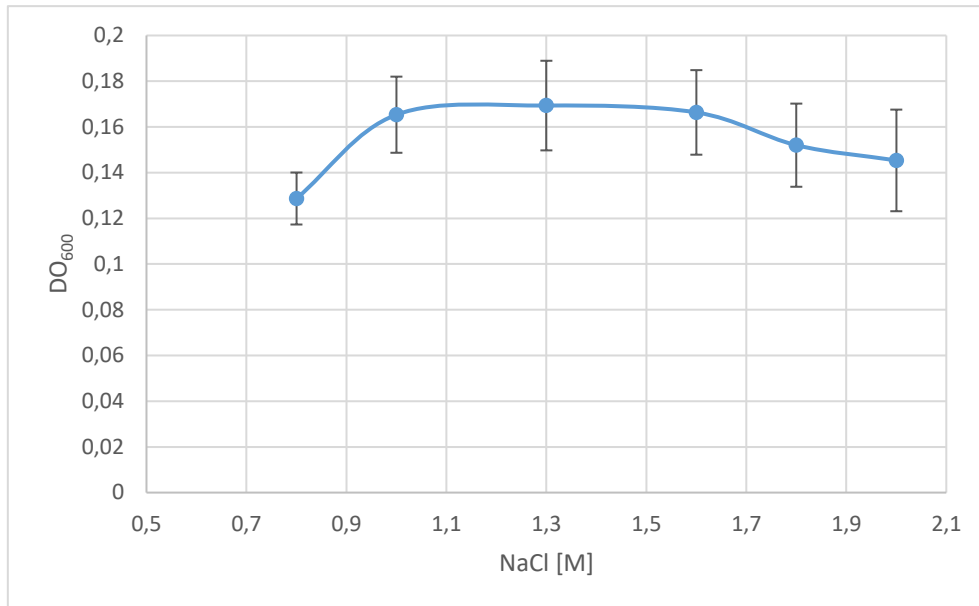


Figura 8. Osmoprotección de *S. salinus* M19-40 mediante solutos compatibles.

Dado el efecto osmoprotector ejercido por la glicina betaína diseñamos un nuevo experimento en el que determinamos la respuesta de *S. salinus* a diferentes concentraciones salinas, entre 0,6 M de NaCl y 2,0 M de NaCl, en medios suplementados con concentraciones 1 mM de glicina betaína. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9, y como se puede observar, mientras que cuando *S. salinus* se cultiva a concentraciones salinas crecientes en ausencia de glicina betaína (Figura 6B) se observa un pico de crecimiento a 0,8 M- 1,0 M NaCl disminuyendo fuertemente el crecimiento a salinidades superiores a 1,3 M NaCl, en presencia de glicina betaína, el crecimiento se mantiene constante en un amplio rango de salinidades, debido al efecto osmoprotector que está ejerciendo la glicina betaína.

En ambas figuras, la  $DO_{600}$  alcanzada a concentraciones a las que las células se encuentran en las condiciones óptimas de crecimiento, es decir 0,8-1,0 M de NaCl, es similar, sin embargo, al aumentar la concentración de NaCl, en ausencia de glicina betaína, las células se encuentran sometidas a un estrés osmótico cada vez más elevado y el crecimiento se ve fuertemente afectado (Figura 6B). Sin embargo, en presencia de glicina betaína, al aumentar la concentración de NaCl, el crecimiento se mantiene y no se ve reducido por el aumento de la salinidad (Figura

9). Esto pone de manifiesto que la glicina betaína ejerce un papel osmoprotector sobre *S. salinus*, permitiéndole mantener un crecimiento óptimo a pesar de encontrarse sometido a un elevado estrés osmótico.



**Figura 9.** Osmoprotección ejercida por la glicina betaína en *S. salinus* M19-40.

Teniendo en cuenta que en el análisis genómico de esta bacteria se han localizado genes de síntesis de solutos compatibles exclusivamente para la ectoína, era necesario examinar los transportadores implicados en el transporte de estos compuestos desde el exterior de la célula hasta el interior celular. De este modo se han identificado un transportador TeaABC, implicado en la captación y liberación de ectoína, dos transportadores OpuD, implicados en el transporte de glicina betaína, un transportador OpuA, involucrado en el transporte de glicina betaína y DMSP, y un transportador proU de glicina betaína. La funcionalidad de todos los genes de transportadores encontrados en *S. salinus* ha sido probada en los ensayos de osmoprotección ejercidos por diferentes solutos compatibles realizados en este trabajo, por ello, podemos concluir que todos los genes relacionados con los transportadores de solutos compatibles encontrados en su genoma son funcionales.

#### IV. 1. 4. Utilización de solutos compatibles como nutrientes

Teniendo en cuenta el efecto osmoprotector ejercido por la glicina betaína en *S. salinus*, la presencia de transportadores involucrados en su captación desde el medio externo, y la presencia en su genoma de los genes implicados en la degradación de este compuesto, nos cuestionamos si esta bacteria podría utilizar este soluto, no sólo como soluto compatible para protegerse frente a las altas concentraciones salinas, sino también como fuente de carbono y energía. Para ello, diseñamos un experimento en el que *S. salinus* se cultivó en paralelo, en siete condiciones de cultivo diferentes, todas ellas a una concentración de NaCl de 0,8 M (a la que

presenta su crecimiento óptimo). En los ensayos, en el medio SMM, se reemplazó el piruvato sódico por glicina betaína o DMSP, en la misma molaridad de átomos de carbono. Como control negativo se utilizó el medio SMM desprovisto de piruvato, en presencia únicamente de digerido de caseína. El crecimiento de los cultivos se monitorizó a través de la densidad óptica, mediante determinaciones realizadas cada 24 horas.

Los resultados obtenidos muestran como *S. salinus* puede utilizar la glicina betaína como fuente de carbono y energía, además de como osmoprotector, debido a que se alcanzan en el cultivo densidades ópticas similares a las obtenidas en el medio en el que las células se han cultivado en el óptimo de crecimiento de esta bacteria, el medio SMM provisto con piruvato (Figura 10).

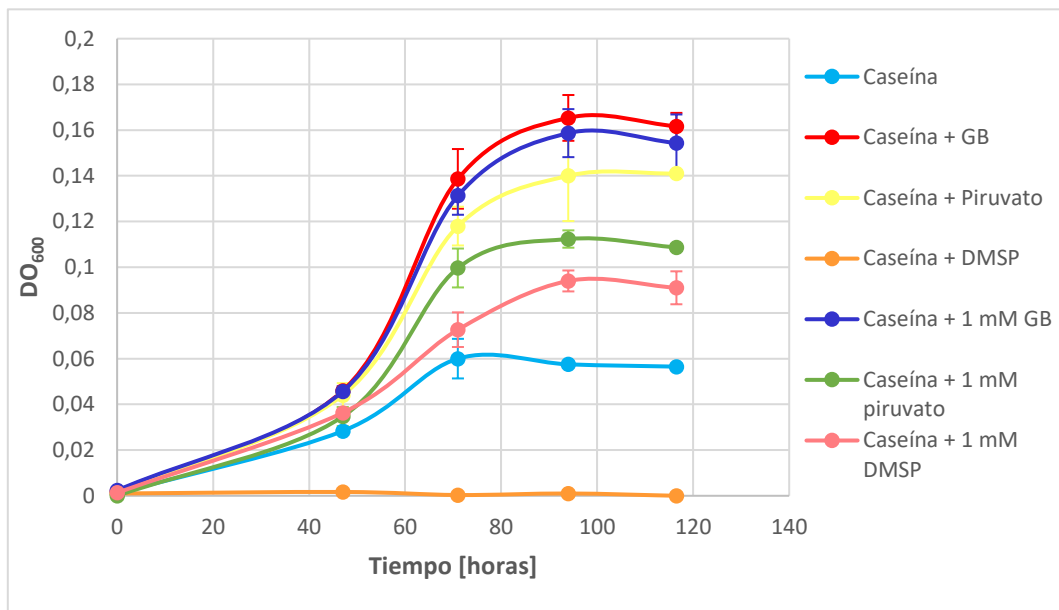


Figura 10. Uso de la glicina betaína (GB) y el dimetilsulfopropionato (DMSP) como nutrientes.

Sin embargo, en el control negativo, el cual contiene únicamente el digerido de caseína (también presente en los otros) se observa un crecimiento menor, lo que demuestra que la glicina betaína es utilizada por las células como fuente de carbono y energía. Llama nuestra atención, que en el caso del DMSP, a concentraciones 1 mM se observa crecimiento, mientras que a concentraciones 6 mM (misma molaridad de átomos de carbono que el piruvato sódico) no se observa crecimiento. Esto podría mostrar que *S. salinus* utiliza este compuesto como osmoprotector, pero no como fuente de carbono y energía.

Aunque no se han incluido los datos en este trabajo, actualmente nos encontramos realizando estudios de osmorregulación en la especie *Spiribacter roseus*. Esta especie a diferencia de *S. salinus*, no posee los genes de las enzimas implicadas en la degradación de la glicina betaína, por lo que no cabría esperar que la utilizara como nutriente. Teniendo en cuenta estos datos, cuando se cultivó *S. roseus* en medio SMM a concentración 0,8 M NaCl con glicina betaína a la misma



molaridad de átomos de carbono que en el medio con piruvato (de la misma forma que en el apartado IV. 3. 4. Solutos compatibles como nutrientes), se observó un crecimiento similar que en presencia de solo digerido de caseína, confirmándose que la especie *S. roseus* no utiliza la glicina betaína como nutriente. Sin embargo, cuando *S. roseus* se cultiva a una concentración 2,0 M NaCl si se observa como el crecimiento se ve favorecido con respecto a los cultivos que no presentan este soluto compatible en su composición, poniendo de manifiesto el poder osmoprotector de este compuesto.

#### **IV. 2. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas del género *Spiribacter***

Los estudios de diversidad microbiana realizados en ambientes hipersalinos, basados en técnicas independientes del cultivo, han puesto de manifiesto que la mayor parte de los microorganismos clásicamente aislados en el laboratorio y estudiados durante décadas, no representan la microbiota predominante en estos ambientes y por tanto no constituyen modelos ideales de estudio para entender los mecanismos de adaptación utilizados por los organismos que allí habitan y las relaciones que existen entre ellos, mientras que, los microorganismos difícilmente obtenidos en cultivo puro en el laboratorio y en general de lento y difícil crecimiento, constituyen una parte dominante de la población microbiana allí presente.

En 2011, Ghai y colaboradores describieron la comunidad microbiana presente en las salinas de Santa Pola apoyándose en el análisis de los metagenomas obtenidos a partir del ADN procariota total de muestras de agua de dos estanques de esta salina: un estanque de salinidad intermedia (al 19 % de salinidad, denominado SS19) y un estanque cristalizador (al 37 % de salinidad, denominado SS37). El análisis de la base de datos SS19 reveló que existe muy poca evidencia de la abundancia de especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter* o *Salinivibrio*, comúnmente aisladas en medios de laboratorio de estos ambientes, mientras que se observó un elevado número de secuencias metagenómicas pertenecientes a otros grupos microbianos, no aislados hasta el momento: un *Euryarchaeota* de bajo contenido en G+C no relacionado con *Haloquadratum walsbyi*, un miembro del phylum *Euryarchaeota* con alto contenido en G+C, una arquea que ha sido designada como *Candidatus Haloredivivus* y una o varias bacterias pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, relacionada filogenéticamente con los géneros *Alkalilimnicola* y *Nitrococcus*, revelando que constituían una parte importante de la microbiota allí presente.

Actualmente sabemos que los *contigs* más grandes obtenidos del metagenoma SS19, descritos por Ghai y colaboradores (2011) se corresponden con el género *Spiribacter*, corroborando la abundancia de este género en ambientes hipersalinos con salinidades intermedias. No obstante,

muchos de estos *contigs* presentan una baja semejanza con las especies descritas hasta el momento del género *Spiribacter* pero conservan la sintenia con los genomas de dichas especies, lo que nos sugiere que pueden existir otras especies pertenecientes al género *Spiribacter* o a algún otro género estrechamente relacionado, que se correspondan con la especie o las especies de la clase *Gammaproteobacteria* que por estudios metagenómicos se ha puesto de manifiesto que constituyen una parte predominante de la microbiota de dichos ambientes. De ahí la gran importancia del aislamiento de nuevas cepas bacterianas pertenecientes a este grupo de bacterias. Por ello, en el presente Trabajo Fin de Grado hemos llevado a cabo un muestreo dirigido a aislar exclusivamente nuevas cepas bacterianas relacionadas con el género *Spiribacter* y otros posibles taxones cercanos.

Para llevar a cabo el *screening* se ha utilizado el medio de cultivo SMM, el cual ha resultado ser óptimo para el crecimiento de la especie *S. salinus*. Para el aislamiento de nuevas cepas se utilizaron tanto medios de cultivo líquidos como medios sólidos. En primer lugar se inoculaban los medios de cultivo sólidos con diluciones de las muestras de agua de las salinas, se incubaban durante al menos un mes y se seleccionaban las colonias con características similares a las especies de *Spiribacter* previamente descritas, es decir aquellas colonias casi imperceptibles a simple vista y aquellas que presentaron una pigmentación rosada. En segundo lugar estas colonias se inoculaban en los medios de cultivo líquidos y se seleccionaron aquellos cultivos en los que se observó una mínima presencia de turbidez, descartándose aquellos cultivos que presentaron mucha turbidez. De este modo descartábamos las bacterias de rápido crecimiento y de fácil aislamiento en el laboratorio. A continuación, cada una de las cepas así obtenidas se analizaron por microscopía óptica con el objetivo de seleccionar aquellas cepas que presentaran la característica morfología de las especies del género *Spiribacter*, es decir, bacilos curvados de pequeño tamaño y morfología en espiral. Siguiendo esta metodología y tras varios subcultivos sucesivos en el mismo medio para obtener cultivos puros, hemos aislado en cultivo puro en el laboratorio a partir de diferentes muestras de agua de las salinas de Santa Pola cuatro cepas bacterianas, designadas como cepas SP30, SP10B, SP33B y SP62, filogenéticamente relacionadas con el género *Spiribacter*. Actualmente nos encontramos realizando la caracterización taxonómica de cada una de ellas y la secuenciación del genoma completo.

#### IV. 2. 1. Aislamiento y caracterización de la cepa SP30

Tras el aislamiento en cultivo puro de la cepa SP30, se procedió a la secuenciación del gen ARNr 16S y su posterior comparación mediante la herramienta BLAST y la aplicación EzTaxon-e con las secuencias disponibles en las bases de datos. Este análisis mostró una estrecha relación filogenética de la cepa SP30 con el género *Spiribacter*, concretamente con las especies

*Spiribacter roseus* (99,9 % de semejanza), *Spiribacter curvatus* (99,4 %) y *Halopeptonella vilamensis* (98,5 %). Atendiendo a los resultados obtenidos del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S, la cepa SP30, podría constituir una nueva cepa de la especie *S. roseus*. Sin embargo, se encontraron claras diferencias en la pigmentación de las colonias así como en las características de los cultivos (como por ejemplo el tiempo requerido de incubación para esta cepa en comparación con el de otras especies de *Spiribacter*), lo que nos hizo pensar que podría tratarse de una nueva especie del género *Spiribacter*. Mencionar que la especie *S. roseus*, recientemente descrita, presenta valores de semejanza del gen ARNr 16S superiores al 99 % con la especie *S. curvatus*. No obstante, los estudios realizados de hibridación ADN-ADN y la secuenciación del genoma completo de las tres especies de *Spiribacter* puso de manifiesto que se trataba de una especie diferente (León et al., 2016).

En primer lugar llevamos a cabo estudios de hibridación ADN-ADN con la finalidad de determinar si la cepa SP30 constituye una nueva especie del género *Spiribacter*, o en cambio, se trata de una nueva cepa de alguna de las especies ya descritas. Para ello se llevó a cabo una hibridación ADN-ADN mediante el método de competición en filtro de membrana, utilizando como ADN de referencia en el filtro de nitrocelulosa el ADN de la cepa SP30. La temperatura de hibridación fue de 59,7 °C. El porcentaje de hibridación se calculó de acuerdo a la metodología descrita por Johnson (1994). El porcentaje de hibridación obtenido entre la cepa SP30 y las cepas tipo de las especies *S. roseus*, *S. curvatus* y *H. vilamensis* fue de 40 %, 55 % y 67 %, respectivamente. Estos valores, inferiores al 70 %, valor límite establecido para la definición de una nueva especie (Stackebrandt et al., 2002) entre la cepa SP30 y las cepas tipo de las especies más relacionadas filogenéticamente, confirman que esta cepa constituye una nueva especie del género *Spiribacter*.

La cepa SP30 crece a concentraciones de sales que oscilan entre 7,5-25 % (p/v), presentando su óptimo de crecimiento al 12,5 % (p/v) de sales totales (*Figura 11*). Puede crecer a temperaturas comprendidas entre 20 y 40 °C y a valores de pH comprendidos entre 5 y 10, siendo las condiciones óptimas para su crecimiento 37 °C y pH 8. A diferencia de lo que ocurre con las especies *S. salinus*, *S. curvatus* y *S. roseus* la cepa SP30 alcanza densidades ópticas en los cultivos de hasta 1,2 (en las especies de *Spiribacter* descritas hasta el momento se alcanzan DO<sub>600</sub> máximas de 0,2) y destacar también que en los cultivos de esta cepa se alcanzan al final de la fase de crecimiento, las mismas densidades ópticas a las distintas concentraciones salinas, tanto en las condiciones óptimas de crecimiento (SW 7,5) como en las que no lo son (salinidades más elevadas) (*Figura 11*). En el resto de las especies del género las DO<sub>600</sub> máximas solo se alcanzan en las condiciones óptimas de crecimiento.

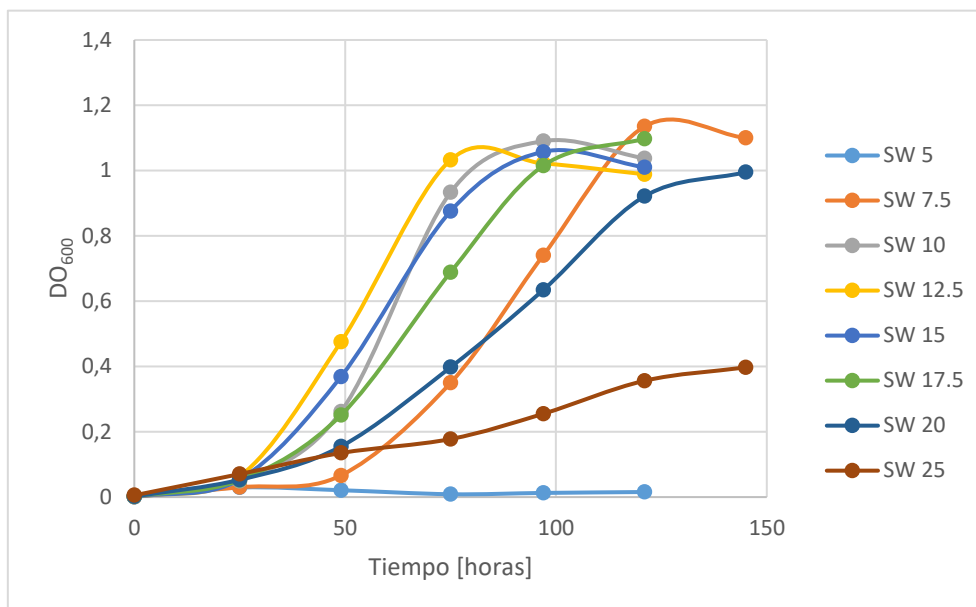


Figura 11. Crecimiento de la cepa SP30 en respuesta a varias concentraciones de NaCl.

Por otro lado se realizaron las diferentes pruebas bioquímicas descritas en el apartado III. 7. 1. Determinación de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los resultados fueron todos negativos, a excepción de la hidrólisis del fosfato y de la urea las cuáles fueron positivas. Se realizaron también los diferentes ensayos de producción de ácidos a partir de diferentes componentes, así como el uso de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Como las anteriores especies del género los resultados fueron en su mayoría negativos; la cepa SP30 solo produce ácidos a partir de la D-ribosa, únicamente utiliza el piruvato y el digerido de caseína como única fuente de carbono y energía, y no utiliza ninguno de los compuestos estudiados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

El contenido en G+C del ADN de la cepa SP30 se determinó calculando la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ), obteniéndose un valor de 65,4 moles%. Este valor se encuentra dentro del rango descrito para la familia *Ectothiorhodospiraceae*, comprendido entre 50,5 y 69,9 moles% (Imhoff, 1984), y próximo al valor de G+C determinado para la especie *S. roseus*, de 64,2 moles% (León et al., 2016).

En cuanto al estudio quimiotaxonómico, el perfil de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases con el Sistema de Identificación Microbiana MIDI. Para obtener dicho perfil la cepa SP30 se cultivó en las mismas condiciones en las que se cultivaron las especies ya descritas del género, a fin de poder comparar el perfil de ácidos grasos de cada una de ellas. Los ácidos grasos predominantes de la cepa SP30 fueron los siguientes:  $C_{16:0}$  (31,9 %),  $C_{18:1} \omega 7c$  (31,1 %),  $C_{19:0}$  ciclo  $\omega 8c$  (9,9 %) y  $C_{12:0}$  (8,5 %). El perfil obtenido es bastante similar al descrito para otras especies pertenecientes al género *Spiribacter*; sin embargo, se observaron diferencias en

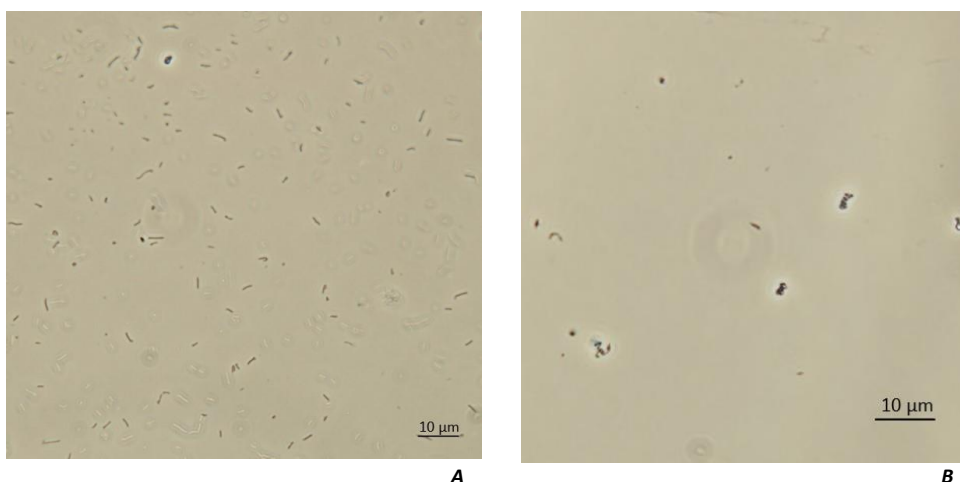
las proporciones de los ácidos grasos mayoritarios. Adicionalmente, el ácido graso C<sub>19:0</sub> ciclo  $\omega$ 8c presente en un alto porcentaje en SP30, constituye un ácido graso minoritario en otras especies de *Spiribacter* (León et al., 2016).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del estudio polifásico, basado en una combinación de datos filogenéticos, fenotípicos, genotípicos y quimiotaxonómicos, podemos concluir que la cepa SP30 constituye una nueva especie del género *Spiribacter*, para la que proponemos el nombre de *Spiribacter aquaticus* sp. nov.

*Descripción de Spiribacter aquaticus* sp. nov.

*Spiribacter aquaticus* (a.qua'ti.cus L. masc. adj. *aquaticus*, que vive o que se encuentra en el agua). Las células son Gram-negativas, inmóviles, no forman endosporas; son bacilos curvados (Figura 12A), en algunos casos formando anillos cerrados con un tamaño de 0,4 x 1,5-1,8  $\mu$ m, aislados y formando espirales superenrolladas cortas (Figura 12B). Tras 5 días de incubación a 37 °C en medio SMM las colonias presentan una morfología circular con bordes enteros, con pigmentación amarilla verdosa y de aproximadamente 0,5-1,0 mm de diámetro. Halófilo moderado. No crece en ausencia de NaCl. Presenta el óptimo de crecimiento a 12,5 % (p/v) NaCl, a pH 8 y a 37 °C. Aerobio estricto. Catalasa y oxidasa positivas. No posee las enzimas nitrato y nitrito reductasas. No hidroliza la esculina, el almidón, el Tween 80 y la gelatina. Ureasa y fosfatasa positivas. Produce ácidos a partir de D-ribosa. Como única fuente de carbono y energía utiliza piruvato y digerido de caseína. No utiliza ninguno de los compuestos estudiados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

La cepa tipo es SP30<sup>T</sup>, aislada de un estanque de una salina solar localizada en Santa Pola (Alicante). El contenido en G+C del ADN de la cepa tipo es 64,2 moles% (T<sub>m</sub>).



**Figura 12.** Imágenes de la cepa SP30 tomadas mediante microscopía óptica. **(A)** Imagen tomada al inicio de la fase de crecimiento exponencial. **(B)** Imagen tomada en la fase de crecimiento estacionaria.

#### IV. 2. 2. Aislamiento y caracterización de las cepas SP10B, SP33B y SP62

Además de la especie *Spiribacter aquaticus*, la cual ha sido recientemente aceptada para su publicación en la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, hemos aislado en cultivo puro en el laboratorio a partir de diferentes muestras de agua de las salinas de Santa Pola tres cepas bacterianas, designadas como cepas SP10B, SP33B y SP62, estrechamente relacionadas con el género *Spiribacter*. En la actualidad nos encontramos realizando una caracterización taxonómica completa de todas ellas.

El análisis filogenético basado en la comparación de la secuencia del gen ARNr 16S muestra que todas estas cepas son miembros del género *Spiribacter*. Mientras que la cepa SP10B se encuentra estrechamente relacionada con las especies *S. curvatus* UAH-SP71 (97,6 % de semejanza), *S. roseus* SSL50 (97,5 % de semejanza) y *Halopeptonella villamensis* (97,5 %), las cepas SP33B y SP62 se encuentran más estrechamente relacionadas con la especie *S. salinus* M19-40 (99,6 % y 99,8 % de semejanza, respectivamente) y más distantemente con las especies *S. curvatus* y *S. roseus* (95,4 % y 95,3 % de semejanza para la cepa SP33B y 96,5 % y 96,40 % de semejanza con la cepa SP62, respectivamente). Nuestra experiencia en el cultivo de las especies del género *Spiribacter* y las características de cultivo de cada una de las cepas aisladas (pigmentación, períodos de incubación, etc.) nos hacía pensar que la cepa SP10B podría constituir una nueva especie del género *Spiribacter*, mientras que las cepas SP33B y SP62 podrían tratarse de nuevas cepas de la especie *S. salinus*.

Hemos realizado estudios de hibridación ADN-ADN entre la cepa SP10B y las especies más estrechamente relacionadas, y los resultados obtenidos, en ninguno de los casos superan el 70 %, mostrando que la cepa SP10B constituye una nueva especie del género *Spiribacter*. Actualmente nos encontramos realizando una caracterización taxonómica detallada de esta cepa para su posterior descripción como una nueva especie de *Spiribacter*.

Además estamos a la espera de la secuencia del genoma completo de las cepas SP30, SP10B, SP33B y SP62, datos que nos permitirán determinar la posición taxonómica exacta de cada uno de los nuevos aislados, además de aclarar la posición taxonómica del género *Halopeptonella*, el cual, en base a la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S, se encuentra agrupado con las especies del género *Spiribacter*.

En un principio podría parecer poco importante el aislamiento y determinación de nuevas cepas de especies ya descritas, pero la realidad es que es un estudio básico y necesario para poder entender la microbiota presente en estos ambientes, y que pueden tener una gran influencia en los mismos. Además permite tener datos del material genético presente en estos ambientes,

asignarlos en estudios metagenómicos futuros, y así poder conocer con mayor exactitud que material genético están aún por asignar y por tanto por descubrir.

## V. CONCLUSIONES

1. Los estudios de osmorregulación realizados en *Spiribacter salinus* confirman que la glicina betaína es el soluto compatible que ejerce un mayor papel osmoprotector, además de la colina-O-sulfato, el dimetilsulfoniopropionato y la ectoína. Además la glicina betaína es usada por *S. salinus* como nutriente.
2. La ectoína es sintetizada por *S. salinus* de manera proporcional a la concentración salina del medio externo, demostrando que la utiliza con un fin osmoprotector.
3. El estudio polifásico realizado sobre la cepa SP30, aislada de las salinas "Bras del Port" Santa Pola, ha demostrado que constituye una nueva especie del género *Spiribacter*, para la que se ha propuesto como denominación *Spiribacter aquaticus* sp. nov.
4. El estudio filogenético y genotípico realizado sobre la cepa SP10B, también aislada de las salinas "Bras del Port", demuestran que puede constituir una nueva especie del género *Spiribacter*, si bien se requiere completar su caracterización taxonómica.
5. Las cepas SP33B y SP62 se han aislado de las salinas "Bras del Port", y tras su estudio filogenético se han considerado nuevas cepas de la especie *Spiribacter salinus*.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Antón J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, Amann R. Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol.* 1999; 1: 517-523.
2. Antón J, Roselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, Amann R. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 3052-3057.
3. Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH. Haloviruses of *Archaea*, *Bacteria* and eukaryotes. *Curr Opin Microbiol.* 2015; 25: 40-48.
4. Bardavid RE, Oren A. The amino acid composition of proteins from anaerobic halophilic bacteria of the order *Halanaerobiales*. *Extremophiles.* 2012; 16: 567-572.
5. Benlloch S, Acinas SG, Antón J, López-López, Luz SP, Rodríguez-Valera F. Archeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb Ecol.* 2001; 41: 12-19.
6. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys.* 1959; 37: 911-917.
7. Brock TD. Ecology of saline lakes. En: Shilo M, editor. *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Ed. Weinheim: Verlag Chemie; 1979. p. 29-47.



8. Boch J, Kempf B, Schmid R, Bremer E. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the gbsAB genes. J Bacteriol. 1996; 178: 5121-5129.
9. Broy S, Chen C, Hoffmann T, Brock NL, Nau-Wagner G, Jebbar M et al. Abiotic stress protection by ecologically abundant DMSP and its natural and synthetic derivatives: insights from *Bacillus subtilis*. Environ Microbiol. 2015; 17: 2362-2378.
10. Casamayor O, Calderón-Paz JI, Pedrós-Alió C. 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. FEMS Microbiol Ecol. 2000; 34: 113-119.
11. Cowan ST, Steel KJ. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Londres: Cambridge University Press; 1965.
12. De la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A. Taxonomy of halophiles. En: Horikoshi K, Antranikian G, Bull A, Robb F, Stetter K, editores. Extremophiles Handbook. 1ª ed. Japan: Springer; 2011. p. 255-308.
13. Deole R, Challacombe J, Raiford DW, Hoff WD. An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content. J Biol Chem. 2013; 288: 581-588.
14. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. J Mol Evol. 1981; 17: 368-376.
15. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39: 783-791.
16. Fernández AB, Ghai R, Martín-Cuadrado AB, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. FEMS Microbiol Ecol. 2014a; 88: 623-635.
17. Fernández AB, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C, Ghai R, Papke RT, Rodríguez-Valera F et al. Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. Front Microbiol. 2014b; 5: 1-12.
18. Ferragut C, Leclerc H. Etude comparative des méthodes de détermination du  $T_m$  de l'ADN bactérien. Ann Microbiol. 1976; 127: 223-235.
19. Fitch WM. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. Syst Biol. 1971; 20: 406-416.
20. Garrity G, Bell JA, Lilburn T. Phylum XIV *Proteobacteria* phyl. nov. En: Garrity G, Brenner DJ, Krieg RN, Staley JR, editores. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, The *Proteobacteria*. 2ª ed. New York: Springer; 2005.
21. Ghai R, Pašić L, Fernández AB, Martín-Cuadrado AB, Mizuno CM, McMahon KD et al. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. Sci Rep-UK. 2011; 1: 1-10.
22. Gramman K, Volke A, Kunte HJ. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the *Bacteria* domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of

- ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581<sup>T</sup>. J Bacteriol. 2002; 184: 3078-3085.
23. Grant WD, Kamekura M, McGinity TJ, Ventosa A. Class III. *Halobacteria* class nov. En: Boone DR, Castenholz RW, Garrity G, editores. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1, The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototropic *Bacteria*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Springer; 2001. p. 294-301.
  24. Gupta RS, Naushad S, Baker S. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: A proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Micr. 2015; 65: 1050-1069.
  25. Imhoff JF. Reassignment of the genus *Ectothiorhodospira* Pelsh 1936 to a new family, *Ectothiorhodospiraceae* fam. nov., and emended description of the *Chromatiaceae* Bayendamm 1924. Int J Syst Evol Microbiol. 1984; 34: 338-339.
  26. Javor BJ. Solar salterns. En: Javor BJ, editor. Hypersaline Environments. 1<sup>a</sup> ed. Berlín: Springer-Verlag; 1989. p. 189-204.
  27. Johnson JL. Similarity analysis of DNAs. En: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editores. Methods for General and Molecular Bacteriology. 1<sup>a</sup> ed. Washington: American Society for Microbiology; 1994. p. 655-682.
  28. Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch Microbiol. 1998; 170: 319-330.
  29. Kiene RP, Linn LJ, Bruton JA. New and important roles for DMSP in marine microbial communities. J Sea Res. 2000; 43: 209-224.
  30. Koser SA. Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. J Bacteriol. 1923; 8: 493-520.
  31. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature. 1956; 178: 703.
  32. Kuhlmann AU, Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 772-783.
  33. Kushner DJ, Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. En: Rodríguez-Valera, editor. Halophilic Bacteria. 1<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC Press; 1988. p. 109-138.
  34. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo KD, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. J Biol Chem. 1989; 264: 6427-6437.
  35. León MJ, Fernández AB, Ghai R, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic

- bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. Appl Environ Microbiol. 2014; 80: 3850-3857.
36. León MJ. De la metagenómica al cultivo puro: *Spiribacter salinus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla; 2015.
37. León MJ, Rodríguez-Olmos A, Sánchez-Porro C, López-Pérez M, Rodríguez-Valera F, Soliveri J et al. *Spiribacter curvatus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saltern. Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65: 4638-4643.
38. León MJ, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C, Ventosa A. *Spiribacter roseus* sp. nov., a moderately halophilic species of the genus *Spiribacter* from salterns. Int J Syst Evol Microbiol. 2016; 66: 4218-4224.
39. López-Pérez M, Ghai R, León MJ, Rodríguez-Olmos A, Copa-Patiño JL, Soliveri J et al. Genomes of "*Spiribacter*", a streamlined successful halophilic bacterium. BMC Genomics. 2013; 14: 787-799.
40. Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J et al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis. 1998; 19: 554-568.
41. Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar et al. ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 2004; 32: 1363-1371.
42. Luk AWS, Williams TJ, Erdmann S, Papke RT, Cavicchioli R. Viruses of haloarchaea. Life. 2014; 4: 681-715.
43. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Madrid: Pearson-Prentice Hall; 2003.
44. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J Mol Biol. 1961; 3: 208-218.
45. Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J Mol Biol. 1962; 5: 109-118.
46. McGenity TJ, Oren A. Hypersaline environments. En: Bell EM, editor. Life at extremes: environments, organisms and strategies for survival. London: CABI International; 2012. p. 402-437.
47. Moreno ML, García MT, Ventosa A, Iglesias-Guerra F, Mellado E. The extremely halophilic bacterium *Salicola marasensis* IC10 accumulates the compatible solute betaine. Syst Appl Microbiol. 2010; 33: 308-310.
48. Nau-Wagner G, Boch J, Le Good JA, Bremer E. High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65: 560-568.
49. Oh D, Porter K, Russ B, Burns D, Dyall-Smith M. Diversity of *Haloquadratum* and other *Haloarchaeae* in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. Extremophiles. 2010; 14: 161-169.

50. Oren A, Heldal M, Norland S, Galinski EA. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*. 2002; 6: 491-498.
51. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*. 2008; 4: 2.
52. Oren A. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol*. 2013; 4: 315.
53. Oren A. Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Biotech*. 2015; 33: 119-124.
54. Owen RJ, Hill LR. The estimation of base compositions, base pairing and genome size of bacterial deoxyribonucleic acids. En: Skinner FA, Lovelock DW, editores. *Identification Methods for Microbiologists*. 2ª ed. London: Academic Press; 1979. p. 217-296.
55. Owen RJ, Pitcher D. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En: Goodfellow M, Minnikin DE, editores. *Chemical Methods in Bacterial Systematic*. 1ª ed. London: Academic Press; 1985. p. 67-93.
56. Pittelkow M, Tschapek B, Smits SHJ, Schmitt L, Bremer E. The crystal structure of the substrate-binding protein OpuBC from *Bacillus subtilis* in complex with choline. *J Mol Biol*. 2011; 411: 53-67.
57. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento. Metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infec Micr Clin*. 2004; 22: 238-245.
58. Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol*. 1981; 7: 235-243.
59. Rodríguez-Valera F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En: Rodríguez-Valera F, editor. *Halophilic Bacteria*. 1ª ed. Boca Raton: CRC-Press; 1988. p. 3-30.
60. Rodríguez-Valera F. Introduction to saline environments. En: Vreeland RH, Hochstein, editores. *The Biology of Halophilic Bacteria*. 1ª ed. Boca Raton: CRC-Press; 1993. p. 1-23.
61. Russell NJ, Kogut M. Haloadaptation: Salt sensing and cell envelope changes. *Microbiol Sci*. 1985; 2: 345-350.
62. Russell NJ. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *J Bioenerg Biomembr*. 1989; 21: 93-113.
63. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4: 406-425.
64. Sambrook J y Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.

65. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1994; 44: 846-849.
66. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52: 1043-1047.
67. Sukumar M, Jillepalli CM, Arora DK. Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis: methods and principles. En: Arora DK, Das S, Sukumar M, editores. *Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques.* 1ª ed. Berlín: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. p. 73-91.
68. Sutton GC, Russell NJ, Quinn PJ. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major fosfolipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1061: 235-246.
69. Swan BK, Tupper B, Sczyrba A, Lauro FM, Martínez-García M, González JM et al. Prevalent genome streamlining and latitudinal divergence of planktonic bacteria in the surface ocean. *P Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 11463-11468.
70. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse H-J, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purpose. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60: 249-266.
71. Vauclare P, Vincent M, Elisa F, Martínez N, Jasnin M, Gabel F et al. Molecular adaptation and salt stress response of *Halobacterium salinarum* cells revealed by neutron spectroscopy. *Extremophiles.* 2015; 19: 1099-1107.
72. Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol.* 1986; 128: 1959-1968.
73. Ventosa A, Arahál DR. Halophily (halophilism and halophilic microorganisms). En: Gerday C, Glansdorff N, editores. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).* Oxford: UNESCO Publishing-Eolss Publishers; 2002. p. 10010-10019.
74. Ventosa A. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. En: Logan NA, Lappin-Scott HM y Oyston PCF, editores. *Prokaryotic Diversity: Mechanism and Significance.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 223-254.
75. Ventosa A, Márquez MC, Sánchez-Porro C, De la Haba RR. Taxonomy of Halophilic *Archaea* and *Bacteria*. En: Vreeland RH, editor. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms.* Netherland: Springer; 2012. p. 59-80.
76. Ventosa A. Por fin una auténtica bacteria halófila moderada *Spiribacter salinus*. *Semáforo.* 2014; 57: 27-29.

77. Ventosa A, Fernández AB, León MJ, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles*. 2014; 18: 811-824.
78. Ventosa A, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Papke RT. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomics approach. *Curr Opin Microbiol*. 2015; 25: 80-87.
79. Wargo JM. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79: 2112-2120.
80. Widderich N, Höppner A, Pittelkow M, Heider J, Smits SHJ, Bremer E. Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *Plos One*. 2014; 9: 1-16.
81. Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, Van der Heide T et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol*. 2001; 130: 437-460.
82. Wood JM. Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65: 215-238.
83. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67: 1613-1617.
84. Ziegler C, Bremer E, Krämer R. The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol*. 2010; 78: 13-34.

