

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA



ESTUDIO TAXONOMICO Y GENETICO DE
Halococcus saccharolyticus sp. nov.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
 SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
 al folio 140 número 108 del libro
 correspondiente. 4 DIC. 1989
 Sevilla,

En este del Hogaciado de Tesis,

Alfonso de Hita

Memoria que presenta el Ldo.
 en Farmacia Carlos Gabriel
 Montero Herrero, para aspirar
 al grado de Doctor en Farmacia
 por la Universidad de Sevilla.

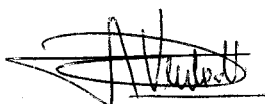
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta el Licenciado CARLOS GABRIEL MONTERO HERRERO para optar al grado de Doctor.

El director



Fdo: Antonio Ventosa Ucero



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FRANCISCO RUIZ BERRAQUERO, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Estudio taxonómico y genético de *Halococcus saccharolyticus* sp. nov." presentada por el Ldo. en Farmacia CARLOS GABRIEL MONTERO HERRERO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de esta Facultad bajo la dirección del Dr. D. ANTONIO VENTOSA UCERO.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 1 de Diciembre de 1989.

Fdo.: Francisco Ruíz Berraquero



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

ANTONIO VENTOSA UCERO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Estudio taxonómico y genético de *Halococcus saccharolyticus* sp. nov." presentada por el Ldo. en Farmacia CARLOS GABRIEL MONTERO HERRERO para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en este Departamento bajo mi dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 1 de Diciembre de 1989.

Fdo.: Antonio Ventosa Ucero

La realización de esta Memoria
ha sido parcialmente
financiada por la ayuda de la
Dirección General de
Investigación Científica y
Técnica, proyecto PB87-0945 y
por la Junta de Andalucía.

Parte de los resultados de esta Memoria fueron presentados en el XI Congreso Nacional de Microbiología (Gijón, 24-27 de Junio de 1989), en el FEMS Symposium (Troia, 18-23 de Septiembre de 1988) y en el FEMS-NATO Advanced Research Workshop (Alicante, 17-22 de Septiembre de 1989).

Algunos de estos resultados se han publicado en los trabajos: "Isolation and partial characterization of a plasmid in the extremely halophilic archaeobacterium Halococcus morrhuae CCM 537" J. Gen. Microbiol 134: 2959-2963 (1988); y "Toxicity of heavy metals to archaeobacterial halococci" System. Appl. Microbiol 11: 116-120 (1989).

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Antonio Ventosa Ucero, quien con su ayuda y dirección durante la realización del presente trabajo contribuyó en gran medida a mi formación.

Al Prof. Dr. D. Francisco Ruíz-Berraquero quien ha permitido y apoyado la realización de esta Tesis.

A la Dra. Pfeifer, por haberme permitido trabajar en su laboratorio así como por la cesión de numerosas cepas y sondas

Al Dr. Rodríguez-Valera, quien ha contribuido en la realización de los estudios de ultraestructura, así como ha animado enormemente a la realización del presente trabajo.

Al Dr. Kates por la colaboración prestada en la realización de los lípidos polares y al Dr. Rodríguez-Quifiones por la cesión de sondas.

A aquellos compañeros, que de una u otra forma han colaborado en la realización de este trabajo.

A la memoria de mi hermana

INDICE

	Pág.
I. - INTRODUCCION	1
1.- Ambientes extremos: medios hipersalinos	2
1.1.- Adaptación a altas concentraciones salinas	2
1.2.- Ambientes hipersalinos	7
1.3.- Clasificación de los microorganismos halófilos	10
2.- Arqueobacterias	12
2.1.- Clasificación	12
2.2.- Características de las arqueobacterias	17
3.- Halobacterias	20
3.1.- Taxonomía de halobacterias: bacilos halófilos extremos.	20
3.2.- Taxonomía de halobacterias: cocos halófilos extremos ..	26
3.3.- Fisiología de halobacterias	33
3.4.- Ecología de halobacterias	35
3.5.- Lípidos de halobacterias	36
3.6.- Pared celular	39
3.7.- Membrana purpúrea	41
3.8.- Vacuolas de gas	44
3.9.- Susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos	45
3.10.- Gránulos intracitoplasmáticos	52
4.- Genética de halobacterias	53
4.1.- Organización genómica	53
4.2.- Elementos de inserción	56
4.3.- Bacteriófagos	58
4.4.- Genes caracterizados en halobacterias	59

4.5.- Mecanismos de transferencia genética en halobacterias .	63
5.- Interés de las halobacterias	65
II.- OBJETIVOS	68
III.- MATERIAL Y METODOS	72
1.- Cepas utilizadas	73
2.- Caracterización fenotípica	75
2.1.- Características morfológicas y culturales	75
2.2.- Pruebas fisiológicas	76
2.3.- Pruebas bioquímicas	78
2.4.- Susceptibilidad a antibióticos y metales pesados	81
3.- Caracterización quimiotaxonómica	83
3.1.- Determinación del porcentaje de guanina más citosina (G+C) en el ADN	83
3.2.- Determinación de los lípidos polares	84
3.3.- Hibridación ADN-ARNr	85
3.3.1.- Aislamiento del ADN	85
3.3.2.- Aislamiento de ARNr total	86
3.3.3.- Análisis cualitativo y cuantitativo	89
3.3.4.- Unión de ADN a los filtros de nitrocelulosa	89
3.3.5.- Marcaje <u>in vitro</u> del ARNr	90
3.3.6.- Hibridación ADN-ARNr	92
3.3.7.- Determinación del porcentaje de hibridación ADN-ARNr	94
3.3.8.- Cálculo de las distancias filogenéticas	95
4.- Estudios genéticos	96
4.1.- Plásmidos empleados	96
4.2.- Sondas de hibridación	96

4.3.- Enzimas, isótopos y antibióticos	97
4.4.- Análisis de plásmidos en <u>Halococcus</u>	97
4.5.- Electroforesis en gel de agarosa	98
4.6.- Recuperación de ADN a partir de los geles	99
4.7.- Extracción y purificación de ADN plasmídico en <u>E. coli</u>	99
4.8.- Transformación	100
4.9.- Marcaje de ADN	101
4.10.- Hibridaciones de ADN	102
IV.- RESULTADOS	105
1.- Resultados pruebas fisiológicas, bioquímicas, nutricionales y morfología	106
2.- Resultados de las pruebas de susceptibilidad frente a diversos antibióticos y metales pesados	114
3.- Resultados de la caracterización quimiotaxonómica	117
4.- Resultados estudios genéticos.....	146
4.1.- Presencia de plásmidos en <u>Halococcus</u>	147
4.2.- Hibridación del plásmido pHM2 con <u>Halococcus</u> y otras halobacterias	148
4.3.- Construcción de una enciclopedia génica de <u>Halococcus</u> sp. P-423	153
4.4.- Hibridación con genes <u>nif</u>	162
4.5.- Hibridación con el gen de la bacteriorrodopsina	162
4.6.- Hibridación con elementos de inserción	163
4.7.- Hibridación con ARN 7S	163
V.- DISCUSION	165
VI.- CONCLUSIONES	188
VII.- BIBLIOGRAFIA	191

I. INTRODUCCION

I.1. AMBIENTES EXTREMOS: MEDIOS HIPERSALINOS

I.1.1. Adaptación a altas concentraciones salinas.

El crecimiento microbiano se describe de acuerdo a unas condiciones ideales, las cuales sólo se presentan en el laboratorio: temperatura constante y óptima, generalmente pH cercano a la neutralidad, nutrientes en condiciones de saturación y óptimo potencial redox. En la naturaleza, los ambientes varían ampliamente y algunos de ellos impiden el desarrollo de la mayoría de los seres vivos, aunque representan un hábitat óptimo para algunos tipos de microorganismos. De ahí, que la principal característica de un ambiente extremo sea la escasa diversidad de especies en él existentes (Brock, 1969).

Dentro de los distintos ambientes extremos se encuentran aquellos hábitats con una alta concentración salina, bien acuática, incluyendo las salinas solares y los lagos salados naturales, o suelos hipersalinos (Rodríguez-Valera 1988). En las salinas naturales se presenta una fuerte irradiación solar, así como una fuerte oscilación de la temperatura entre el día y la noche, una alta osmolaridad y un bajo contenido en oxígeno, lo cual contribuye al carácter extremófilo de dicho ambiente (Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983).

Los ambientes hipersalinos son hiperosmóticos, provocando una tendencia a la salida del agua de las células, y a su vez una

disminución de la actividad del agua, quedando ésta unida a los solutos y, por tanto, menos disponible para la actividad biológica (Brown, 1976). La naturaleza iónica de los solutos afecta también los valores de las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas responsables de la estructura terciaria de las proteínas (Lanyi, 1974).

La concentración de nutrientes encontrada en los hábitats con alta concentración salina depende de una serie de parámetros tales como la proximidad a ríos, polución, clima, naturaleza y extensión de la fauna y flora, factores que afectan asimismo al contenido bacteriano de dichos medios (Jones y col., 1981). Sin embargo, los ambientes hipersalinos derivados de agua de mar son muy abundantes desde el punto de vista nutritivo, habiéndose encontrado también una alta recirculación de nutrientes en lagos salados como el Gran Lago Salado; incluso en el Mar Muerto, parece que existen períodos de muy alta productividad (Rodríguez-Valera, 1988).

Los organismos que habitan ambientes hipersalinos han de adaptarse también a temperaturas elevadas, debido a que suelen encontrarse en zonas cálidas, sometidas a una fuerte irradiación solar, habiéndose registrado temperaturas de 45 a 50 °C en los estanques más concentrados a una temperatura ambiental de 30 °C (Rodríguez-Valera y col., 1985). Se ha observado un aumento de los requerimientos salinos a medida que aumenta la temperatura (Kushner, 1978).

El pH del agua de mar es aproximadamente 8,2, aunque conforme aumenta la salinidad, el pH disminuye y a niveles de saturación de cloruro sódico, el pH es próximo a la neutralidad, de esta manera las

aguas talasosalinas tienen valores de pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo, en aguas atalasalinas el pH varía considerablemente y en los lagos del Wadi Natrun (Egipto) presentan valores de 11,0 (Imhoff y col., 1979).

En los ambientes hipersalinos la concentración de oxígeno no es elevada, debido a que en el oxígeno presenta una baja solubilidad en los mismos, aunque si la presencia de algas o cianobacterias es abundante, se pueden mantener poblaciones elevadas de organismos aerobios (Copeland, 1967). Las halobacterias pueden crecer en concentraciones bajas de oxígeno, y parece ser que la resistencia a la sal es menor en poblaciones anaerobias que en las aerobias (Rodríguez-Valera, 1988).

Los ambientes hipersalinos abundan en zonas con elevada radiación solar. Los carotenoides, presentes en numerosas bacterias adaptadas a dichos hábitats, pueden servir como agentes protectores frente al daño inducido por la luz (Krinsky, 1979), siendo muy activos, como en el caso de las halobacterias, los mecanismos de fotoreactivación contra el daño en el ADN inducido por la luz ultravioleta (Hescox y Carlberg, 1972).

Con el fin de adaptarse a estos factores limitantes, los microorganismos que habitan en ambientes hipersalinos han desarrollado una serie de características: un aumento de la concentración intracelular de solutos, que al mismo tiempo permite mantener en el interior de la célula una actividad del agua adecuada para el desarrollo de los procesos metabólicos, aunque algunos de estos

microorganismos toleran bien una baja actividad del agua (Brown, 1976). Estos solutos se denominan solutos compatibles, aplicando este término a aquellos solutos que mantienen la presión osmótica en el interior celular permitiendo la función enzimática. En algas verdes halófilas, como Dunaliella, el principal soluto compatible es el glicerol (Brown, 1976), en Ectothiorhodospira halochloris lo constituye la betaína (Galinski y Trüper, 1982), el mismo que en bacterias halófilas moderadas (Imhoff y Rodríguez-Valera, 1984), la ectoína se ha detectado como soluto compatible en el género Ectothiorhodospira y en otras bacterias halófilas; también se han encontrado numerosos compuestos que actúan como tales solutos compatibles en cianobacterias, como sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol, etc., los cuales asimismo varían de unas cepas a otras (Kushner y Kamekura, 1988). No obstante, los solutos compatibles varían en función de las condiciones de crecimiento, fase de crecimiento y composición del medio. Así, en bacterias halófilas moderadas cultivadas en medios complejos se detectó betaína, mientras que en medios mínimos se identificaron prolina, glutamato, trehalosa y glucosa como solutos compatibles (Wohlfarth y col., 1988). Recientemente se han encontrado nuevos solutos compatibles todavía no identificados (Galinsky, comunicación personal).

En halobacterias el cloruro potásico actúa como soluto compatible, del cual se necesita una concentración de 1 mg/ml para un crecimiento óptimo de dichas bacterias (Kushner, 1985), aunque la importancia de los iones Mn^{2+} y Mg^{2+} no ha sido plenamente establecida (De Medicis,

1986). También se han detectado como soluto compatible glicina betaina en Halobacterium salinarium y en las bacterias alcalófilas, aunque no en suficiente concentración para equilibrar la presión osmótica externa (De Rosa y col., 1988).

Asimismo, en estos microorganismos se han modificado las características de sus proteínas, las cuales para su actividad dependen de una alta concentración de potasio y también toleran altas concentraciones de NaCl. Las proteínas halobacterianas tienen un alto contenido de aminoácidos ácidos, comparadas con las proteínas de no halófilos (Lanyi, 1974; Russell, 1988). Sin embargo, los niveles de residuos ácidos no son suficientes para explicar porqué las proteínas permanecen hidratadas a una concentración >4 M de NaCl. En las bacterias pertenecientes al género Ectothiorhodospira, aquellas especies con mayores requerimientos de sal presentan las proteínas de membrana con mayor proporción de aminoácidos ácidos (Imhoff, 1986). Este ejemplo de adaptación genotípica sugiere que la composición rica en aminoácidos ácidos propia de las proteína halófilas es importante para explicar sus propiedades halófilas. Sin embargo, la bacteriorrodopsina, la proteína de membrana más estudiada de las halobacterias no requiere sodio para su actividad, es decir, no es halófila, de ahí que el contenido en aminoácidos de las proteínas de las bacterias halófilas no sea capaz de explicar por sí solo las propiedades particulares de estas proteínas (Werber y col., 1986; Russell, 1988).

La estabilidad de los ribosomas de las halobacterias se ve condicionada por la presencia de una elevada concentración salina (3 M de KCl y 0.1 M de $MgCl_2$), y muchas aminoacil-ARNt-sintetasa de halobacterias funcionan mejor a una concentración de 3.8 M de KCl, aunque en sí mismos no requieran una elevada concentración de sales (Kushner, 1985).

I.1.2. Ambientes hipersalinos.

Los ambientes hipersalinos están constituidos fundamentalmente por aguas y suelos, encontrándose dentro del primer grupo los lagos salados naturales y las salinas solares. Estos ambientes acuáticos hipersalinos se han originado en su mayoría a partir del mar, mediante la evaporación del agua del mar y concentración de sales en ella presentes, especialmente cloruro sódico (Rodríguez-Valera y Ruíz-Berraquero, 1983).

Las salinas solares constituyen un sistema construido por el hombre para obtener sal común, y están basadas en una serie de lagunas más o menos extensas, abundando bien de modo natural o artificial en las costas bajas de la zona mediterránea y en Baja California (Rodríguez-Valera y Ruíz-Berraquero, 1983).

Los lagos salados, sin embargo, se han originado por disolución de depósitos minerales, conteniendo por tanto en ocasiones una proporción de sales distinta de la encontrada en los medios marinos típicos (Brock, 1979). Asimismo, algunas salinas presentan una proporción de

sales distinta a la del agua del mar (Del Moral y col., 1987). Esta diferenciación con respecto al contenido de sales inorgánicas da lugar a dos tipos diferentes de medios acuáticos hipersalinos: talasosalinos y atalasosalinos, según presenten una composición de sales inorgánicas cualitativamente similar o diferente, respectivamente, a la encontrada en el agua de mar (Brock, 1979; Edgerton y Brimblecombe, 1981).

La diversidad y densidad de organismos es mayor en lagos talasosalinos, como el Gran Lago Salado, que en atalasosalinos, como el Mar Muerto; este factor se explica en función de la mayor abundancia de lagunas formadas por evaporación de agua del mar, frente a una menor frecuencia de los lagos atalasosalinos (Brock, 1979).

En las salinas de estanque múltiple se encuentran todos los tipos de salinidad posible, permitiendo estudiar la ecología microbiana de aguas talasosalinas. Los tipos de microorganismos presentes en estas aguas dependen fundamentalmente de la salinidad de las mismas (Rodríguez-Valera y col., 1985; Márquez y col., 1987; Rodríguez-Valera, 1988).

En el rango de salinidad comprendido entre el 3,5 y el 10 %, los organismos predominantes son cianobacterias, algas diatomeas, organismos fotosintéticos y bacterias marinas (Davis, 1978; Javor, 1983). A estas concentraciones de sales, las bacterias halotolerantes aparecen en una proporción muy baja con respecto a las bacterias marinas (Márquez y col., 1987).

Al aumentar la salinidad en el rango comprendido entre el 10 y el 20 % las bacterias heterótrofas presentes son casi exclusivamente

bacterias halófilas moderadas. Las bacterias halotolerantes y marinas desaparecen al ir aumentando la salinidad, si bien algunas de ellas son capaces de crecer a estas concentraciones (Rodríguez-Valera y col., 1985; Márquez y col., 1987). Las bacterias halófilas extremas poseen generalmente mayores requerimientos salinos para crecer que el rango comprendido entre el 10 y el 20 %, aunque algunas especies como Haloferax mediterranei predomina en estanques cuya concentración es menor del 20 % (Rodríguez-Valera y col., 1985).

En las salinas solares, al aumentar la concentración de sales del 20 al 30 %, disminuye gradualmente la concentración de bacterias halófilas moderadas a medida que aumenta la salinidad del medio. Por encima del 25 % se aíslan muy pocos organismos de este tipo (Ventosa y col., 1982; 1983; Quesada y col., 1982; Rodríguez-Valera y col., 1985; Márquez y col., 1987), predominando a esta concentración miembros de la familia Halobacteriaceae (Rodríguez-Valera, 1988).

La información existente sobre la ecología microbiana de los suelos hipersalinos es muy escasa. Quesada y col. (1982; 1983) estudiaron suelos hipersalinos localizados en estanques abandonados de una salina. En estos suelos encontraron una gran población microbiana, siendo la mayoría de los organismos aislados eubacterias halófilas con un marcado carácter eurihalino y un crecimiento óptimo al 10 % de sales totales. Asimismo, esta población microbiana mostraba desde el punto de vista taxonómico grandes diferencias con respecto a las aguas hipersalinas.

1.1.3. Clasificación de los microorganismos halófilos.

Existen varios criterios para clasificar a los organismos halófilos. Gibbons (1970), basándose en los límites superior e inferior de sal que permiten el crecimiento bacteriano definió los microorganismos halófilos como organismos que necesitan más del 3 % de NaCl para crecer, siendo los halófilos moderados aquellos que crecen en el rango del 3 al 15 % y los halófilos extremos aquellos que crecen en medios con concentraciones de NaCl superiores al 15 %.

Kushner (1985), clasificó a los distintos microorganismos según la concentración salina óptima requerida para su crecimiento en 6 grupos, siendo ésta la clasificación recogida también por Kushner y Kamekura (1988):

- 1.- No halófilos, que presentan un crecimiento óptimo en medios con menos de 0,2 M de sal (\approx 1 %). Incluye a la mayoría de las eubacterias y microorganismos de agua dulce.
- 2.- Halófilos débiles, que presentan un rango óptimo de crecimiento entre 0,2-0,5 M de sal (\approx 1-3 %). Incluye a la mayoría de los microorganismos marinos.
- 3.- Halófilos moderados, que presentan un crecimiento óptimo en medios provistos de 0,5 M a 2,5 M de sal (\approx 3-15 %). Incluye eubacterias como Vibrio costicola, Paracoccus halodenitrificans, Micrococcus halobius, etc. y arqueobacterias metanógenas como Methanohalophilus mahaii, Methanohalophilus zhilinae y Halomethanococcus doii (Paterek y Smith, 1988; Mathrani y col., 1988; Yu y Kawamura, 1987).

4.- Halófilos extremos débiles, microorganismos que presentan un crecimiento óptimo en medios entre 1,5 y 4,0 M de sal (\approx 9-23 %). Incluye un número reducido de microorganismos como Ectothiodospira halophila, Actinopolyspora halophila, Haloferax volcanii y Haloferax mediterranei.

5.- Halófilos extremos, microorganismos con un crecimiento óptimo entre 2,5 y 5,2 M de sal (\approx 15-30 %). Incluye a las halobacterias y algunos metanógenos como Methanohalobium evestigatus (Zhilina y Zavarzin, 1987).

6.- Halotolerantes, microorganismos no halófilos que toleran la sal. Incluye a Staphylococcus aureus, bacterias esporuladas, algunas levaduras, algas y hongos.

Larsen (1986), basándose en una distinción entre "tolerancia" y "requerimiento" hacia la sal, define los organismos halotolerantes como aquellos que si bien toleran la sal, crecen mejor en ausencia de la misma y establece las siguientes categorías:

1. No tolerantes, son aquellos que toleran sólo pequeñas cantidades de sal (\approx 1%).
2. Débilmente tolerantes, que toleran hasta un 6-8% de sal.
3. Moderadamente tolerantes, que crecen hasta un 18-20 % de sal.
4. Tolerantes extremos, que son capaces de crecer en un rango de salinidad que oscila desde cero hasta la saturación.

Los organismos halófilos, que son aquellos que requieren sal para crecer, los clasifica en:

1. Halófilos débiles, los cuales crecen óptimamente al 2-5 % de sal.

2. Halófilo moderados, que crecen mejor a concentraciones de sal del 5 al 20 %.

3. Halófilos extremos, con óptimo de crecimiento por encima del 25 % de sal.

I.2. ARQUEOBACTERIAS

I.2.1. Clasificación.

Los estudios estructurales de ARNr 16S contribuyeron a un conocimiento más profundo de las relaciones filogenéticas entre los distintos microorganismos. Fruto de estos estudio fue la propuesta de un tercer tronco filogenético, denominado Archaeobacteria, diferente a las eubacterias y eucariotas (Woese y Fox, 1977; Magrum y col., 1978; Woese y col., 1978). Los metanógenos fueron los primeros microorganismos considerados como pertenecientes a este nuevo tronco de las arqueobacterias (Wolfe, 1971, 1979; Fox y col., 1977). Posteriormente, Woese y col. (1978) incluyeron a los termoacidófilos Sulfolobus y Thermoplasma y Magrum y col. (1978) a las halobacterias. La figura 1 presenta la relación filogenética propuesta recientemente para las arqueobacterias (Woese, 1987).

Esta teoría filogenética de clasificación actualmente se encuentra

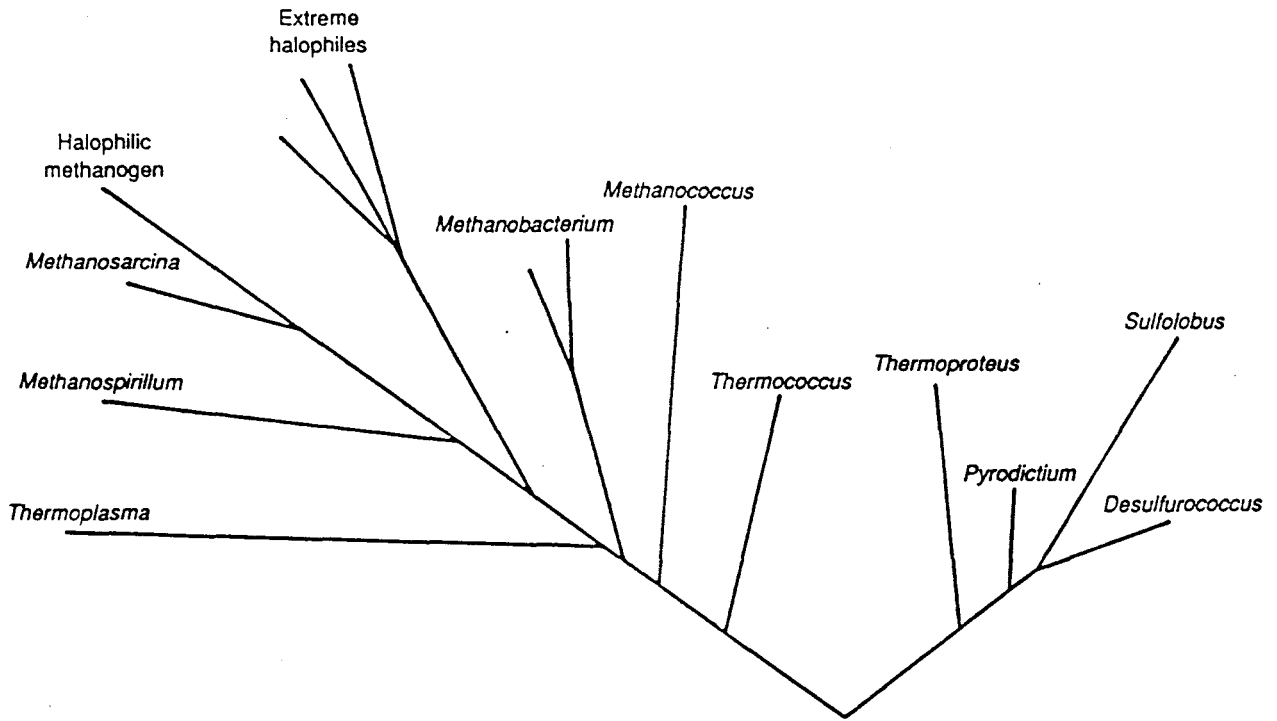


Figura 1. Arbol filogenético de las arqueobacterias basado en la comparación de las secuencias de los ARNr 16S (Woese, 1987).

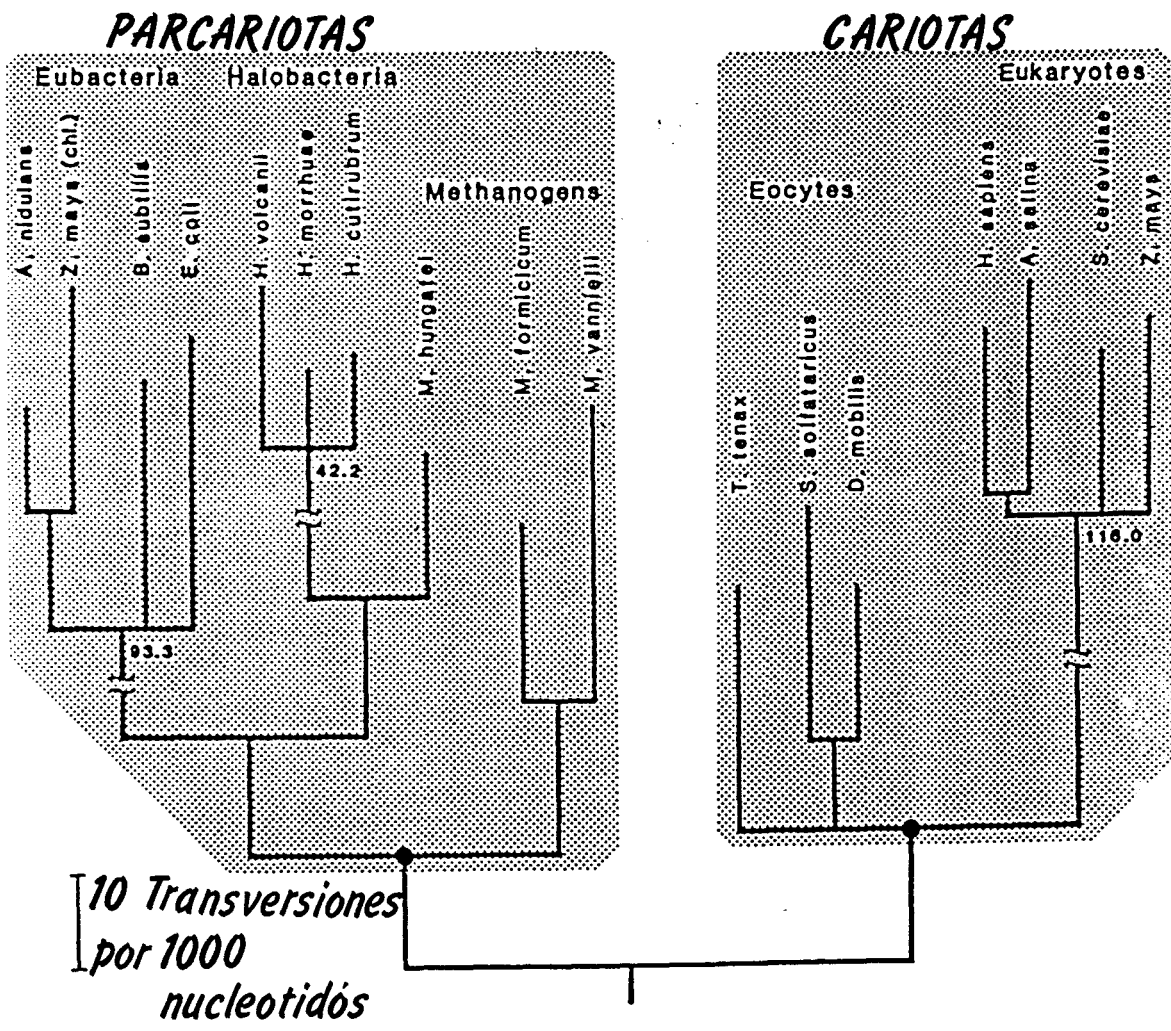


Figura 2. Clasificación de los organismos en dos reinos: parcariotas y cariotas, propuesta por Lake (1989).

en debate, ya que Lake (1989), propone una nueva clasificación (Fig. 2), en parcariotas y cariotas. Los parcariotas incluirían eubacterias, halobacterias y metanógenos, mientras que los cariotas incluirían los eucariotas y los eocitos, estos últimos incluyendo los tradicionalmente considerados termacidófilos (Lake, 1986). Esta teoría se basa en la estructura de los ribosomas, ya que en los primeros trabajos de Lake y col. (1984) se apreció una relación filogenética entre la estructura de las subunidades mayor y menor de los ribosomas de eucariotas y eocitos por un lado, y por otra parte entre las mismas subunidades de eubacterias, halobacterias y metanógenos. Por otra parte, Lake (1988) afirma que la estructura filogenética actualmente aceptada se ha producido debido a errores sistemáticos en los métodos habituales de análisis. Sin embargo, frente a esta estructuración filogenética, Olsen y Woese (1989) no creen demostrado que los análisis habituales produzcan los errores aludidos por Lake (1988). El modelo propuesto por Lake entra también en contradicción con el de evolución de la ARN polimerasa dependiente de ADN (Zillig y col., 1989) y el obtenido usando inhibidores de la síntesis de proteínas (Oliver y col., 1987).

Actualmente, las arqueobacterias comprenden cinco grupos de microorganismos muy diversos (König y Stetter, 1989a):

I. Metanógenos, son bacterias capaces de formar metano como el principal producto final de su metabolismo. Pueden servir como sustratos formiato, acetato, metanol o metilaminas. El azufre elemental puede ser reducido a H_2S sin ganancia de energía. Son

anaerobios estrictos. Muestran una epifluorescencia verde-azulada a 420 nm. Las células poseen coenzima M, factor 420, factor 430 y metanopterinina.

Los metanógenos se encuentran divididos en tres órdenes: Methanobacteriales, Methanomicrobiales y Methanococcales (Balch y col., 1979; Whitman, 1985).

Además se han descrito representantes de la familia Methanoplanaceae y del género Methanosphaera sin haber sido incluidos en ninguno de los anteriores grupos (Boone y Mah, 1989).

II. Arqueobacterias reductoras de sulfato, que son capaces de formar H₂S mediante reducción de sulfato, formando además trazas de metano. Son termófilos extremos (crecimiento hasta 92 °C). Son anaerobios estrictos. Dan lugar a una fluorescencia verde-azulada a 420 nm. Poseen factor 420 y metanopterinina, pero no coenzima M ni factor 430. Incluye el género Archaeoglobus (Stetter, 1989).

III. Arqueobacterias halófilas extremas. Son Gram negativas o Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas quimioorganotrofas. Incluye cocos, bacilos o formas más o menos irregulares. Requieren para crecer altas concentraciones de NaCl (1,5 M o mayor). Algunas son alcalófilas. Mesófilas o ligeramente termófilas (hasta 55 °C). Algunas especies contienen bacteriorrodopsina y son capaces de utilizar la luz para la síntesis de ATP.

IV. Arqueobacterias sin pared celular. Son formas cocoides termoacidofílicas sin pared celular. La membrana citoplasmática

contiene una glicoproteína rica en manosa y un lipoglicano. Aerobios. Incluyen el género Thermoplasma (Langworthy y Smith, 1989).

V. Termófilos extremos metabolizadores de azufre elemental. Son termófilos aerobios obligados, aerobios facultativos o estrictamente anaerobios. Presentan una temperatura óptima de crecimiento entre 70 y 105 °C. Son acidófilos o neutrófilos. La mayoría de las especies son metabolizadoras de azufre. Se encuentran divididos en tres órdenes: Thermococcales, Thermoproteales y Sulfolobales (König y Stetter, 1989b).

1.2.2. Características de las arqueobacterias.

Las principales características diferenciales entre los organismos pertenecientes a los tres reinos primarios se exponen en la tabla 1. A continuación se estudian con más detalle, por considerarlos de gran interés la composición de los diferentes tipos de pared celular y el tipo de lípidos presentes en las arqueobacterias.

Pared celular.

Las arqueobacterias no poseen mureína en su pared celular (Kandler, 1982), pudiendose detectar los siguientes tipos de pared celular (König, 1988):

1. Pared celular con pseudomureína, presente en algunos metanógenos (Methanobacteriales), conteniendo ácido L-talasaminourónico en vez de ácido murámico, y los enlaces entre la N-acetilglucosamina y el

Tabla 1. Características diferenciales entre los tres reinos primarios (adaptada de Sanz y Amils, 1988).

Característica	Reino Primario		
	Arqueobacterias	Eubacterias	Eucariotas
Tamaño (µm)	aprox. 1	aprox. 1	aprox. 10
Membrana nuclear	- ^a	-	+
Pared celular	muy diversas	con mureína	falta, a veces de celulosa o quitina
Lípidos de membrana			
Tipo de cadena	fitanil y bifitanil	ácidos grasos	ácidos grasos
Unión del glicerol	éter	éster	éster
ATPasas	no sensible a toxina diftérica	sensible a toxina diftérica eubacteriana	no sensible a toxina diftérica eucarita
ARN polimerasa	diversas		
Proteína tipo histonas	+	-	+
Ribosomas:			
Tamaño de subunidades	30S, 50S	30S, 50S	40S, 60S
Aminoácido iniciador del ARNt	metionina	formilmetionina	metionina
Extremo terminal 5' del ARNr 5S trifosforilado	- ^b	-	+
Nucleótidos modificados en el ARNr 16/18S	10 ^b	10	25
Dihidrouracilo en el ARNt	- ^c	+	+
Relación Proteínas/ARNr	variable ^d	baja	alta
Orden de transcripción de los genes del ARNr:			
5'(16S-(ARNt)-23S-5S) 3'	+ ^e	+	-
ARNm con poli-A	- ^b	+	+

^a += Presenta la característica; -= No presenta la característica

^b Excepto para los termófilos extremos metabolizadores del azufre

^c Excepto en los Methanomicrobiales

^d Baja en Methanobacteriales, Methanomicrobiales y halbacterias, alta en todos los demás.

^e Excepto en *Thermoplasma* y termófilos extremos metabolizadores del azufre.

N-acetiltalasaminourónico son enlaces β (1-3) a diferencia de los enlaces β (1-4) existentes en la mureína de eubacterias (Kandler y König, 1985).

2. Pared celular constituida principalmente por condriotina, presente en algunos metanógenos como Methanosarcina, el cual posee asimismo un polímero sulfatado (Kandler y König, 1985).

3. Pared celular compuesta de una capa superficial de subunidades proteicas o glicoproteínas ordenadas regularmente, (Kandler, 1984).

Las envueltas proteicas se encuentran en halobacterias, algunos metanógenos y en algunos miembros de los termófilos extremos, y consiste en una capa de subunidades protéicas o glicoprotéicas, siendo muy variados los carbohidratos que componen las cadenas de la glicoproteína (Kandler y König, 1985). Las envueltas proteicas de arqueobacterias están formadas por proteínas ricas en aminoácidos ácidos y poseen una pequeña proporción de aminoácidos sulfatados (Sleytr y Messner, 1983).

4. Pared celular con envolturas heteropolisacáridas, como en Halococcus (Schleifer y col., 1982) y Methanosarcina (Kreisl y Kandler, 1986); en el primer caso con un heteropolisacárido sulfatado con N-glicil-D-glucosamina (Schleifer y col., 1982) y en el segundo con polímeros de D-glucurónico y N-acetilgalactosamina (Kreisl y Kandler, 1986).

5. Sin pared celular como Thermoplasma y Methanoplasma (Darland y col., 1970; Rose y Pirt, 1981) .

Lípidos.

Los ácidos grasos típicos presentes en eubacterias y eucariotas no se presentan en arqueobacterias (Langworthy y Pond, 1986). Los lípidos arqueobacterianos presentan cadenas hidrocarbonadas isoprenoides e hidroisoprenoides de 20, 25 ó 40 átomos de carbono unidas al glicerol por enlaces de tipo éter, bien diéter difitanilglicerol o tetraéter dibifitanilglicerol. El carbono 1 del glicerol puede estar sustituido por fosfato o varios sacáridos y la cadena isoprenoide puede contener varios anillos cíclicos de cinco átomos de carbono. Por otra parte, la actividad óptica característica del carbono central del glicerol es en arqueobacterias opuesta a la que posee en los otros dos Reinos primarios (Langworthy, 1985). Los diéteres permiten la formación de una bicapa normal, mientras que los tetraéteres predominantes en las arqueobacterias termófilas dependientes del azufre sólo permiten la formación de una monocapa (Langworthy, 1985).

I.3. HALOBACTERIAS

I.3.1. Taxonomía de halobacterias: bacilos halófilos extremos.

Las halobacterias se incluyeron en numerosos géneros que se correspondían con algunas de sus características: pigmentación, tinción de Gram, tamaño, etc. Así, en la séptima edición del Manual de Bergey (Elazari-Volcani, 1957), los bacilos halófilos extremos se situaban en el género Halobacterium dentro de la familia

Pseudomonadaceae y los cocos en la familia Micrococaceae. En la octava edición del Manual de Bergey (Gibbons, 1974) se agrupó a estos microorganismos en la familia Halobacteriaceae que comprendía los géneros Halobacterium y Halococcus, con la inclusión en el primero de dos especies: H. salinarium y H. halobium, y en el segundo, de una única especie: Halococcus morrhuae. H. salinarium y H. halobium se consideraban entonces como especies separadas, sin embargo, actualmente H. salinarium y H. halobium, junto con Halobacterium cutirubrum, son consideradas como una sola especie, con el nombre de H. salinarium (Larsen y Grant, 1989). Esta reclasificación se debe a la semejanza existente entre sus propiedades fisiológicas y a que presentan los mismos catálogos de oligonucleótidos (Fox y col., 1980).

Con posterioridad a la octava edición del Manual de Bergey (Gibbons, 1974) se describieron algunas especies: H. volcanii (Mullakhanbhai y Larsen, 1975), H. saccharovororum (Tomlinson y Hochstein, 1976), H. vallismortis (González y col., 1978) y H. pharaonis (Soliman y Trüper, 1982), H. sodomense (Oren, 1983a) y H. mediterranei (Rodríguez-Valera y col., 1983).

Tindall y col. (1984) aislaron y describieron a partir del lago Magadi en Kenia, halobacterias alcalófilas, describiendo los géneros Natronobacterium, incluyendo las especies N. gregoryi, N. magadii y N. pharaonis, (anteriormente Halobacterium pharaonis) y el género Natronococcus con la especie N. occultus.

Walsby (1980) aisló y describió un nuevo tipo de bacterias con morfología "cuadrangular" que contenían vacuolas de gas y

posteriormente Javor y col. (1982) aislaron halobacterias con una morfología similar y sugirieron su inclusión en un nuevo género: "Haloarcula" y para las cepas aisladas propusieron los nombres " H. sinaiensis" y "H. californiae".

Torreblanca y col. (1986) basándose en estudios de taxonomía numérica, quimiotaxonómicos y análisis genotípicos realizados por Ross y Grant (1985), propusieron la clasificación de las halobacterias no alcalófilas en tres géneros: Halobacterium, Haloarcula y Haloferax, cuyas características diferenciales se indican en la tabla 2.

Dentro del género Halobacterium se incluyeron las especies H. salinarium, H. saccharovororum y H. sodomense, constituyendo bacilos largos, móviles y en ocasiones vacuolados. Estas especies no requieren una concentración de magnesio mayor de 5 mM , aunque sí altas concentraciones de sales. Tienen un tiempo de generación de 5-7 horas y una temperatura óptima de crecimiento de unos 45 °C. Tienen requerimientos nutritivos complejos.

Dentro del género Haloarcula, se incluyeron H. vallismortis (anteriormente Halobacterium vallismortis) y la nueva especie H. hispanica (Juez y col., 1986). Estas especies presentan diversidad desde el punto de vista metabólico y requieren una concentración intermedia de sales para su crecimiento. Presentan un tiempo de generación de 4-5 horas. Tienen una temperatura óptima de crecimiento de 40-45 °C.

Dentro del género Haloferax, se incluyeron H. volcanii, H. mediterranei (anteriormente Halobacterium volcanii y Halobacterium

Tabla 2. características diferenciales de las halobacterias no alcalófilas (Torreblanca y col., 1986).

	Género <u>Halobacterium</u>	Género <u>Haloarcula</u>	Género <u>Haloferax</u>
Especies incluidas	<u>H. salinarium</u> <u>H. saccharovororum</u> <u>H. sodomense</u>	<u>H. hispanica</u> <u>H. vallismortis</u> "H. californiae"	<u>H. volcanii</u> <u>H. mediterranea</u> <u>H. gibbonsii</u>
Tamaño de colonia	1 mm	1-2 mm	2-3 mm
Morfología celular	bacilos largos	bacilos cortos pleomórficos	bacilos cortos pleomórficos
Requieren			
aminoácidos	+	-	-
Concentración de			
Mg ²⁺ para crecer	0,005 M	0,005 M	0,01 - 0,04 M
Porcentaje mínimo de			
sales para crecer	20	15	10
G + C (mol %) del ADN	66-71	62-68	59,5-64
Lípidos polares:			
PGS ¹	+	+	-
S-DGD	-	-	+
DGD-1	-	-	+
S-TGD y S-TeGD			
o GLD	+	-	-
DGD-2 y TGD-2			
o TGD-1	+	+	-

¹PGS: Fosfatidilglicerosulfato; S-DGD: Diglucosil diéter sulfato; DGD-1: Diglucosil diéter; S-TGD: Triglucosil diéter sulfato; S-TeGD: Tetraglucosil diéter sulfato; GL-2: Glucolípido desconocido; DGD-2: Diglucosil diéter desconocido; TGD-1 y TGD-2: Triglucosil diéter.

mediterranei, respectivamente) y la nueva especie H. gibbonsii (Juez y col., 1986). Estas especies necesitan una alta concentración de magnesio para su crecimiento (de 10 a 40 mM) y presentan una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C. Tienen un tiempo de generación de 2-3 horas (Grant y Larsen, 1989c).

Tomlinson y col. (1986) aislaron una nueva especie a partir de sedimentos de una salina solar en San Francisco, para la que proponen su inclusión en el género Halobacterium con la denominación de H. denitrificans. Recientemente Tindall y col. (1989), basándose en las características bioquímicas y quimiotaxonómicas han incluido dicha especie en el género Haloferax, como H. denitrificans.

Franzmann y col. (1989) han descrito recientemente una nueva especie, Halobacterium lacusprofundi aislada del Océano Antártico, capaz de crecer a 4 °C, aunque más lentamente que a 31-37 °C.

Halobacterium marismortui, se consideró como una especie de situación incierta en la octava edición del Manual de Bergey (Gibbons, 1974), sin embargo, debido a la carencia de una cepa de referencia ya que nunca se depositó en una colección de cultivo y a su desaparición, se eliminó del volumen primero de la edición actual del Manual de Bergey (Larsen, 1984), y se incluye actualmente como especie de situación incierta dentro del género Haloarcula (Grant y Larsen, 1989b). Una especie conocida como "Halobacterium del Mar Muerto", aislada por Ginzburg y col. (1970) se asemeja en su descripción a la cepa original de Halobacterium marismortui descrita por Elazari-Volcani (1957). Esta se ha comparado recientemente con Haloarcula

vallismortis ATCC 29715, presentando una gran homología con respecto a sus ARNr 5S y 16S, aunque existen diferencias con respecto a la morfología celular y capacidad de utilización de azúcares y otros compuestos (Oren y col., 1988).

Otra especie incluida actualmente dentro del género Halobacterium es H. trapanicum, la cual parece estar relacionada con H. saccharovorum y H. sodomense, constituyendo un taxon adicional distinto de las otras halobacterias (Ross y Grant, 1985; Larsen y Grant, 1989).

Recientemente Hamamoto y col. (1988) han aislado una arqueobacteria halófila triangular, para la cual han propuesto el nombre de "Haloarcula japonicus" basándose en sus características biológicas y taxonómicas.

Grant y Larsen (1989a) han incluido todas las halobacterias en el orden Halobacteriales, basándose en los estudios de hibridación ADN/ARNr 16S realizados por Ross y Grant (1985). Estos autores sugirieron agrupar a las arqueobacterias halofílicas en 9 grupos distintos, coincidentes con los obtenidos anteriormente según el estudio de lípidos polares (Ross y col., 1985), indicando que la homología en el ADN entre cepas de grupos homólogos en el ARNr era superior al 32 %. Así, actualmente todas las halobacterias se encuentran agrupadas en el orden Halobacteriales, dentro de la familia Halobacteriaceae, la cual agrupa los siguientes géneros: Halobacterium, Haloarcula, Haloferax, Halococcus, Natronobacterium y Natronococcus (Grant y Larsen, 1989a).

I.3.2. Taxonomía de halobacterias: cocos halófilos extremos.

Los primeros autores en describir los cocos halófilos extremos fueron Poulsen (1879), que propuso el nombre Sarcina litoralis y Farlow, que propuso el nombre de Sarcina morrhuae en 1880, aunque este autor cambió el nombre S. morrhuae a S. litoralis por razones de prioridad (Farlow, 1886). La descripción de Farlow correspondía a un microorganismo "no pigmentado", presentando tetradas "rodeadas de una fina envuelta hialina". Sin embargo, Farlow no fue capaz de cultivar el microorganismo (Farlow, 1886).

Klebahn, en 1919 aisló varias cepas de cocos halófilos extremos a partir de pescado en salazón y las caracterizó como pertenecientes a las especies Sarcina morrhuae y a la nueva especie Micrococcus (Diplococcus) morrhuae, las cuales se diferenciaban en función de sus características morfológicas y culturales (Klebahn, 1919). Estas dos especies fueron también aisladas a partir de agua del Mar muerto por Elazari-Volcani (1940).

Petter (1932) consideró que los cocos halófilos extremos son variables pudiendo presentar diferentes agrupaciones o cambiar de tamaño dependiendo de las condiciones de cultivo, y los consideró como una sola especie: S. morrhuae.

Durante este período se describieron numerosas especies de cocos halófilos extremos: Micrococcus litoralis (considerado sinónimo de Sarcina morrhuae por Stuart y col., 1933), Diplococcus gadidarum y M. litoralis gadidarum (considerados variedades de S. litoralis por

Stuart y col., 1933), Tetracoccus roseus halophilus, Micrococcus roseus halophilus, etc (Juez, 1988). Schoop en 1935, propone incluir a los cocos halófilos extremos en un solo género: Halococcus, aunque no fue tomado en consideración.

En la sexta edición del Manual de Bergey (Breed y col., 1948), sólo se reconoce una especie Sarcina litoralis Poulsen, mientras que Micrococcus (Diplococcus) morrhuae Klebhan se incluía como una especie de situación incierta en el apéndice III de la familia Micrococcaceae.

Venkataraman y Sreenivasan (1956) propusieron que se debían diferenciar cuatro especies de cocos halófilos extremos: Sarcina litoralis, S. morrhuae, Micrococcus morrhuae y M. roseus halophilus en base a ciertos aspectos morfológicos y dos pruebas fisiológicas (hidrólisis del almidón y de la caseína). Ellos apoyaban la idea de agrupar estos cocos en un único género, recuperando el nombre de Halococcus.

En la séptima edición del Manual de Bergey (Blazari-Volcani, 1957), los cocos halófilos extremos se incluyeron en los géneros Sarcina y Micrococcus, dentro de la familia Micrococcaceae. Se reconocían las especies S. litoralis y M. morrhuae diferenciándose únicamente con respecto a la capacidad de hidrolizar la gelatina, la cual es realizada por Micrococcus morrhuae pero no por Sarcina morrhuae.

Hayashi (1968), indujo teóricamente un nuevo género Halococcus a través de su concepto de especie central, agrupando a través de él

algunas especies incluidas en los géneros Micrococcus y Sarcina, aunque los incluyó finalmente dentro de la familia Neisseriaceae.

La sugerencia primitiva de incluir a los cocos halófilos extremos en un único género: Halococcus fue mantenida por Kocur y Hodgkiss (1973). Estos autores estudiaron 22 cepas de colección previamente descritas, concluyendo que pertenecían a una sola especie para la que propusieron la denominación de Halococcus morrhuae. Ellos manifestaron que además de una escasa diferencia en los resultados obtenidos con las diferentes cepas, los resultados de ciertas pruebas variaban cuando se conservaban estos microorganismos durante largos períodos, como había descrito Gibbons (1957).

La propuesta de que estos cocos halófilos extremos no se debían incluir en los géneros Micrococcus o Sarcina, se vio fundamentada en su alto requerimiento de sal, la falta de mureína en la pared celular, mucho mayor contenido de guanina más citosina (G+C) en el ADN y por la presencia de bacteriorrubéricas (Kocur y Hodgkiss, 1973).

En la 8ª edición del Manual de Bergey (Gibbons, 1974), los cocos halófilos extremos se incluyeron en el género Halococcus, dentro de la familia Halobacteriaceae, aceptándose la propuesta de Kocur y Hodgkiss (1973).

Ramon y col. (1977) apoyaron la existencia de una sola especie en el género Halococcus al estudiar las características de 28 aislamientos de una salina solar. Colwell y col. (1979) encontraron una considerable variabilidad fenotípica dentro de los cocos halófilos extremos, aunque no encontraron esas diferencias demasiado

significativas a nivel de especie. Javor (1984), encontró algunas diferencias nutricionales en distintos aislamientos pertenecientes al género Halococcus, sugiriendo que estos microorganismos pueden crecer en un amplio rango de sustratos y propuso un estudio en profundidad de dicho género.

Atendiendo a la descripción de Kocur y Hodgkiss (1973) y a la última edición del Manual de Bergey (Larsen, 1989), Halococcus morrhuae se define como cocos Gram negativos, presentándose en parejas, tetradas, sarcinas o agrupamientos irregulares. Se dividen por septación. Requieren al menos 2.5 M de NaCl para crecer, aunque las células son más resistentes que las de Halobacterium a las bajas concentraciones salinas. Las colonias son de color rojo a anaranjado, debido a la presencia de carotenoides. Son inmóviles, estrictamente aerobios, no formadores de esporas, oxidasa y catalasa positivos, quimioorganotrofos. Necesitan aminoácidos para su crecimiento y también los usan como fuente de energía. No utilizan glucosa como sustrato principal para su crecimiento, no produciendo ácidos ni gases a partir de ella. Reducen los nitratos a nitritos sin producción de gas. Producen H₂S de tiosulfato y frecuentemente de cisteína. No son capaces de producir ureasa, mientras que algunas cepas son capaces de hidrolizar gelatina, almidón y ésteres. La temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C. El pH óptimo de crecimiento es 7,2, presentando ligero crecimiento a pH 5,5 y ningún crecimiento a pH 8,0. El tiempo de generación es mayor de 14 horas.

La pared celular consiste en un heteropolisacárido sulfatado, careciendo de ácido diaminopimélico o ácido murámico. Los carotenoides aparecen como bacteriorrubertas. Poseen menaquinonas no ubiquinonas. Las proteínas son ácidas. El contenido de G+C es de 67 mol % para el componente mayoritario y del 59 mol % para el minoritario, con una media del 61-66 mol %.

Presentan principalmente lípidos diéter $C_{20}-C_{20}$ y $C_{20}-C_{25}$ derivados de fosfoglicerol (PG), fosfoglicerolfosfato, (PGP) triglicósildiéter (TGD-2) y diglicósildiéter sulfatado, probablemente S-DGD-1. Contienen carotenoides de 50 átomos de carbono del tipo de la bacteriorruberta, presenta menaquinonas, no ubiquinonas y retinal.

La cepa tipo es Halococcus morrhuae ATCC 17082 (NCMB 787; DSM 1307; CCM 537).

En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio (Montero y col., 1988), se aislaron 96 cocos halófilos extremos no alcalófilos de diferente zonas geográficas de España. Estas cepas, junto con 7 cepas de referencia del género Halococcus se caracterizaron mediante 114 pruebas fenotípicas, analizándose mediante el coeficiente S_{EM} (Sokal y Michener, 1958) y la técnica de agrupamiento UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y obteniendo a un 70 % de semejanza cuatro fenones (Figura 3).

El fenón A incluía 87 cepas, agrupadas a un nivel de semejanza del 71 %, incluía todas las cepas de referencia. Estas cepas eran inmóviles, estrictamente aerobias, capaces de hidrolizar la gelatina y el Tween 80, y reducir los nitratos a nitritos. No producían ácidos de

azúcares y usaban un escaso número de carbohidratos, alcoholes o ácidos carboxílicos como única fuente de carbono y energía.

Las cuatro cepas del fenón B, agrupadas a un nivel se semejanza del 72 %, hidrolizaban gelatina, almidón y Tween 80, pero no caseína. No producían ADNasa, ni eran capaces de producir ácidos de azúcares. Eran capaces de utilizar un mayor número de sustratos que las pertenecientes al fenón A como fuente de carbono y energía, particularmente con respecto a alcoholes.

El fenón C comprendía 7 cepas agrupadas a un nivel se semejanza del 71 %. Hidrolizaban gelatina, reducían nitratos a nitritos y producían H_2S de cisteína. No hidrolizaban almidón ni caseína. Mostraban una mayor versatilidad nutricional que las cepas del fenón A, diferenciándose con respecto a las cepas del fenón B, en que mostraban menor capacidad de utilizar alcoholes, pero una mayor capacidad de metabolizar otros compuestos probados.

El fenón D comprendía cuatro cepas agrupadas a un nivel de semejanza del 93 %. Eran capaces de producir ácidos de glucosa, pero no hidrolizaban almidón ni Tween 80. Reducían los nitatos a nititos y producían H_2S de cisteína, pero no de tiosulfato. Estas cepas mostraban una gran versatilidad metabólica, siendo capaces de usar un gran número de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía, y de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, siendo el único grupo capaz de utilizar cis-aconitato como única fuente de carbono y energía.

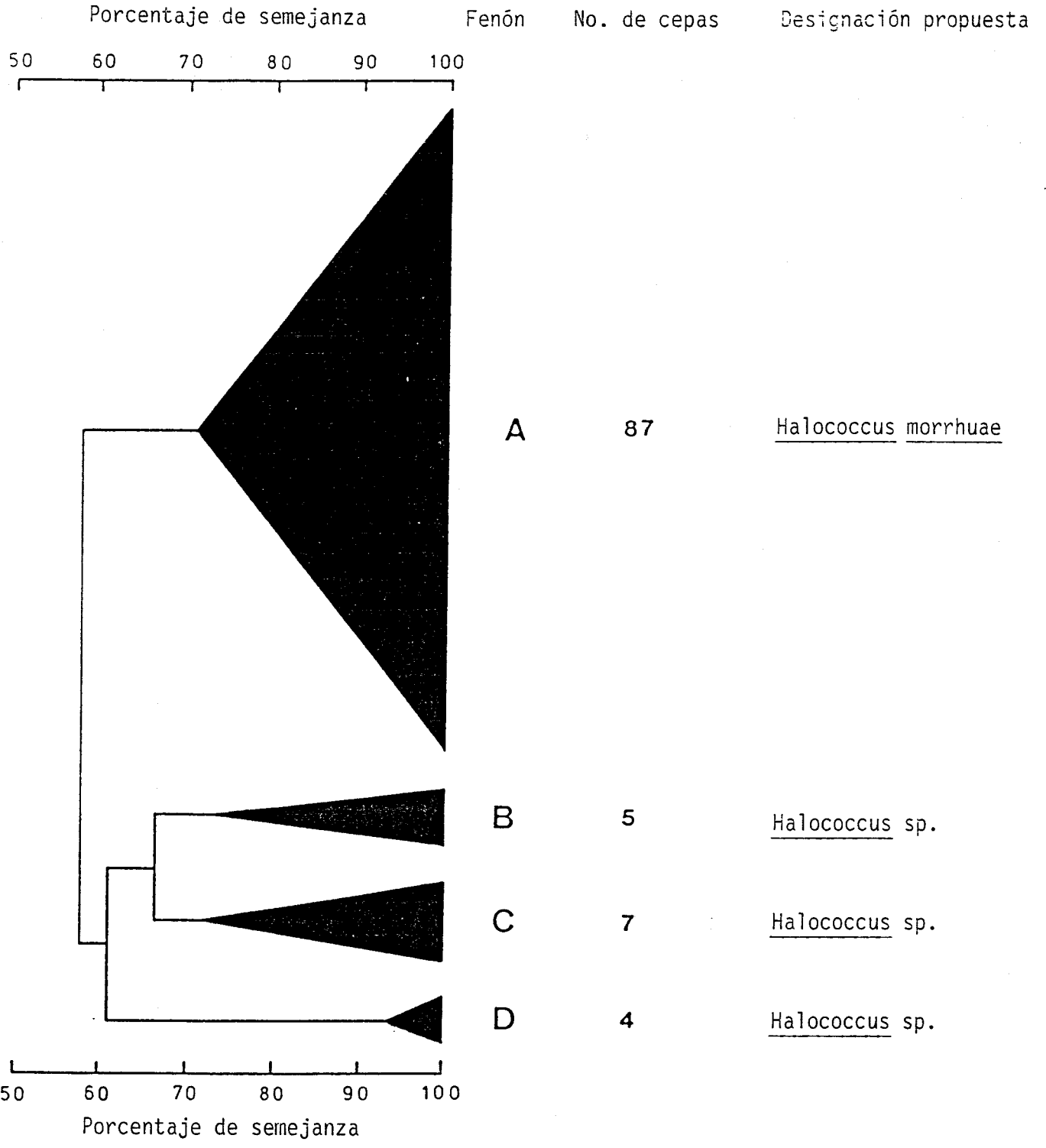


Figura 3. Dendrograma simplificado, obtenido mediante el coeficiente S_{SM} y la técnica de agrupamiento UPGMA, para 103 cocos halófilos extremos, entre los que se incluyen 9 cepas de colección (Montero y col., 1988).

Estos resultados indicaban una mayor diversidad fenotípica dentro de los miembros del género Halococcus y el hecho de que las cepas del fenón D podrían constituir una nueva entidad taxonómica (Montero y col., 1988).

I.3.3. Fisiología de halobacterias.

Las halobacterias son organismos quimioorganotrofos que requieren para su crecimiento altas concentraciones de sodio, además la mayoría presentan complejos requerimientos nutritivos que pueden satisfacerse mediante la adición de extracto de levadura o hidrolizados de proteínas (Grant y Larsen, 1989a). Recientemente, se ha manifestado una mayor diversidad en las halobacterias con el aislamiento de organismos que crecen a alta alcalinidad (Tindall y col., 1984), que metabolizan carbohidratos (Tomlinson y Hochstein, 1976; Rodríguez-Valera y col., 1983) y que crecen en medios simples provistos de sales minerales, una fuente inorgánica de nitrógeno y glucosa como única fuente de carbono y energía (Rodríguez-Valera y col., 1980).

Las halobacterias se consideran aerobias, aunque algunas de ellas como H. vallismortis crecen aneróticamente, probablemente mediante reacciones fermentativas (González y col., 1978). Otras como H. salinarium crecen anaeróticamente en presencia de arginina (Hartman y col., 1980). H. halobium crece aneróticamente en presencia de la luz hasta que la bacteriorrodopsina preformada baja a niveles incapaces de mantener la fotofosforilación (Oesterhelt y Krippahl, 1983). La

presencia de halobacterias denitrificantes fue descrita por Hochstein y Tomlinson (1985).

Todos estos nuevos aislamientos han contribuido a sugerir que las halobacterias son mucho más diversas que como se había supuesto previamente (Javor, 1989).

Los estudio del metabolismo carbonado de las halobacterias indican que estas bacterias son ampliamente similares a las eubacterias aerobias, presentando las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Danson y col., 1985). Se han caracterizado diversas enzimas como una proteasa extracelular (Norberg y Hofsten, 1969), amilasa (Good y Hartmann, 1970) y aminoglucosidasa (Oren, 1983b).

Los requerimientos iónicos de halobacterias han sido objeto de numerosos estudios, y han demostrado que las halobacterias crecen óptimamente en una concentración de NaCl de 3-4 M (Javor, 1989). La mayoría de las halobacterias son inhibidas por altas concentraciones de Mg^{2+} , sin embargo, los aislamientos producidos en el Mar Muerto (*H. volcanii* y *H. sodomense*) tienen altos requerimientos y una alta tolerancia a las concentraciones de Mg^{2+} (0,075-1,5 M y 0,6-1,2 M, respectivamente) (Mullakhanbhai y Larsen, 1975; Cohen y col., 1983; Oren, 1983b). *H. volcanii* presenta una concentración óptima de Mg^{2+} de 100 a 500 mM y las halobacterias haloalcalófilas tienen unos requerimientos muy bajos de Mg^{2+} (0,1-2,0 mM), y son inhibidas por concentraciones relativamente bajas de Mg^{2+} (10 mM) (Tindall y col., 1984).

I.3.4. Ecología de halobacterias.

Las halobacterias generalmente se empiezan a presentar en número significativo en medios talasosalinos cuando éstos alcanzan una concentración salina del 20-30 %. Muy pocas halobacterias se presentan en el límite inferior de ese rango, aunque algunas de estas especies se presentan casi exclusivamente a estas concentraciones relativamente bajas de sales. Estas especies son las que presentan también características más similares a las eubacterias halófilas, tales como un rápido crecimiento y versatilidad metabólica (Rodríguez-Valera y col., 1981; Rodríguez-Valera y col., 1985). Las razones por las que no aparecen las halobacterias en el rango salino inferior al 25 % de sales totales no están aclaradas, ya que estos microorganismos crecen bien a concentraciones salinas más bajas, y el crecimiento óptimo de las halobacterias se presenta a una concentración salina alrededor del 25 %. (Larsen, 1967). El número de halobacterias en las salinas aumenta hasta alcanzar su máximo en los cristalizadores, donde a pesar de las bajas tasas de crecimiento de las halobacterias se presentan como principales colonizadores de dichos hábitats ya que carecen de competidores, allí aparecen principalmente *H. salinarium*, *H. saccharovorum* y *H. gibbonsii* (Rodríguez-Valera y col., 1985; Márquez y col., 1987).

En medios atalasalinos, como el Mar Muerto, también abundan las halobacterias, habiendo sido originalmente aisladas a partir de sus aguas *H. marismortui* y *H. volcanii*. La característica diferenciadora

de este medio es una mayor concentración de magnesio, aunque similar a la encontrada en los cristalizadores más concentrados de las salinas solares (Rodríguez-Valera, 1988).

La distribución natural de Halococcus está mucho menos documentada. Se han encontrado en el Gran Lago Salado (Post, 1977) y en diferentes salinas, en ocasiones en número considerable, aunque en general parecen presentarse en concentración mucho menos abundante que los bacilos (Javor, 1984). Se han identificado también en agua de mar de diferentes lugares geográficos, como el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico en la zona de Massachusetts, aunque en número muy reducido (Rodríguez-Valera y col., 1979; Ventosa y col., 1984). De esta manera Halococcus puede sobrevivir durante largos períodos en agua de mar, detectándose algunos procesos metabólicos a esa baja concentración salinas, tales como el transporte de leucina y respiración, aunque si ser capaces de crecer a esta concentración salina (Rodríguez-Valera y col., 1982b).

I.3.5. Lípidos de halobacterias.

Los lípidos polares de estas bacterias, fosfolípidos y glicolípidos, constituyen alrededor del 90 % del total de lípidos (Sehgal y col., 1962; Kates, 1972, 1978). Estos lípidos polares derivan del glicerol diéter y usualmente presentan grupos fitanil en sus cadenas hidrocarbonadas (Kates y Kushwaha, 1976; De Rosa y col., 1983). Los glucolípidos sulfatados y los fosfolípidos comunican un

carácter fuertemente ácido a la superficie de las bacterias halófilas, encontrándose fosfolípidos tanto en la membrana plasmática como en la purpúrea y estando los componentes sulfatados únicamente presentes en la membrana purpúrea (Kates y Kushwaha, 1978). Debido a la distinta composición lipídica encontrada entre las especies de halobacterias, aunque todas poseen fosfatidilglicerol y fosfatidilglicerolfosfato, esta característica posee gran significado taxonómico en las mismas (Tindall y col., 1984). En la actualidad, uno de los rasgos diferenciales a nivel de géneros de las halobacterias es su composición de lípidos polares, así la tabla 2 muestra los principales lípidos polares de los géneros Halobacterium, Haloarcula y Haloferax (Torreblanca y col., 1986; Ross y Grant, 1985). El análisis de lípidos polares de los géneros Natronobacterium y Natronococcus ha revelado que sólo poseen fosfatidilglicerol y fosfatidilglicerolfosfato (Tindall y col., 1984).

Ross y Grant (1985) describen para Halococcus morrhuae NCMB 761 los siguientes lípidos polares: fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilglicerolfosfato (PGP), sin detectar fosfatidilglicerosulfato (PGS), un diglicosilgliceroldieter sulfatado (S-DGD), y trazas de un triglicosilgliceroldieter (TGD-1). Tindall y col. (1984) habían detectado en Halococcus morrhuae NCMB 787 PG, PGP, TGD-1, y trazas de un glicolípido sulfatado, pero habían descartado la presencia de S-DGD, aunque presentaban dudas sobre la presencia de un diglicosilglicerol diéter. Actualmente se considera que presentan PG, PGP, TGD-2

y un diglicosil diéter sulfatado, probablemente S-DGD-1. (Larsen, 1989).

Los pigmentos rojizos son característicos de halobacterias (Kushwaha y col., 1974) y de ellos, las bacteriorrubéricas se encuentran en la membrana plasmática y el retinal en la membrana purpúrea.

El contenido de lípidos no polares en halobacterias representa del 7 al 20 % de los lípidos totales (Kates, 1978; Kamekura y Kates, 1988) y consisten principalmente en escualeno, dihidro y tetrahydroescualeno, MK-8, difitanilglicerol diéter y varios pigmentos. Estos lípidos no polares son de naturaleza isoprenoide, predominando los difitanil gliceroldiéteres (C₂₀-C₂₀) en las halobacterias, careciendo de dibifatil gliceroltetraéteres (C₄₀-C₄₀), además presentan estructuras C₂₀-C₂₅ y C₂₅-C₂₅, aunque éste último se encuentra sólo en algunas halobacterias alcalófilas (De Rosa y col., 1983; Tindall y col., 1984). Ejemplos de este tipo de lípidos son el retinal (C₂₀) y las bacteriorrubéricas (C₅₀). Las bacteriorrubéricas se encuentran en la membrana roja y parecen tener función protectora frente a la luz solar (Kates y Kushwaha, 1978).

El análisis de distintas cepas de *H. morrhuae* ha revelado la presencia de lípidos diéter C₂₀-C₂₅ en las mismas (Ross y col., 1985). Kushwaha y col. (1974) determinaron la composición de lípidos neutros de dos cocos halófilos extremos: *Sarcina litoralis* NRC 16006, de composición en µg/g de células, retinal (2), fitoeno (11), 8-caroteno (0,4), MK-8 (200), bacteriorrubéricas R₁+R₂ (461), bacteriorrubéricas

R₃+R₄ (78), bacteriorrubéricas R₅ (8) y Sarcina morrhuae NRC 16015, de composición en µg/g de células MK-8 (869), bacteriorrubéricas R₁+R₂ (16) y bacteriorrubéricas R₃+R₄ (4).

1.3.6. Pared celular.

Los estudios de Stoeckenius y Rowen (1967) en Halobacterium halobium y de Steensland y Larsen (1969) en Halobacterium salinarium indicaron que en el exterior de la membrana plasmática se encontraba una pared celular formada por dos capas constituidas fundamentalmente por proteínas. Mescher y Strominger (1976a, 1976b) estudiaron con detalle el componente estructural de la pared celular de Halobacterium salinarium, comprobando que se trataba de una glicoproteína en la que la porción glicídica está unida covalentemente a la parte proteica. Esta glicoproteína era la responsable del mantenimiento de la integridad estructural de la pared celular.

La unidad de carbohidratos se compone de 3 glicopéptidos diferentes unidos de tres tipos: (i) un glicosaminoglucano sulfatado de alto peso molecular compuesto de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido galacturónico, galactosa y 3-O-metil ácido galacturónico (este heterosacárido está conectado a un residuo de asparagina a través de N-acetilgalactosamina, (ii) glucanos sulfatados de bajo peso molecular con glucosa, ácido glucurónico y ácido idurónico, los cuales se unen a través de residuos glucosil-asparagil a la unidad peptídica y (iii) disacáridos compuestos de glucosa y

galactosa, que se conecta a residuos de treonina (Wieland y col., 1980; Paul y col., 1986). Los dos sacáridos sulfatados están unidos a la cadena peptídica por dos tipos únicos de enlaces N-glicosídicos, y el tercer sacárido está unido por enlace O-glicosídico. La reacción de glicosidación tiene lugar en la superficie extracelular y se ha postulado la existencia de un compartimento que podría contener los enzimas involucrados en este proceso (Kessel y col., 1988).

La pared celular de Haloferax mediterranei (Rodríguez-Valera y col., 1983) posee una monocapa compacta gruesa de material electrodensito de alrededor de 25-85 nm de espesor, que confiere una mayor resistencia a la ruptura celular que en el resto de las halobacterias.

Las bacterias pertenecientes al género Halococcus poseen una pared mucho más gruesa y resistente a los medios mecánicos que las halobacterias, no lisándose en presencia de muy bajas concentraciones de NaCl (Steensland y Larsen, 1971). Esta pared celular le permite a estas bacterias realizar algunos procesos metabólicos tales como la captación de leucina y la respiración a una baja concentración salina (Rodríguez-Valera y col., 1982).

La pared celular de Halococcus morrhuae consiste en una única capa homogénea de 50-60 nm de espesor (Kocur y col., 1972). Esta pared no contiene ácido L-talasaminourónico, el componente que indica la presencia de una pseudomureína en metanobacterias, aunque en fracciones de la pared celular libres de proteínas se han detectado glicina, ácido glutámico o glutamina, glucurónico, galactosamina y

también ácidos aminourónicos como el 2-amino-2-deoxigulurónico (Reistad, 1972, 1974). En la pared se presentan también azúcares neutros, como glucosa, galactosa y manosa, y ácidos urónicos, así como acetato, sulfato y material lipídico (Reistad, 1974). Parte de las moléculas de glucosamina están conectadas con glicilamida en lugar de acetilo y, se supone, que la glicina juega un papel conectando las cadenas de glicano a través de uniones peptídicas entre los grupos amino de la glucosamina y los grupos carboxilos de ácido urónico y gulosaminourónico (Steber y Schleifer, 1975).

Un análisis estructural basado en el aislamiento de los oligosacáridos obtenidos mediante hidrólisis parcial ácida reveló que los ácidos urónicos eran glucurónico y galacturónico y permitió proponer una estructura constituida por un heteropolisacárido complejo (Figura 4), en el que se proponen dos dominios al menos, uno de ellos compuesto primariamente de ácidos urónicos, galactosamina, manosa y glucosa, y un segundo con ácidos urónicos, glucosamina, ácido gulosaminourónico y galactosa. Estos dos dominios estarían conectados a través de puentes de glicina (Schleifer y col., 1982).

I.3.7 Membrana purpúrea.

La membrana purpúrea de Halobacterium halobium funciona como una bomba protónica que actúa como un simple sistema de fotofosforilación a partir de la energía lumínica, estando constituida por una cromoproteína denominada bacteriorrodopsina, cuyo grupo cromóforo lo

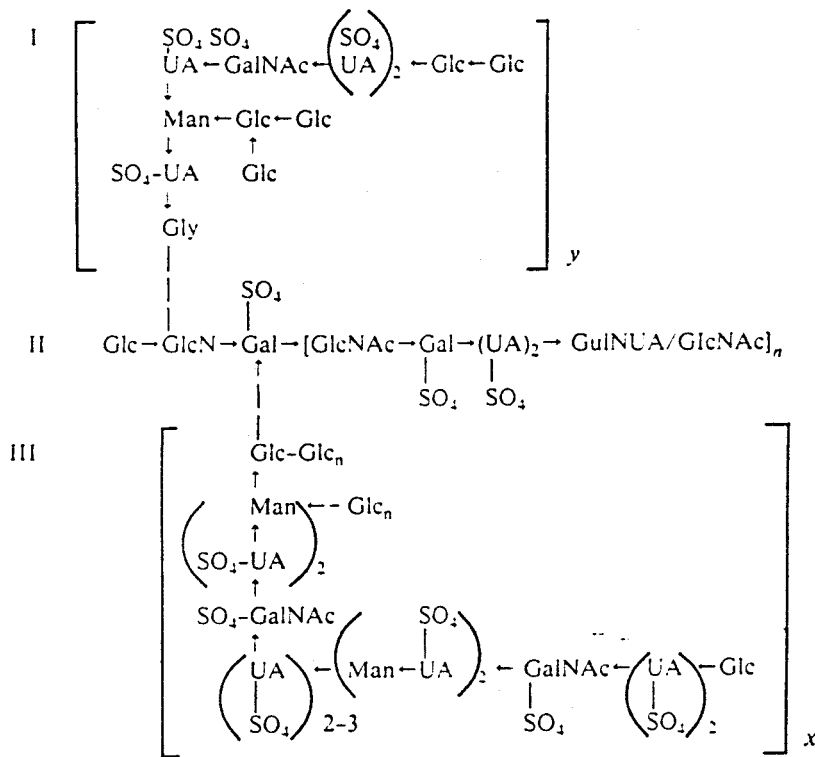


Figura 4. Estructura del heteropolisacárido de la pared celular de *Halococcus morrhuae* (Steber y Schleifer, 1982).

Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilgalactosamina; Gly, glicina; GulNUA, ácido N-acetilgulosaminourónico; Man, manosa; UA, ácido urónico.

constituye el retinal que se encuentra unido mediante una base de Schiff al grupo amino de un residuo de lisina presente en la proteína (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971). Al iluminar las células se observa una extrusión de protones desde la célula al exterior, creándose un gradiente al fluir de nuevo los protones al interior de la célula, que es utilizado por una ATPasa para sintetizar ATP a partir de ADP, viéndose favorecido este proceso en condiciones fisiológicas de baja tensión de oxígeno y en presencia de luz (Oesterhelt y Stoeckenius, 1973).

Además de bacteriorrodopsina, al menos existen otras dos proteínas con retinal en halobacterias, la halorrodopsina, que promueve el transporte activo de cloruros hacia el interior de la célula, con el resultado de la síntesis de ATP, probablemente como resultado de un aumento del potencial de membrana (Lanyi, 1981; Schobert y Lanyi, 1982), y la rodopsina sensorial, la cual está involucrada en la percepción de halobacterias mediada por la luz (Sundberg y col., 1985).

Las halobacterias poseen otros 2 pigmentos fotosensoriales dependientes del retinal de diferente sensibilidad espectral, PS 370 y PS 565, cuyo resultado es una migración neta hacia las intensidades de luz entre el rojo y el naranja y una repulsión de las azules u ultravioletas (Hildebrand y Dencher, 1975; Hasselbacher y col., 1988).

Bivin y Stoeckenius (1986) estudiaron la presencia de pigmentos constituidos por retinal en bacterias haloalcalófilas, observando la presencia de 2 pigmentos, que denominaron Pf y Ps, similares a los

pigmentos provistos de retinal de Halobacterium halobium. Sin embargo, no detectaron la presencia de ningún pigmento similar a la bacteriorrodopsina. Asimismo, no ha sido detectada la presencia de estos pigmentos en miembros del género Halococcus, aunque sí en miembros del género Halocaula (Javor, 1989).

I.3.8. Vacuolas de gas

Algunas cepas de H. halobium, al igual que algunas otras bacterias y cianobacterias, contienen vacuolas de gas que al microscopio óptico aparecen como orgánulos de contorno irregular y alta refracibilidad (Houwink, 1956).

Larsen y col. (1967) consiguieron aislar vacuolas de gas y determinaron que están delimitadas por una membrana de una sola capa de 30 Å de espesor. Stoeckenius y Rowen (1967) demostraron en Halobacterium halobium la presencia de membranas que llamaron membranas intracitoplasmáticas y sugirieron que las mismas serían las membranas colapsadas de las vacuolas originales. Krantz y Ballou (1973) aislaron las vacuolas de gas de Halobacterium halobium y determinaron la composición de sus membranas, indicando que éstas están formadas casi exclusivamente por proteínas altamente hidrofóbicas con 2 % de fosfato y 1 % de galactosa firmemente unidas, encontrándose sólo trozos de lípidos isoprenoides.

Se ha observado que tras cultivar en el laboratorio, las cepas tienen tendencia a perder su capacidad de producir vacuolas de gas, lo

cual ha llevado a la conclusión de que determinadas cepas de *H. halobium* tienen una considerable variabilidad genética debido a la presencia de numerosos elementos de inserción que inactivan genes al integrarse en los mismo (Pfeifer, 1988).

Las vacuolas de gas se han encontrado también en los microorganismos descritos por Walsby (1980), así como en *H. salinarium* y *H. saccharovorum*, así como en "*Haloferax mediterranei*", pero no se han encontrado en especies del género *Haloarcula*, ni en *H. sodomense*, *H. volcanii*, *H. gibbonsii*, bacterias haloalcalófilas ni en *Halococcus morrhuae* (Juez, 1988).

La función de las vacuolas de gas aún es desconocida aunque se sugiere que podrían constituir un almacenamiento de gases, utilizados como flotadores para regular la provisión de oxígeno, o como pantalla de protección para la luz excesiva (Cazzulo, 1975).

1.3.9. Susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos.

Mescher y Strominger (1975) encontraron que las halobacterias eran sensibles a la bacitracina, mientras que no eran sensibles a otra serie de antibióticos que actúan en distintas etapas de la síntesis de mureína: penicilina G, ampicilina, cefalosporina C, D-cicloserina, L-cicloserina, vancomicina, ristocetina, etc., sugiriendo que este hecho puede deberse al mecanismo de acción de la bacitracina, inhibiendo la defosforilación del pirofosfato de bactoprenol, precursor directo de los lípidos diéter de halobacteria. Moldoveanu y

Kates (1989) han llegado también a la conclusión de que la bacitracina aparte de inhibir el crecimiento de Halobacterium cutirrubrum, también inhibe la síntesis de lípidos polares y carotenoides, probablemente actuando a nivel de un precursor en la síntesis de pirofosfato de poliisoprenol. Bonelo y col. (1984), obtuvieron resultados semejantes a los obtenidos por Mescher y Strominger (1975) respecto de los antibióticos que actúan a nivel de pared celular, aunque encontraron que Haloferax gibbonsii y las especies del género Haloarcula no eran sensibles una concentración de bacitracina de 1500 µg/ml, realizadas las determinaciones mediante el método de dilución en tubo.

Hilpert y col. (1981) sugirieron que la frecuente resistencia de las halobacterias a los antibióticos podría deberse a la impermeabilidad de los microorganismos hacia el antibiótico o a la inactivación de éste por el microorganismo.

Las halobacterias presentan una gran variabilidad con respecto a los inhibidores de la síntesis proteica. Entre los macrólidos, la espiramicina no causó inhibición, mientras que la eritromicina mostró una fuerte inhibición. Haloferax mediterranei fue sensible a la mayoría de los macrólidos, especialmente a la josamicina. Entre los aminoglucósidos, la kanamicina se mostró activa contra Haloferax mediterranei y Halobacterium trapanicum. La neomicina se mostró activa contra varias especies de Halobacterium y Halococcus. Todas las especies son más o menos sensibles al cloranfenicol (Bonelo y col., 1984). Una metilación de una base o un cambio de bases puede conferir

una alta resistencia frente a la ticoestreptina en Halobacterium halobium y en Halobacterium cutirubrum (Hummel y Böck, 1988).

Forterre y col. (1984) detectaron que un compuesto, como la afidicolina, que actúa como inhibidor específico de la α -ADN polimerasa eucariótica, inhibe el crecimiento de varias halobacterias, y que en Halobacterium halobium impide la división celular y síntesis de ADN. Estos autores sugirieron que la replicación en arqueobacterias halófilas es del tipo eucariótico.

Las halobacterias son sensibles a la novobiocina y a la rifampicina, excepto especies de Haloarcula (Pecher y Böck, 1981; Bonelo y col., 1984), aunque según Zillig y Stetter (1980), este efecto inhibitorio se debe a una acción detergente más que a un efecto de inhibición de las ARN polimerasas. Sin embargo, recientemente se ha detectado que el tratamiento de Halobacterium GRB con novobiocina da lugar a la acumulación del plásmido pGRB1 en su forma unicitenaria, sugiriendo que ésta se genera durante el proceso de replicación plasmídica ya que la inhibición en exclusiva de la ADN topoisomerasa II no da lugar a la aparición de esta forma plasmídica (Sioud y col., 1988).

Las sensibilidades de Halococcus morrhuae CCM 537 a distintos antibióticos (CMI en $\mu\text{g/ml}$), determinadas mediante el método de dilución en tubo, son las siguientes (Bonelo y col., 1984): bacitracina (94); eritromicina (188); clindamicina (750); rifampicina (188); novobiocina (24); neomicina (1.500); cloranfenicol (750); haloquinona (94). Esta especie fue resistente a una concentración de

1.500 µg/ml de los siguientes antibióticos: ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, D-ciclisserina, troleandomicina, lincomicina, espiramicina, josamicina, estreptomycin, kanamicina, gentamicina y espectinomicina (Bonelo y col., 1984).

Los estudios de tolerancia a metales pesados en bacterias halófilas moderadas y en halobacterias han sido iniciados por García y col. (1987) y Nieto y col. (1987; 1989a; 1989b). En estos estudios han utilizado los siguientes metales pesados: arsenato sódico, acetato de plomo, nitrato de plata, cloruro de cadmio, cloruro de cobalto, sulfato cúprico, cloruro mercurico, sulfato de níquel, sulfato de zinc y cromato potásico. El rango de concentraciones utilizadas fue de 0,005 a 40 mM y a efecto de determinar la posible metalotolerancia a los respectivos metales pesados se utilizaron las siguientes concentraciones: 0,1 mM para el ión Hg, 10 mM para el As, y 1 mM para el resto de los metales.

Dentro de las halobacterias de colección se pueden apreciar 5 grupos según la similitud en sus concentraciones mínimas inhibitorias (MICs), siendo *H. mediterranei* y *H. volcanii* las más metalorresistentes y *H. californiae* y *H. sinaiensis* las más sensibles, siendo éstas últimas las que fueron inhibidas por los valores más pequeños de CMIs de los metales empleados entre todas estas halobacterias. Las halobacterias de colección fueron, globalmente, relativamente tolerantes al plomo y cromo (Nieto y col., 1987). Las cepas de colección correspondientes al género *Halococcus* mostraron comportamientos muy similares, excepto *Halococcus morrhuae* cepa Delft,

que fue la más resistente al plomo y plata y la más sensible al arsenato. Todas las demás fueron muy similares en su respuesta al Cr, Cu, Hg, Ni y Zn. Todas fueron sensibles al Co, Hg, Ag y Zn, siendo tolerante al Cr, Cu y Ni (Nieto y col., 1989b). Las cepas de colección de eubacterias halófilas moderadas fueron muy similares en su respuesta al ión Ag, Hg, Ni, Pb y Zn, excepto Marinococcus albus, que fue la más sensible de todas las cepas. Sin embargo, la respuesta a los iones As, Cd, Cr y Cu fue muy heterogénea (Nieto y col., 1989a).

Las 55 halobacterias aisladas de muestras naturales fueron tolerantes al plomo, la mayoría de ellas incluso a una concentración de 10 mM; un porcentaje superior al 70 % fueron sensibles a cobre y plomo y todas ellas mostraron una elevada sensibilidad al mercurio y plata, así como pocos casos de tolerancia al zinc, cadmio y arsenato. El mercurio fue el agente más tóxico, ya que todas las cepas fueron inhibidas por una concentración 0,01 mM del mismo (Nieto y col., 1987). La respuesta de las 70 cepas correspondientes al género Halococcus obtenidas de aislamientos frescos fue muy homogénea con respecto al cromo, cobre, níquel, mercurio y zinc, puesto que más del 75 % de ellos mostraron las mismas CMIs, y el 68 % de ellas también lo fueron a la plata. En contraste, la respuesta frente al arsenato, cadmio y cobalto fue muy heterogénea (Nieto y col., 1989b). Los 292 aislamientos de eubacterias halófilas moderadas mostraron una elevada tolerancia al níquel y más de la mitad de las mismas al plomo y cromo. Por otro lado, todas fueron sensibles a la plata y mercurio. Las

frecuencias de tolerancia al resto de los metales fue muy heterogénea (Nieto y col., 1989a).

Con objeto de comprobar el efecto de diferentes concentraciones de sales totales y componentes del medio de cultivo sobre la respuesta a los metales pesados de las bacterias halófilas moderadas, se ha estudiado el efecto de diferentes salinidades (7, 10 y 13 %) y de diferentes concentraciones de extracto de levadura en el medio de prueba (0,5, 0,01, 0,1 y 1 %). La toxicidad del cadmio se potenció para todas las cepas cuando la salinidad descendió a un 7 %, al igual que en el caso del cobalto y cobre para algunas cepas. A mayor salinidad (13 %), sólo se observó un descenso en la toxicidad del cadmio en algunas cepas. Por otra parte, se produce un notable aumento en la toxicidad de los metales pesados cuando la concentración de nutriente desciende hasta un 0,01 ó 0,1 %, mientras que se observó una reducción en las toxicidades al aumentar la concentración de nutriente hasta un 1 % (Nieto y col., 1989a).

La haloquinona, un nuevo antibiótico aislado y descrito por Ewersmeyer-Wenk y col. (1981), presenta actividad contra todas las halobacterias, en especial las especies del género Haloarcula (Bonelo y col., 1984).

Rodríguez-Valera y col. (1982a) observaron sustancias producidas por halobacterias que inhiben el crecimiento de otras halobacterias, denominándolas halocinas. Hasta el momento se han estudiado cuatro halocinas producidas por microorganismos halófilos extremos, la halocina Hal R1 producida por Halobacterium sp. GN101 (Rdest y Sturm,

1987), la halocina Hal R2 producida por Halobacterium sp. TuA4 (Rdest y Sturm, 1987) ,la halocina H4 producida por Haloferax mediterranei (Rodríguez-Valera y col., 1982a) y la halocina H6, estudiada recientemente, producida por Haloferax gibbonsii (Torreblanca 1989).

La halocina H4 es una proteína de un peso molecular de unos 28.000 daltons, es termosensible y sal dependiente. Su producción no se ve afectada por la composición del medio ni por la concentración de sales del medio, y su actividad bacteriocinogénica no se ve inducida por exposición de la cepa productora a la luz ultravioleta . Parece que la halocina H4 podría afectar al sistema de mantenimiento de los gradientes iónicos en las membranas, provocando cambios de permeabilidad en las halobacterias (Meseguer y Rodríguez-Valera, 1985; 1986).

La halocina H6 es una proteína con un peso molecular de 30 kilodaltons (kDa). Es termorresistente y no es sal-dependiente. La producción de halocina H6 no se ve afectada por la concentración de sales del medio, por los nutrientes del mismo, por la luz U.V., ni por tratamiento con naranja de acridina, por lo que parece que su producción no es inducida por factores ambientales (Torreblanca, 1989).

Meseguer y col. (1986) detectaron la existencia, mediante un análisis numérico comparativo de 79 cepas de halobacterias, de al menos 15 grupos diferentes de halocinas, indicando que la capacidad productora de bacteriocinas estaba muy extendida entre las halobacterias. Las 79 cepas asimismo se podían dividir en tres grupos

principales, basados en la amplitud de su espectro de actividad. El primero de estos grupos mostraba una gran amplitud de espectro, con efecto antagonista sobre el 75 % o más de las cepas; el segundo de ellos, afectaba a aproximadamente el 50-75 % de las cepas, mientras que el tercer tenía el espectro más reducido, afectando sólo a menos del 50 % de las cepas.

I.3.10 Gránulos intracitoplasmáticos

Kirk y Ginzburg (1972) comprobaron la existencia de poli-β-hidroxi-butarato (PHB) en *H. trapanicum* y *H. marismortui*, indicando que en células de estos microorganismos en ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno no se apreciaba la existencia de estos gránulos. No detectaron PHB en *H. salinarium* ni en *H. cutirubrum*.

Fernández-Castillo y col. (1986) detectaron la existencia de gránulos de PHB en *H. mediterranei*, *H. volcanii* y *H. gibbonsii*. Asimismo, estudiaron diferentes condiciones de producción de PHB en *H. mediterranei*, especie en la cual se produce en mayor cantidad, y observaron que la adición de glucosa y extracto de levadura al medio de cultivo aumentaba la acumulación de PHB, mientras que la adición de aminoácidos provocaba que no se produjese. Las concentraciones totales de sales en el medio de cultivo de un 15 % daban lugar a una mayor acumulación de PHB, llegando hasta un 45 % del peso celular seco, y disminuyendo a medida que se elevaba la concentración salina. Estos resultados les llevaron a proponer la utilidad de Haloferax

mediterranei como candidato a la producción de polímeros biodegradables.

Recientemente, Antón y col. (1988) han caracterizado una sustancia polimérica exocelular producida por Haloferax mediterranei. La mayor cantidad de este producto se obtiene al utilizar azúcares, especialmente glucosa como fuente de carbono y energía. El polímero es un heteropolisacárido que contiene principalmente manosa, habiendo sido detectados también glucosa, galactosa, otros azúcares sin identificar, aminoazúcares, ácidos urónicos y considerables cantidades de sulfato, sin detectar grupos acilo. Las soluciones del polímero muestran un comportamiento pseudoplástico, con una alta viscosidad incluso a bajas concentraciones. Esta alta viscosidad soportó condiciones extremas de pH, temperatura e salinidad. Todas estas características hacen del polímero un producto con posibles utilidades para aumentar la recuperación de petróleo y para otras aplicaciones en que sea necesario un agente resistente espesante.

I.4. GENETICA DE HALOBACTERIAS

I.4.1. Organización genómica.

Joshi y col. (1963) observaron que si se sometía el ADN de Halobacterium salinarium y Halobacterium cutirubrum a centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, se detectaban dos bandas con distinto contenido en guanina más citosina (G+C). Utilizando la misma

técnica, Moore y McCarthy (1969) confirmaron este hecho en cepas pertenecientes a las especies Halobacterium salinarium, Halobacterium halobium, Halobacterium cutirubrum y Halococcus morrhuae, observando que el ADN de estas bacterias puede separarse en dos fracciones de distinto contenido en G+C, denominadas posteriormente FI y FII (Pfeifer, 1988). La fracción FI posee un contenido en G+C de 66-68 mol %. La fracción FII constituye el ADN extracromosómico al que denominaron ADN satélite, en proporción del 11 al 36 % del ADN total y posee un contenido en G+C de 57 a 60 mol %; sin embargo, no quedó patente si este ADN tenía naturaleza plasmídica o no (Moore y McCarthy, 1969).

La fracción FI parece conservada en Halobacterium halobium y especies relacionadas (Ebert y Goebel, 1985), siendo la fracción en la que se encuentran la mayoría de los genes caracterizados hasta la fecha en halobacterias (Betlach y col., 1983), mientras la fracción FII presenta considerables diferencias de unas especies a otras estando constituida por ADN plasmídico y secuencias cromosómicas (Pfeifer y col., 1982).

Pfeifer y Betlach (1985) aislaron un segmento de 160 kb de ADN cromosómico, el cual contiene 70 kilopares de bases (kb) de ADN de la fracción FII; estos autores sugirieron la posibilidad de al menos una o más "islas" de la ADN de la fracción FII en el cromosoma de Halobacterium halobium y el utilizar este fragmento como una herramienta taxonómica.

Sapienza y Doolittle (1982) y Sapienza y col. (1982) indicaron que el genoma de Halobacterium halobium y Haloferax volcanii contiene muchas familias de secuencias repetitivas de número de copias reducido, atribuyendo a estos factores la alta tasa de mutaciones fenotípicas, estando la mayoría de estos reagrupamientos confinados a la región más rica en adenina más timina (A+T) del genoma.

Ebert y col. (1984) encontraron en otras halobacterias una variabilidad genética considerablemente menos pronunciada que en Halobacterium halobium. Estos resultados sugieren que la inestabilidad estructural de la fracción FII del ADN de Halobacterium halobium no es un fenómeno general de las halobacterias, sino más bien una característica de ciertas especies (Pfeifer, 1986).

Ebert y Goebel (1985) demostraron que secuencias homólogas a un plásmido perteneciente a la fracción FII (pHH1) sólo existen en especies de Halobacterium estrechamente relacionadas con Halobacterium halobium. Observaron que el ADN de halobacterias "cuadradas" no presenta elevadas homologías con las fracciones FI ni FII del ADN de Halobacterium halobium.

Bayley (1976) detectó ADN plasmídico en halobacterias, aunque la primera caracterización de plásmidos de halobacterias fue proporcionada por Simon (1978). Weidinger y col. (1979) sugirieron alteraciones espontáneas que podrían estar causadas por inserciones, reasociaciones y deleciones que afectan a distintas partes del plásmido pHH1 de 100 megadaltons (Mdal) de Halobacterium halobium NRC 817 presente en 6-8 copias por genoma.

Pfeifer y col. (1981a) aislaron ADN plasmídico de diferentes halobacterias describiendo plásmidos en Halobacterium trapanicum y Haloferax volcanii (pHT1, pHT2, pHV1 y pHV2) y Weidinger y col. (1982) construyeron mapas de restricción correspondientes a distintos plásmidos de Halobacterium cutirrubrum y Halobacterium halobium (pHH1, pHH2, pHH3 y pHCl). Recientemente se han descrito nuevos miniplásmidos en las cepas Halobacterium halobium GRB y SB3 (Hackett y DasSarma, 1989) y otros nuevos plásmidos en Haloferax volcanii (Rosenshine y Nevarech, 1989). Gutiérrez y col. (1986) estudiaron la presencia de megaplásmidos en un elevado número de halobacterias y detectaron la existencia de los mismos en un número considerable de cepas.

I.4.2. Elementos de inserción.

Pfeifer y col. (1981b) observaron que Halobacterium halobium presenta un alto grado de variabilidad fenotípica espontánea con respecto a tres marcadores fenotípicos (membrana purpúrea, bacteriorrubrina y síntesis de vacuolas de gas), comprobando que con la excepción de mutantes en la síntesis de retinal, las mutaciones fenotípicas espontáneas estaban relacionadas con inserciones o deleciones en el plásmido pHH1.

Simsek y col. (1982) observaron la existencia de un elemento transponible (ISH1) en Halobacterium halobium, que cuando se inserta en un lugar específico del genoma inactiva al producto de dicho gen (Simsek, 1985). Asimismo, Pfeifer y col. (1983) caracterizaron en

Halobacterium halobium cinco elementos de inserción ISH1, ISH2, ISH23, ISH24 y ISH25, con tamaños que oscilan entre 520 a 3000 bases de pares (bp). Dos de estos elementos se encontraron en la mayoría de los mutantes deficientes en bacteriorrodopsina (Pfeifer y col., 1985). Además, la mayoría de las copias de estos elementos de inserción se encuentran en la parte más rica en A+T del genoma (Pfeifer y col., 1984). Otro elemento de inserción, ISH50, se aisló de un plásmido de 50 kb de Halobacterium halobium cepa R1 y es muy semejante a ISH23 (Xu y Doolittle, 1983).

Pfeifer y col. (1984) indicaron que ISH25 carece de las características estructurales de un elemento transponible, al tiempo que ISH24 está envuelto en recombinaciones homólogas que conducen a la translocación de segmentos adyacentes, y estudiaron la restauración de la expresión del gen de la bacteriorrodopsina en un revertiente de Halobacterium halobium, detectando asimismo nuevos elementos de inserción: ISH26, ISH27 y ISH28 (Pfeifer y col., 1985; Betlach y col., 1986).

El elemento de inserción ISH1.8 se aisló del bacteriófago øH (Schnabel y col., 1982a). Posteriormente Schnabel y col. (1984), detectaron la presencia de dos copias más en la fracción FII de Halobacterium halobium WRC 817 .

I.4.3. Bacteriófagos.

En halobacterias se han descrito varios fagos que poseen doble cadena de ADN (Torsvik y Dundas, 1974, 1975, 1980; Wais y col., 1975; Schnabel y col., 1982a, 1982b; Pauling, 1982). Schnabel y col. (1982a) estudiaron la organización del ADN lineal de doble cadena del fago øH de Halobacterium halobium, observando homología parcial con el ADN de Halobacterium halobium, predominantemente con el ADN satélite, rico en A+T. El genoma de este fago es extremadamente variable y se han encontrado un gran número de variantes del fago que difieren en inserciones, deleciones e inversiones (Schnabel y col., 1982b). En el estado de profago, el ADN de øH se encuentra como ADN plasmídico de 57 kb, habiendo perdido unas 2 kb del fago linearizado, por eliminación de uno de sus extremos (Schnabel y Zillig, 1984).

Se han caracterizado también los fagos øN, Hs1, Hh1 y Hh3 en Halobacterium halobium el primero y en Halobacterium salinarium el resto (Pauling, 1982). En el caso de Hs1 se ha detectado un equilibrio entre la producción del fago y el crecimiento bacteriano a concentraciones salinas elevadas, produciéndose el paso de ciclo lítico a una infección persistente; este hecho puede tener importancia ecológica para la supervivencia de bacterias y fagos en sus hábitats naturales (Torsvik y Dundas, 1980).

Se ha podido identificar en un fago uno de los elementos de inserción (ISH23/ISH50) que originalmente fueron aislados de mutantes del gen de la bacteriorrodopsina (Pfeifer, 1988).

I.4.4. Genes caracterizados en halobacterias.

Probablemente, el más estudiado es el gen de la bacteriorodopsina, que se encuentra codificado por una secuencia de 786 bp (gen *bop*) (Betlach y col., 1983). El mapeo de los puntos de integración de varios elementos de inserción de diversos mutantes para dicho gen llevó al descubrimiento de otro gen (*brp*), que se encuentra a 526 bp del gen *bop* y que se transcribe en dirección contraria. El gen *brp* afecta a la expresión del gen *bop* (Betlach y col., 1984). Otra región, localizada entre 2.000- 3.200 bp del gen *bop*, está implicada en la expresión de dicho gen, constituyendo un gen denominado *bat*, gen activador de la bacteriorodopsina (Leong y col., 1988b). Recientemente se ha propuesto que el gen *brp* puede afectar a la expresión del gen *bat* y el gen *bat* podría estar implicado en la activación de la expresión de los genes *bop* y *brp* (Leong y col., 1988a).

DasSarma y col. (1987) clonaron el gen *gvpA*, el cual codifica la mayor proteína estructural de las vacuolas de gas de *Halobacterium halobium* NRC1, basándose en la homología entre las proteínas de cianobacterias y halobacterias para las vacuolas de gas. Ellos encontraron que el gen estaba codificado por un plásmido grande, sugiriendo la inestabilidad plasmídica como un posible mecanismo del alto rango de mutaciones en las vacuolas de gas. Posteriormente DasSarma y col. (1988) obtuvieron tres clases de mutantes. En la primera clase, el número de copias del gen se ve reducido, en la

segunda clase aparecen secuencias de inserción y en la tercera clase no se detectan copias del gen *gvpA*. Estos autores proponen un nuevo elemento de inserción: ISH3 de 1,3 kb, aislado a partir de mutantes del segundo grupo; asimismo, en algunos mutantes de este mismo grupo detectaron la secuencia ISH2.

En la fracción FI del ADN *Halobacterium halobium* NRC817 se ha descrito un segundo gen relacionado con vacuolas de gas; dicho gen posee mayor tamaño que el gen *gvpA*, codificando una proteína de 79 aminoácidos. El gen plasmídico se transcribe constitutivamente a lo largo del ciclo celular, mientras que el cromosómico se expresa durante la fase estacionaria de crecimiento. Otras halobacterias como *Halobacterium* sp. SB3, GN 101 y YC819-9, sólo contenían una copia de dicho gen en la fracción FI; por último, algunas halobacterias como *Haloarcula* sp. cepa RS no contenían copias de dicho gen (Horne y col., 1988).

El gen de la halorrodopsina codifica una proteína elevadamente hidrófoba, lo cual ha implicado una considerable dificultad en su aislamiento (Vogelsang-Wenke y col., 1986). El gen tiene un contenido en G+C de 67 mol % y codifica para 274 aminoácidos. Al comparar la proteína con la bacteriorrodopsina, se ha encontrado una considerable homología, siendo los aminoácidos más conservados la lisina de unión al retinal y cuatro residuos de triptófano que pueden interaccionar con el retinal, dos residuos de aspártico, que proveen posiblemente cargas negativas alrededor del retinal y tres residuos de prolina de función desconocida (Blanck y Oesterhelt, 1987).

Asimismo se ha clonado y secuenciado el gen de la glicoproteína de Halobacterium halobium. Este gen codifica para un péptido señal el cual está ausente en la glicoproteína madura (Lechner y Sumper, 1987).

Se ha secuenciado el gen que codifica la proteína ribosomal S11 de H. marismortui, observando que comparte un 44 % de homología con el gen que codifica la proteína S15 de Escherichia coli, y presenta un mayor contenido en G+C que el correspondiente a este último, especialmente en la tercera posición del codon (Arndt y Kimura, 1988).

Recientemente, se ha determinado la secuencia de una superóxido dismutasa de H. halobium que contiene manganeso, la cual ha mostrado similitud a otras superóxido dismutasas que contienen hierro o manganeso presentes tanto en eucariotas como en procariotas (Salin y col., 1988). Asimismo, se ha secuenciado el gen de la fotoliasa en H. halobium, el cual se muestra cotranscrito parcialmente junto con el de la superóxido dismutasa en esta bacteria. El gen de la fotoliasa secuenciado, muestra una gran homología con los de otras fotoliasas presentes en bacterias y eucariotas, indicando que las fotoliasas de eucariotas, eubacterias y arqueobacterias derivan de un origen común (Takao y col., 1989).

La ARN polimerasa dependiente de ADN halobacteriana está compuesta de, aproximadamente, nueve subunidades y no es sensible ni a la rifampicina ni a la estreptoglidina aunque la enzima es sensible a α -amanitina, un inhibidor de la ARN polimerasa II de eucariotas (Madon y col., 1983; Zillig y col., 1985).

Halobacterium halobium y Halobacterium cutirubrum contienen un solo grupo de genes para el ARNr por genoma y en Haloferax volcanii se encuentran dos, a diferencia de del alto número de copias encontradas en eubacterias y eucariotas (Neumann y col., 1983). Sin embargo, Sanz y col. (1988) han examinado la organización del ARNr en diferentes especies de halobacterias mediante electroforesis en campo pulsado, observando una gran heterogeneidad, a pesar del alto grado de conservación de las secuencias del ARNr. Así, han deducido para H. gibbonsii ATCC 33959 un mínimo número de genes para el ARNr, al igual que en "H. californiae" ATCC 33799, mientras que para H. morrhuae NCMB 757 son dos y para H. salinarium CCM 2148 y H. halobium NCMB 777 son una y tres, respectivamente.

Se ha estudiado también el gen ARNr 16S de Halococcus morrhuae, encontrándose que es tres nucleótidos mayor que el de Halobacterium cutirubrum y Haloferax volcanii, con un 89 % de homología con el de Haloferax volcanii. Las diferencias se encuentran primordialmente en las regiones de estructura secundaria (Leffers y Garrett, 1984; Moritz, 1985).

El ARNr 5S de Halococcus morrhuae es un 84 % homólogo al de Haloferax volcanii, y además, es anormal en tamaño (231 bp), ya que contiene una inserción de 108 bp, aunque la función del ARNr en la biosíntesis proteica es normal y se mantiene la estructura secundaria del ARNr 5S (Luehrsen y col., 1981).

Recientemente se ha secuenciado el gen del ARNr 23S de Halococcus morrhuae (Leffers y col., 1987) y se han comparado los operones del

ARNr de esta especie con los de otras arqueobacterias; se ha observado que presentan mayor semejanza a eubacterias que con algunas arqueobacterias dependientes del azufre (Larsen y col., 1986).

Moritz (1985) ha descrito la existencia de otro ARN estable de función desconocida en algunas halobacterias; este ARN no es parte del ribosoma. Las halobacterias estudiadas se diferenciaban según el fragmento de ADN total digerido con PstI que hibridaba con la sonda de ARN 7S. Al digerir así el ADN total de Halobacterium halobium con PstI un fragmento de 7,3 kb hibridó; sin embargo, en el caso de Halococcus morrhuae se detectó hibridación con un fragmento de 2,5 kb.

Gupta (1985) ha secuenciado 41 ARNt de Haloferax volcanii y han realizado un estudio comparativo con los de eubacterias y eucariotas. Han encontrado que uno de ellos presenta un intrón de 105 bp, indicando que el gen se transcribe y su producto es procesado (Daniels y col., 1985).

I.4.5. Mecanismos de transferencia genética en halobacterias.

Hasta muy recientemente no se habían descrito sistemas de transferencia genética en halobacterias. Sin embargo, muy recientemente se han descrito los mecanismos similares a los existentes en otros procariotas. De esta manera en 1985 Nevarech y Werczberger describieron un sistema de transferencia genética natural entre células intactas de Haloferax volcanii, al investigar la posible transferencia genética entre parejas de mutantes de distinto fenotipo,

comprobando que la frecuencia de transferencia es de 10^{-6} . Estos autores sugieren que dicha transferencia no tiene lugar por transducción, ni es unidireccional como la conjugación clásica que tiene lugar en procariontes.

Cline y Doolittle (1987) describieron la transfección de ADN desnudo del fago ϕ H en Halobacterium halobium convirtiendo previamente estas bacterias en esferoplastos y realizando el proceso de transfección en presencia de polietilenglicol, obteniendo unas frecuencias de transfección del 0,5 al 1 % de los esferoplastos por μ g de ADN.

Charlebois y col. (1987) describieron un mecanismo de transformación mediado por esferoplastos y en presencia de polietilenglicol en una cepa de Haloferax volcanii, a la que se somete a un proceso de curación del plásmido pHV2, y con posterioridad se le introduce el mismo plásmido pHV2 con una pequeña variación en su estructura génica (delección de 93 bp). La frecuencia de transformación obtenida fue de 10^7 transformantes por μ g de ADN. Este mismo procedimiento se ha aplicado para la transformación de Halobacterium halobium y Haloferax volcanii utilizando ADN total y permitiendo convertir mutantes auxotrofos en prototrofos, indicando que estos métodos encontrarán aplicación en la introducción de genes así como en el mapeo genético fino de estas halobacterias (Cline y col. 1989a; 1989b)

I.5. INTERES DE LAS HALOBACTERIAS

Tradicionalmente la sal se ha utilizado para la conservación de alimentos y tratamiento de cueros, produciéndose la contaminación de dichos productos por bacterias halófilas extremas. Actualmente, se ha iniciado el empleo de estos microorganismos bien como modificadores de caracteres organolépticos o para aumentar el valor nutritivo de los salazones (Cazzulo, 1985; Ramos-Cormenzana, 1989).

Recientemente se han sugerido numerosas aplicaciones de las halobacterias; así *Haloferax mediterranei* produce una sustancia polimérica extracelular, con una viscosidad característica, siendo resistente a diferentes valores de pH, temperatura y salinidad, con posibles aplicaciones para la recuperación de petróleo (Antón y col., 1988). Además *H. mediterranei* produce también PHB, el cual posee importantes propiedades como termoplaticidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, pudiendo ser de utilidad por tanto como polímero biodegradable (Fernández-Castillo y col. 1986)

Se han estudiado asimismo enzimas de halobacterias, las cuales poseen actividad a elevadas concentraciones salinas. Así se ha identificado una amilasa extracelular producida por *Halobacterium halobium* (Good y Hartman, 1970), proteasas producidas por *Halobacterium salinarium* (Norberg y Hofsten, 1969; Izotova y col. 1983), así como superóxido dismutasa en *Halobacterium cutirrubrum* (May y Dennis, 1987).

Existe también la posibilidad de utilizar estos microorganismos en la industria farmacéutica, ya que los lípidos de estas bacterias tienen propiedades surfactantes y podrían usarse en la preparación de liposomas (Ramos-Cormenzana, 1989). Asimismo se han detectado en Halobacterium salinarium la presencia de un material parecido a la insulina en cantidades tales como las detectadas en E. coli (Rubinovitz y Shiloach, 1985). Otro producto de interés es el ácido eicosapentanoico, un ácido graso poliinsaturado que parece reducir los niveles de colesterol en la sangre (Klausner, 1986).

Se podrían utilizar como modificadores de la respuesta biológica; así H. saccharovororum estimula la respuesta biológica humoral en ratón, mientras que H. morrhuae la suprime (Ruiz y col., 1988)

El conocimiento de la actividad microbiana en suelos salinos puede permitir el uso de estas bacterias para la recuperación de estos suelos. También presentan un posible uso en la descontaminación en aguas salinas o alcalinas. Se ha explotado el proceso de desnitrificación para eliminar el nitrato usando bacterias halófilas desnitrificantes. Otras posibles aplicaciones pueden ser eliminar metales y otros elementos como fosfatos, para los cuales, los tratamientos convencionales son excesivamente costosos (Ramos-Cormenzana, 1989).

El modelo de la bacteriorrodopsina se ha propuesto como un sistema útil para el desarrollo de un prototipo de "biochips" al poder convertir la luz solar absorbida en energía, y abriendo la posibilidad de nuevas fuentes prácticas de energía (Hong, 1986).

Se ha detectado en Halobacterium halobium una proteína que comparte epitopos similares al producto del oncogen humano v-myc, el cual se encuentra en elevadas concentraciones en ciertos tipos de cancer como los de ovario y riñones. Así, se han desarrollado métodos de detección de anticuerpos contra esta proteína utilizando la proteína de H. halobium como antígeno, abriendo nuevas posibilidades a la detección del cáncer (Ben-Mahrez y col., 1988).

Los solutos compatibles, aunque principalmente producidos por eubacterias halófilas, pueden encontrar aplicaciones como estabilizadores y agentes protectores en los procesos de obtención de enzimas, de esta manera la ectoína detectada originalmente en el género Ectothiorhodospira ha sido utilizada como agente protector de enzimas contra una serie de factores, tales como la desecación, calor, frío e inhibición por la sal, observando que la ectoína es un potente agente protector, sobrepasando el efecto protector de la betaina (otro soluto compatible con posibilidades de utilización) (Galinski, 1989).

Las halobacterias son un material biológico idóneo para el estudio de sistemas de transferencia genética en procariotas ya que se pueden manipular con facilidad en el laboratorio (Charlebois y col., 1987). Esta utilidad desde el punto de vista genético se ve completada por el hecho de que algunas halobacterias como Halobacterium halobium y especies relacionadas producen endonucleasas de restricción, con sitios de corte específicos, habiéndose completado el mapa de restricción del plásmido pBR322 con una de estas enzimas (Schinzel y Burger, 1986).

II. OBJETIVOS

El género Halococcus incluye un grupo de microorganismos que ha sido tradicionalmente poco estudiado. Esto obedece a múltiples causas, entre las que destaca el hecho de que dichos microorganismos se encuentran en mucha menor proporción que el resto de las halobacterias en los ambientes hipersalinos, lo cual hace mucho más difícil el aislamiento de especies pertenecientes al género Halococcus (Rodríguez-Valera y col., 1982; 1985; Márquez y col., 1987). Por otra parte, posee unos tiempos de generación muy elevados, superiores a las 14 h, constituyendo por tanto un material poco atractivo para su estudio (Larsen, 1989).

Actualmente sólo se reconoce una especie dentro del género Halococcus, H. morrhuae (Kocur y Hodgkiss, 1973; Larsen, 1989). Sin embargo, en un reciente estudio realizado en nuestro laboratorio (Montero y col., 1988), aislamos un número considerable de cocos halófilos extremos, basándose en la mayor resistencia de Halococcus que el resto de las halobacterias a bajas concentraciones salinas. Estos cocos fueron caracterizados mediante un amplio estudio que incluyó pruebas morfológicas, bioquímicas y nutricionales, y mediante un análisis numérico se agruparon en cuatro fenones. Las cepas de los fenones A, B y C poseían características semejantes a las descritas para H. morrhuae. Sin embargo, las cepas del fenón D mostraron una considerable variabilidad en relación a los resultados obtenidos con respecto a los restantes fenones, presentando una versatilidad nutricional mucho mayor, siendo capaces de utilizar un gran número de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.

El primer objetivo del presente trabajo ha sido profundizar en el estudio taxonómico anteriormente realizado (Montero y col., 1988) incluyendo nuevas características fisiológicas, bioquímicas y nutricionales, así como estudios de resistencia a metales pesados y antibióticos con objeto de determinar los niveles de susceptibilidad natural de las especies del fenón D a dichos agentes, comparándolas con cepas de colección y con otros halófilos extremos (Nieto y col., 1987). Estos dos últimos aspectos se estudiaron ya que la resistencia microbiana a metales pesados es particularmente interesante con respecto a la fisiología y ecología de los microorganismos (Trevors y col., 1985) y los antibióticos son importantes herramientas para aclarar mecanismos bioquímicos y genéticos en la célula (Russel y Quesel, 1983).

Con objeto de identificar una nueva especie bacteriana son necesarios otro tipo de estudios, en particular el estudio de los lípidos halobacterianos, los cuales constituye un carácter taxonómico que contribuye a la clasificación de las distintas especies (Torreblanca y col., 1986), estudiándose por tanto los lípidos del fenón D, para lo cual se tomó como especie representativa la P-423.

El diseño de un método que facilite la lisis bacteriana se planteó posteriormente con objeto de realizar estudios de tipo genético, tanto de hibridación ADN-ARNr, así como estudiar la presencia de plásmidos. Este último aspecto no sólo se realizó con representantes del fenón D, sino en otras especies de Halococcus, con objeto de detectar posibles homologías entre ellos.

Finalmente se procedió al inicio de un estudio de la organización genómica de esta nueva especie mediante el mapeo de zonas cromosómicas, que permitirán profundizar en su estabilidad genómica, así como en la

variabilidad, con posibles inserciones y deleciones de otras zonas del genoma. Asimismo, se estudió la existencia de secuencias homólogas a otros genes ampliamente estudiados en halobacterias y en otros grupos microbianos, tales como el gen bop, nif, elementos de inserción y el ARN 7S.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. CEPAS UTILIZADAS.

Cepas aisladas.

Las cuatro cepas utilizadas en el presente estudio: P-423, P-513, P-523 y P-413, se aislaron de salinas localizadas en San Fernando (Cádiz) utilizando el medio HM (Ventosa y col., 1982). A este medio se le adicionó una solución de sales a una concentración final del 25 % (Rodríguez-Valera y col., 1980) y 500 U.I. de penicilina G sódica. Estas cepas se caracterizaron taxonómicamente, incluyéndolas en el fenón D (Montero y col., 1988). La cepa P-423 se eligió como cepa representativa del grupo para un estudio más detallado. Halococcus morrhuae CCM 537^T (Cepa tipo) se utilizó también en el presente trabajo con fines comparativos, al igual que un representante de cada uno de los fenones A, B y C del estudio previo (Montero y col., 1988): N-207, Q-26 y P-1140, respectivamente.

Otras cepas de colección utilizadas.

En el presente estudio se han utilizado asimismo las siguiente cepas de colección: Escherichia coli K12 cepa D1210, "Haloarcula californiae" ATCC 33799, Haloarcula hispanica ATCC 33960^T, "Haloarcula sinaiensis" ATCC 33800, Halobacterium halobium NRC 817, Halobacterium halobium R1, Halobacterium sp. SB3, Halobacterium trapanicum CHB 83, Haloferax gibbonsii ATCC 33959^T, Haloferax mediterranei ATCC 33500^T, Haloferax volcanii NCMB 2012^T, Methanobrevibacterium smithii ATCC 35061^T y Thermoproteus tenax DSM 2078^T.

La procedencia de estas cepas fue: NCMB: National Collection of Marine Bacteria; CCM: Czechoslovak Collection of Microorganisms; ATCC: American Type Culture Collection; NRC: National Research Council of Canada; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Las cepas Halobacterium sp. SB3 y Methanolobus tindarius T13 proceden de la colección del Dr. Zillig, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, FRG. La cepa Halobacterium trapanicum CHB-83 procede de la colección del Dr. Ventosa, Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. La cepa Escherichia coli K12 D1210 procede de la Dra. Pfeifer, Max-Planck Institut für Biochemie, FRG.

Condiciones de cultivo.

Para la conservación y el mantenimiento de las cepas de halobacterias se usó el siguiente medio: extracto de levadura (Difco) 1 %; proteosa peptona nº 3 (Difco) 0.5 %; glucosa 0.1 %; agar (Difco) 2 %, adicionado de una solución de sales a una concentración final del 25 % (Rodríguez-Valera y col., 1980). El pH se ajustó a 7.2 añadiendo NaOH 1 N y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

La solución de sales al 25 % utilizada tenía la siguiente composición (Rodríguez-Valera y col., 1980):

NaCl	195,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	50,75 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	32,50 g
KCl	5,00 g
CaCl ₂	0,75 g
NaBr	0,58 g
NaCO ₃ H	0,16 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

La cepa de Escherichia coli se cultivó y mantuvo utilizando el medio descrito por Maniatis (Maniatis y col., 1982). Para Thermoproteus tenax y Methanococcus tindarius se utilizaron los medios de cultivo y mantenimiento descritos por Zillig y König, respectivamente (Zillig y col., 1981; König y col., 1985).

III.2 CARACTERIZACION FENOTIPICA.

III.2.1. Características morfológicas y culturales.

Morfología y tamaño.

La tinción de Gram se realizó por el método convencional, anotándose la forma y el tamaño celular (Dussault, 1955). La morfología y el tamaño bacteriano se determinaron por microscopía en contraste de fase.

Movilidad.

La movilidad de las cepas se observó por el método de la gota pendiente a partir de cultivos recientes, suspendiendo el microorganismo en solución de sales al 10 y al 25 %.

Microscopía electrónica.

Las células se cultivaron en el medio de conservación y mantenimiento en las condiciones descritas previamente y se prepararon muestras de acuerdo con el método descrito por Stoeckenius y Rowen (1967). Las muestras se incluyeron en resinas según Spurr (1969) y se cortaron. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % (5-7 min) y citrato de plomo al 0,002 % (2-5 min) y las muestras se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 10.

Características culturales.

Se observó la morfología colonial de cada cepa en cuanto al tamaño, consistencia, borde, elevación y pigmentación. En medio líquido se observó la presencia o ausencia de halo superficial así como la pigmentación y homogeneidad del cultivo.

III.2.2. Pruebas fisiológicas.

Crecimiento a distintas concentraciones de sal.

El espectro de crecimiento a distintas concentraciones de sal se efectuó en medio líquido. Se utilizó el medio de conservación y mantenimiento a partir de un inóculo líquido en fase logarítmica de crecimiento. Las concentraciones finales de sal a las que se determinó el

crecimiento fueron: 2, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 % (Rodríguez-Valera y col., 1983). Se consideraron positivos aquellos casos en los que al cabo de 15 días el crecimiento era aparente.

Crecimiento a distintas temperaturas.

Se utilizó el medio de conservación y mantenimiento líquido, incubando los microorganismos a las siguientes temperaturas: 4, 28, 37 y 50 °C. El tiempo de incubación fué de un mes.

Crecimiento a distintos valores de pH.

Se empleó el medio de conservación y mantenimiento ajustando el pH final del mismo en el rango siguiente: 5,0, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 y 3,5. El pH se ajustó con HCl 1 N o NaOH 1 N y se volvió a comprobar después de esterilizar a 121 °C durante 20 minutos, obteniéndose los pH finales siguientes: 4,7, 5,7, 6,1, 6,7, 7,2, 7,7 y 8,1. Todos los medios se prepararon en medio líquido, considerándose positivos aquellos casos en que se observó crecimiento aparente al cabo de 15 días.

Mínimo requerimiento de magnesio.

Se utilizó el medio de conservación y mantenimiento, del cual se omitió el $MgSO_4$, y en su lugar se añadió Na_2SO_4 y cantidades variables de $MgCl_2$ (0, 0,02, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ó 6,0 %). La mínima concentración de Mg^{2+} del medio líquido en el cual se detectó crecimiento se consideró el requerimiento mínimo de magnesio.

III.2.3. Pruebas bioquímicas.

Fenilalanina desaminasa.

Medio utilizado:

DL-fenilalanina	2,0 g
Extracto de levadura (Difco)	10,0 g
Agar (Oxoid)	20,0 g
Solución de sales al 25 % c.s.p.	1000 ml

Se ajustó el pH a 7.6 y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Se dejó solidificar el agar en "pico de flauta" e inoculó, incubándolo posteriormente a 37 °C durante 15 días.

Para la lectura se añadieron 4 ó 5 gotas de FeCl₃ en solución acuosa al 10 %. La inmediata aparición de un color verde intenso, indica la presencia de ácido fenilpirúvico y la prueba se considera positiva (Cowan y Steel, 1982).

Producción de ureasa.

Se utilizó el medio agar urea de Christensen (Christensen, 1946), cuya composición es la siguiente:

Medio base:

Peptona bacteriológica	1,0 g
Glucosa	1,0 g
Solución de rojo fenol al 0.2 %	6 ml
Agar (Oxoid)	20 g
Solución de sales al 25 % c.s.p.	900 ml

Solución de urea:

Urea	20,0 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Al medio base se le ajustó el pH a 6,8. Se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos y se dejó enfriar en baño maría hasta una temperatura de 50-55 °C. La solución de urea se esterilizó por filtración y se añadió asepticamente al medio base. Se distribuyó en tubos estériles que se dejaron solidificar en "pico de flauta". Los tubos se inocularon con un cultivo joven y se inocularon a 37 °C durante 15 días. Se examinaron diariamente y se considera como positivo la aparición de un color rojo. Se utilizaron tubos control con el mismo medio pero sin urea, pues pueden darse falsos positivos debido a interferencias con la peptona (Ventosa, 1981).

Hidrólisis de la esculina.

Se utilizó el medio de conservación y mantenimiento al que se le añadió esculina al 0.1 % y citrato férrico al 0.5 %. El pH se ajustó a 7,5 y se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos.

La inoculación se realizó mediante extensión en placa con posterior incubación a 37 °C durante 15 días. La lectura se da positiva cuando aparece un color marrón oscuro o negro alrededor de la zona de crecimiento, debido a que en la hidrólisis de la esculina se forma esculentina, que con el Fe^{3+} presente en el medio, da un complejo fenólico de color negro (Koneman y col., 1983).

Hidrólisis de la tirosina.

Se realizó en el medio de conservación y mantenimiento, adicionado de L-tirosina al 0,5 %. El pH se ajustó a 7,5. Antes de distribuir en placas, el medio se agitó para que se homogeneizara la tirosina (insoluble en agua) y quedara igualmente repartida en todas las placas, apreciándose en las mismas un precipitado blanco de la tirosina.

La inoculación e incubación se realizó en las mismas condiciones que la hidrólisis de esculina. Si el microorganismo hidroliza la tirosina, se manifiesta mediante la desaparición del precipitado blanco.

Crecimiento en anaerobiosis en presencia de nitrato, nitrito o fumarato.

La habilidad para crecer en condiciones anaerobias se determinó inoculando las cepas en el medio base, suplementado con 2 g/l de nitrato potásico, 2 g/l de nitrito potásico ó 0,8 g/l de fumarato sódico (Collies y col., 1978), incubando estos cultivos en ambiente anaerobio (Gas-Pak, BBL) durante 20 días a 37 °C.

Medio base:

Peptona bacteriológica (Oxoid)	5,0 g
Extracto de levadura (Difco)	10,0 g
Solución de sales al 25 % c.s.p.	1000 ml

Reducción de selenito.

Se realizó mediante el método de Lapage y Bascomb (1968), usando el siguiente medio base:

Extracto de levadura (Difco)	10,0 g
Proteosa-peptona nº. 3 (Difco)	5,0 g
NaCl	270,0 g
KCl	5,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	50,8 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	32,5 g
D-manitol	4,0 g
Na ₂ HPO ₄	4,3 g
NaH ₂ PO ₄	2,8 g
NaBr	0,58g
Agua destilada, c.s.p.	1000 ml

A dicho medio se le adicionó selenito sódico a una concentración final de 4 g/l. Las condiciones de inoculación e incubación fueron igual que para la hidrólisis de la tirosina. La prueba se considera positiva en caso de observar crecimiento al cabo de 15 días.

III.2.4. Susceptibilidad a antibióticos y metales pesados.

Sensibilidad frente a antibióticos.

Se utilizó el medio de conservación y mantenimiento en placa y se siguió la técnica de Bauer-Kirby (Bauer y col., 1966), utilizando discos comerciales (Difco) de 6 mm de diámetro con los siguientes antibióticos y concentraciones: bacitracina (10 U), cloranfenicol (30 µg), estreptomina (10 µg), neomicina (30 µg), novobiocina (30 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg) y ácido nalidíxico (30 µg). De anisomicina se emplearon concentraciones de 50, 100 y 1000 µg/ml.

Sensibilidad frente a metales pesados.

Se determinó mediante el método de dilución en agar (Washington y Sutter, 1980), utilizando un multiinoculador Whitley (Don Whitley Sci. Ltd., West Yorkshire, Reino Unido), sembrándose diferentes inóculos provenientes de cultivos en fase exponencial de crecimiento y con 10^4 a 10^8 células por mililitro, sobre placas conteniendo 20 ml de medio de conservación y mantenimiento (sin proteosa-peptona ni glucosa), cada una de ellas con una determinada concentración del metal pesado, añadido al medio a 60 °C antes de verterlo en placas.

Las sales que se utilizaron como fuente de los metales pesados en este estudio fueron las siguientes: $\text{Na}_2\text{AsO}_4\text{H}$, AgNO_3 , CdCl_2 , $\text{Co}(\text{NO})_2$, K_2CrO_4 , CuSO_4 , HgCl_2 , NiSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y SnCl_2 (Sigma), ensayándose para cada uno de los metales las siguientes concentraciones (mM): 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 y 40, respectivamente.

Las soluciones stock se realizaron en agua destilada y se esterilizaron posteriormente por filtración, conservándose a 4 °C durante un período no superior a tres días.

La susceptibilidad de cada cepa se determinó al menos tres veces en diferentes experimentos, utilizándose en todos ellos placas controles conteniendo el mismo medio pero sin metal pesado.

Una vez sembradas las placas, se incubaron a 37 °C durante 24 horas, calculando posteriormente las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), determinándose ésta como la menor concentración del metal que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

A objeto de determinar la posible metalotolerancia de las cepas estudiadas, se observó si existía crecimiento de la cepa sembrada en

placas que contenían 10 mM de As, 0,1 mM de Hg y 1 mM para el resto de los metales, respectivamente (Nieto y col., 1987).

III.3. CARACTERIZACION QUIMIOTAXONOMICA

III.3.1. Determinación del porcentaje de guanina más citosina (G+C) en el ADN.

Extracción y purificación del ADN.

Las cepas de Halococcus se cultivaron en medio de conservación y mantenimiento líquido durante 7 días, añadiendo a continuación glicina a una concentración final de 10 g/l e incubándose posteriormente otros dos días. Las células se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 min en una centrífuga refrigerada Sorvall y se resuspendieron en agua destilada. La lisis se provocó al añadir de 20 g/l de sarcosil (Sigma) en agua, hasta una concentración final de 10 g/l. El ADN se extrajo y purificó siguiendo el método de Marmur (1961).

La concentración del ADN se determinó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis 551S a una longitud de onda de 260 nm, teniendo en cuenta que una densidad óptica (D.O.) de 1.0 equivale a una concentración de ADN de 50 µg/ml (Johnson, 1981).

La pureza del ADN se determinó mediante la relación de absorciones del ADN a 260 y 280 nm, que debe estar comprendida entre 1.8 y 2.1 y la correspondiente a 260 y 230 nm que debe ser al menos 2.2 (Marmur, 1961).

Las soluciones de ADN puro se conservaron con unas gotas de cloroformo a 4 °C.

Determinación de la temperatura media de desnaturalización (T_m).

Se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis 551S a una longitud de onda de 260 nm calentando la muestra desde 50 hasta 110 °C a una velocidad constante de 1 °C por minuto, mediante un programador de temperatura. La variación de la D.O. con la temperatura se recogió en un registrador Perkin-Elmer 561 a una velocidad de 1 cm/min.

Para la determinación de la T_m se siguió el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976). A partir del valor obtenido, se calculó el porcentaje de G+C mediante la fórmula dada por Owen y Hill (1979), para un ADN disuelto en solución salina citratada al 1:10 (0,1 SSC) (NaCl 0,15 M y citrato sódico 0,015 M, pH 7,0)

$$\% \text{ G+C} = 50.9 + 2.08 (T_{mp} - T_{mr})$$

siendo: T_{mp} la temperatura de desnaturalización del ADN desconocido

T_{mr} la temperatura de desnaturalización del ADN de referencia

Como cepa de referencia se utilizó Escherichia coli NCTC 9001, cuyo valor de T_m en 0,1 SSC es de 74,6 °C (Owen y Pitcher, 1985).

III.3.2. Determinación de lípidos polares.

Los lípidos se extrajeron de las células según el método de Bligh y Dyer (1959), modificado por Kates (1986), suspendiendo las células en un 25 % de NaCl hasta tener un contenido de agua en la suspensión del 80 %. Los lípidos se extraen mezclando un volumen de la suspensión con 2 volúmenes de metanol y un volumen de cloroformo. La mezcla se centrifuga o se filtra y se diluye con una parte de cloroformo y otra de agua para dar lugar a dos fases; la fase clorofórmica inferior que contiene los lípidos totales y los pigmentos se recupera y se deseca (Kates, 1986).

Los lípidos se analizaron mediante cromatografía bidimensional en capa fina en placas de sílica gel G (Whatman) empleando en una dimensión el solvente A, cloroformo-metanol-ácido acético-agua (85:22.5:10:4, v/v; revelado dos veces), y en la otra dimensión el solvente B, cloroformo-metanol-90 % ácido acético (65:4:35, v/v). Los cromatogramas se tiñeron con el reactivo de fosfatos para fosfolípidos y la tinción de α -naftol para glicolípidos, y se trataron con ácido sulfúrico al 30 % (Kates, 1986).

Las bacteriorrubéricas se analizaron mediante cromatografía en capa fina en placas de sílica gel G en cloroformo-metanol (93:7, v/v) y se cuantificaron espectrofotométricamente (Kushwaha y Kates, 1979).

III.3.3. Hibridación ADN-ARNr.

III.3.3.1. Aislamiento del ADN.

Cinco a 10 gramos de células congeladas se suspendieron en cinco volúmenes de TEN (NaCl 100,0 mM, Tris-HCl, pH 8,0 20,0 mM, Na_2 -EDTA 1,0 mM). La lisis de las cepas de Halococcus se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente. En los demás casos, las células se lisaron mediante la adición de laurilsulfato sódico (SDS) al 10 %, a una concentración final del 1 % y Triton-X-100 al 10 %, a una concentración final del 0,1 %. Posteriormente se agitaron las soluciones durante dos horas en un agitador magnético. La suspensión se extrajo tres veces con una solución de fenol (fenol 90,0 %, m-cresol 10,0 %, 8-hidroxiquinolina 0,01 %, extraído con Tris-HCl 1 M pH 8,8 hasta pH 7-7,5), utilizando una centrífuga Christ a 4.000 r.p.m. para la separación de las fases. Después

de la primera centrifugación, la capa de separación entre las fases se extrajo con TE (Tris-HCl, pH 7,4 20,0 mM, Na₂-EDTA 1,0 mM) y se unió al sobrenadante de la fase anterior, siguiendo fenolizando y extrayendo 3 veces con cloroformo (cloroformo 96,0 %, alcohol isoamílico 4,0 %). Al sobrenadante final se le añadió 1 g/ml de CsCl. Una vez añadidos 50 µg/ml de bromuro de etidio, las soluciones se centrifugaron a 39.000 r.p.m., 20 °C, durante dos días en un rotor 60Ti (Beckman). La banda de ADN se extrajo y se volvió a centrifugar durante 24 horas a 20 °C, a 65.000 r.p.m. en un rotor VTi65 (Beckman). La banda se extrajo y se trató con isobutanol hasta eliminar el bromuro de etidio y finalmente se sometió a diálisis frente a TE para eliminar el CsCl.

III.3.3.2. Aislamiento de ARNr total.

Cinco a 7 gramos de células congeladas se suspendieron en 5 volúmenes de TENM (Tris-HCl, pH 8,0 0,02 M, Na₂-EDTA 0,02 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,025 M), procediendo a la lisis celular igual que para la obtención de ADN. A continuación, se añadieron 0,2 µg de DNAasaI por ml, incubando 30 minutos a 37 °C, seguido de tratamiento mediante sonicación. Los detritos celulares se separaron mediante centrifugación a 20.000 r.p.m. en un rotor JA 20 (Beckman) a 20 °C.

El sobrenadante anterior se centrifugó sobre una banda de sacarosa al 20 % en TM20A+SH (10 X TA [Tris-Ac, pH 7,5 0,5 M, NH₄Cl 0,22 M, Na₂-EDTA 0,1 M] 50,0 ml, 1 M MgCl₂ 12,5 ml, 2-mercaptoetanol 350,0 µl, agua hasta 500 ml) durante 5 horas a 50.000 r.p.m. y 20 °C en un rotor 60Ti (Beckman), formándose un sedimento donde se encuentran los ribosomas. Este sedimento se resuspendió en 2 ml de TM1A (10 X TA 50,0

ml, 1 M $MgCl_2$ 0,5 ml, 2-mercaptoetanol 350,0 μ l, con agua hasta 500 ml) durante 12 horas, disociándose los ribosomas en sus subunidades 30 S y 50 S. Se centrifugó durante 10 minutos a 20 °C y 20.000 r.p.m. en un rotor JA 20 y se lavó dos veces más con TM1A.

Los gradientes de sacarosa se prepararon a partir de dos tampones, uno diluido (10 X TA 100,0 ml, $MgCl_2$ 10,2 g, KCl 29,8 g, sacarosa 75,0 g, glicerina 50,0 g, 2-mercaptoetanol 700,0 μ l con agua hasta un litro) y otro concentrado (10 X TA 100,0 ml, $MgCl_2$ 10,2 g, KCl 29,8 g, sacarosa 300,0 g, glicerina 100,0 g, 2-mercaptoetanol 700,0 μ l con agua hasta un litro).

Para determinar la cantidad óptima a cargar en los gradientes de sacarosa se utilizan 6 volúmenes distintos: 10, 20, 30, 50, 200 y 500 μ l de la suspensión ribosómica, a los que se sometió a centrifugación en gradiente de sacarosa en un rotor SW 41 (Beckman) (4,5 horas a 20 °C y 41.000 r.p.m.). Después de la ultracentrifugación, se tomaron los líquidos procedentes de los gradientes con una bomba peristáltica desde la parte inferior de los tubos midiendo la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro Uvicord. La carga óptima del gradiente muestra 3 picos: 50 S, 30 S y ADN cromosómico (Figura 5). En un gradiente sobrecargado se encuentra sólo un pico o ninguna separación entre los picos.

Para los gradientes de sacarosa preparativos se tomaron los rotores SW 27 y SW 28 (Beckman) y se cargaron con 3.5 veces el volumen de la suspensión de ribosomas que en el gradiente con SW 41 dio mejor separación entre los picos. La centrifugación de este rotor fue de 9 h a 20 °C y 27.000 r.p.m. Se procedió igual que en el caso anterior, pero

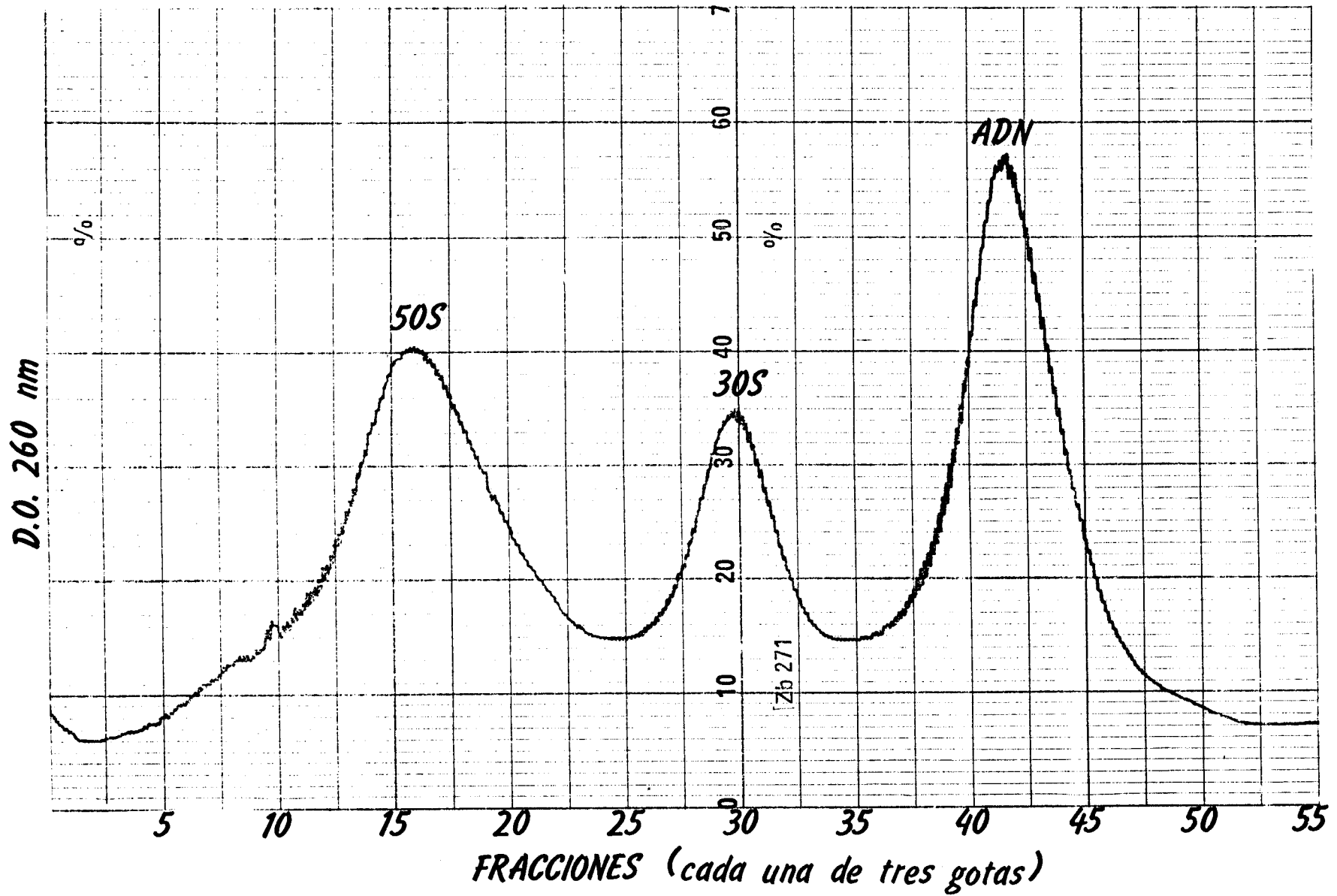


Fig 5. Separación óptima de pico en las distintas fracciones obtenidas una vez realizado el correspondiente gradiente de sacarosa.

recogiendo distintas fracciones del líquido con un colector de fracciones.

Las fracciones de ambos ribosomas se reunieron y trataron 3 veces con fenol y 3 veces con cloroformo, y finalmente, el ARNr se precipitó con 3 volúmenes de etanol y acetato sódico 0,3 M a -20 °C. Los ARNr se centrifugaron en JA20, se lavaron con TE y de nuevo se precipitaron con etanol.

III.3.3.3. Análisis cualitativo y cuantitativo.

La calidad de las preparaciones de ADN y ARNr se midió en geles de agarosa (Maniatis y col., 1982) y espectrofotométricamente entre 200 y 340 nm. Los ácidos nucleicos con un máximo grado de pureza alcanza su máximo de absorción a 260 nm.

A 260 nm, medidos en 1 x SSC, pH 7,0, 20 °C, y cubeta de 1 cm, la absorción de los ácidos nucleicos es proporcional a su concentración de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Maniatis y col., 1982).

Para ADN: D.O. 1 = 50 µg ADN/ml

Para ARN: D.O. 1 = 40 µg ARN/ml

III.3.3.4. Unión de ADN a los filtros de nitrocelulosa.

El ADN de alto peso molecular y de doble cadena fue desnaturalizado y se unió a filtros de nitrocelulosa de 0,1 µm de tamaño de poro. Para obtener filtros de 2,5 cm de diámetro con 300 µg de ADN, a la solución de ADN correspondiente a esta cantidad se añadieron 87,5 µl de NaOH 6 N, alcanzando un pH de 13 a 13,5. Después de 15 minutos de incubación a

temperatura ambiente se añadieron 1,75 ml de Tris-HCl (1 M, pH 7), 87,5 µl de HCl 6 N, así como 1,75 ml de 20 X SSC. Finalmente se llevó con agua hasta un volumen de 35 ml. Antes de fijar el ADN, los filtros se incubaron 30 minutos a 37 °C con 2 X SSC. La unión se realizó con los 35 ml de la solución de ADN por filtro succionando a través del sistema de filtración mediante una trompa de agua. Las densidades ópticas de la solución se midieron antes y después de pasar por el filtro. Los filtros se mantuvieron a 4 °C en vacío secándose y al día siguiente se mantuvieron 4 h a 80 °C. Los filtros se mantuvieron hasta su utilización en desecador a 4 °C.

Para las hibridaciones se prepararon filtros de 5 mm de diámetro perforando manualmente los de 2,5 cm.

III.3.3.5 Marcaje "in vitro" del ARNr

Para el método de marcaje se utilizaron los extremos libres 5'-OH del ARNr, que se marcaron con γ -³²P-ATP, siendo la reacción catalizada por polinucleótidoquinasa (Silberklang y col., 1979).

Tratamiento con fosfatasa.

Setenta µg de ARNr precipitado en etanol se centrifugaron, el sedimento se secó en desecador y se resuspendió en 40 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Se añadieron 10 µl (28 U) de fosfatasa alcalina y se incubó 1 hora a 37 °C en bloque termostático. La fosfatasa se inactivó con un corto calentamiento a 100 °C y se eliminó extrayendo tres veces con fenol y tres con cloroformo. Finalmente se precipitó el ARNr con tres volúmenes de etanol.

Desdoblamiento alcalino de los ARN.

El ARNr con extremos 5'-OH se trató con un tampón borato (ácido bórico 77,5 g, NaOH 24,1 g, con agua hasta 500 ml, pH 9,4).

El ARN precipitado en etanol necesario para la reacción de marcaje (40 μ l), se centrifugó 5 minutos, decantándose el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 0,25 ml de agua bidestilada. Se añadieron 62,5 μ l de tampón borato y se incubó 30 minutos a 70 °C. Finalmente se neutralizó con 47 μ l de HCl 1 N y se precipitó con 0,9 ml de etanol a -70 °C.

Marcaje terminal con polinucleótido quinasa.

El ARNr fragmentado se centrifugó 15 minutos y se llevó al desecador. Se añadieron de 1-2 μ Ci de γ -³²P-ATP (actividad específica 3000 Ci/mM) por μ g de ARNr (aproximadamente 40 μ l de solución de marcaje), se añadieron 4 μ l del tampón de quinasa (Tris-HCl, pH 7,6 0,5 M, MgCl₂ 75,0 mM, 2-mercaptoetanol 90,0 mM, espermidina 1,0 mM) y se preincubó 15 minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron 2 μ l (10 U) de polinucleótido quinasa y se incubó otros 30 minutos a 37 °C. La reacción se terminó con la adición de 3 μ l de tampón de terminación (sacarosa 50,0 %, Na₂-EDTA 1,0 M, azul de bromofenol 2,0 mg/ml, xileno cianol 2,0 mg/ml).

Separación del γ -³²P-ATP no unido.

El producto de la reacción de marcaje se añadió junto con 4 X SSC a una columna Sephadex-G-100. Las fracciones se recogieron manualmente y se contaron directamente en el canal del tritio en un contador de centelleo líquido. Se recogieron aquellas fracciones que empezaron a mostrar

actividad hasta el máximo. Con posterioridad aparecen mononucleótidos no unidos.

Medida del ARNr marcado con ^{32}P .

Después de marcar los fragmentos de ARNr y separar el γ - ^{32}P -ATP no incorporado, se determinó la actividad específica para cada uno de los ARNr marcados. Para ello se tomaron dos muestras de 20 μl de cada una de las soluciones de ARNr y se midieron cuentas Cerenkov (c.p.m.) en un contador de centelleo líquido, midiendo directamente en el canal del tritio. Después se añadió hasta 400 μl de 2 X SSC y se determinó la O.D.₂₆₀. Con las c.p.m. obtenidas y la D.O.₂₆₀ puede determinarse la actividad específica de los ácidos nucleicos para el tiempo cero en c.p.m./ng ARN, al igual que la cantidad de ARN unido a los distintos filtros de ADN. Para otras mediciones, se corrigió la actividad específica de acuerdo con el período de semidesintegración del ^{32}P .

III.3.3.6. Hibridación ADN-ARNr.

La hibridación ADN-ARNr se llevó a cabo siguiendo el método descrito por De Ley y Smedt (1975). La hibridación se realizó durante 16 horas a 50 °C en 2 x SSC con un 20 % de formamida y finalmente se procedió a un tratamiento con RNAasa (De Smedt y De Ley, 1977). En nuestro caso se realizó un paso previo de prehibridación.

Prehibridación.

Los filtros con ADN fijado de 5 mm de diámetro (de 8-12 unidades y una de ellas actuando como control sin ADN) se colocaron en tubos

Eppendorf a 50 °C durante las 12 horas en 1 ml de tampón de prehibridación (20 X SSC 10,0 ml, formamida 20,0 ml, esperma de salmón 10,0 mg, ARNt de levadura 5,0 mg, ATP 10 mM 20,0 ml, SDS 10 % 1,0 ml, con agua destilada hasta 100 ml). Antes de realizar la hibridación propiamente los filtros se lavaron durante 10 minutos a 50 °C con buffer de lavado (6,5 X SSC).

Hibridación.

Al volumen necesario de ARNr marcado, se le añadió un volumen igual de formamida al 40 %, y se completó hasta 1 ml con 2 X SSC, formamida al 20 %. Esta solución de ARNr se sometió a ebullición 5 minutos y se enfrió a continuación para desnaturalizar el ARN y evitar la renaturalización subsiguiente. La solución anterior se añadió a los tubos Eppendorf conteniendo los filtros con el ADN. La hibridación se realizó a 50 °C en baño de agua sometido a agitación durante 48 horas.

Tratamiento con RNAasa.

Con este tratamiento se pretende eliminar el ARN contaminante e identificar las cantidades de ARN unidas específicamente (Yankofsky y Spiegelman, 1962; Gillespie y Gillespie, 1971). Para ello se utilizaron RNAasa A y RNAasa T1.

Al término del tiempo de hibridación se realizaron 3 lavados de 10 minutos a 50 °C con 6,5 X SSC, con ello se consiguió alcanzar un nivel donde no descendían más las cuentas al seguir lavando con 6,5 X SSC. A continuación se realizaron 3 lavados con 1 ml de la solución RNAasa (RNAasa A 15,0 µg/ml, RNAasa T1, 75,0 U /ml, en 2 X SSC; antes de usar poner a ebullición 10 minutos para inactivar la DNAasa) durante 30

minutos a 37 °C, alcanzando con ellos un nivel constante en el contador de centelleo.

Determinación de la cantidad de ADN.

Se realizó mediante una modificación de la reacción de Burton (1986), empleada por Giles y Myers (1965), mediante la cual añadiendo ácido sulfúrico se alcanza mayor sensibilidad que mediante el método standard. El ADN fijado a los filtros se separó de ellos mediante la reacción de determinación (Meijls y Schilperoort, 1971). La solución de ADN se introdujo en 250 µl de ácido perclórico 1,6 N una hora a 70 °C, para hidrolizar el ADN y separarlo de los filtros de nitrocelulosa. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 0,5 ml del reactivo de Burton y se incubó a 30 °C durante 16 h. La determinación del color azul obtenido se realizó contra un blanco tratado igual que las pruebas midiendo a 595 y 700 nm. Se restó la cantidad obtenida a 700 nm de la obtenida a 595 nm. Para la obtención de la curva patrón se utilizó ADN de Sulfolobus sp. (Zillig y col., 1980).

III.3.3.7. Determinación del porcentaje de hibridación ADN-ARNr.

El porcentaje de hibridación depende de la secuencia homóloga del ARNr, del tamaño del genoma y del número de operones de ARNr por genoma de dos microorganismos (Anderson y Young, 1985).

Siendo $l(a)$ el tamaño del genoma del ADN_a ; $n(a)$ el número de operones ARNr por genoma del ADN_a ; $l(b)$ y $n(b)$ los parámetros correspondientes al ADN_b . El porcentaje de hibridación del ADN_a en una solución de ARN_b (% AB), correspondiente al resultado de cualquier

hibridación cruzada y la correspondiente autohibridación, es el siguiente:

$$\begin{aligned} & n(a) \times 1(b) \\ \% AB = H \times & \text{-----} \\ & 1(a) \times n(b) \end{aligned}$$

El correspondiente proceso cruzado se expresa como:

$$\begin{aligned} & n(b) \times 1(a) \\ \% BA = H \times & \text{-----} \\ & 1(b) \times n(a) \end{aligned}$$

H es el factor de proporcionalidad que relaciona el rendimiento de la hibridación con el tamaño del genoma y el número de operones ARNr por genoma. Multiplicando las ecuaciones anteriores:

$$\% AB \times \% BA = H^2$$

H es por tanto, la homología de hibridación entre los operones ARNr de dos ADN's, calculado solamente de los rendimientos de la hibridación de dos posibles hibridaciones cruzadas, pero considerando los diferentes tamaños genómicos y el número de operones ARNr por genoma (Klenk y col., 1986).

III.3.3.8. Cálculo de las distancias filogenéticas.

Para la construcción del árbol filogenético, los porcentajes de hibridación se transforman en distancias filogenéticas. La base de esta transformación es la observación de Bonner y col. (1973) de que por cada 10 % de ausencia de concordancia entre bases, la constante de velocidad de formación del híbrido descenderá a la mitad de su valor original. De

esta observación puede calcularse una fórmula para determinar el valor de la distancia (S):

$$S = 10/\ln 2 \times \ln(100/H)$$

A partir de estos valores se construyó un árbol tal como describen Fitch y Margoliash (1967).

III.4. ESTUDIOS GENETICOS

III.4.1. Plásmidos empleados.

En el presente trabajo se han empleado los siguientes plásmidos: pUM121 (Nilsson y col., 1983), pKG2 (Kuhn y col., 1986), pSC101-meth (Cohen y Chang, 1977), pID1 (Banfalvi y col., 1981), y los plásmidos PCM1, pCM2 y pHM2 (este estudio).

III.4.2. Sondas de hibridación.

El ADN correspondiente a los genes nifHDK utilizado como sonda fue proporcionado por el Dr. Rodríguez-Quifónes. El fragmento de ADN de 5.1 kb que porta el gen bop fue cedido por la Dra. Pfeifer, al igual que los fragmentos de ADN con los elementos de inserción utilizados en el presente estudio (ISH 26, ISH 27, ISH 2 e ISH 1.8) y el gen correspondiente al 7 S ARN de Halobacterium halobium cepa R1.

III.4.3. Enzimas, isótopos y antibióticos.

Las enzimas de restricción AluI, AvaI, BamHI, EglIII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindIII, HpaII, PstI, SstI, SalI, TaqI y XhoI se obtuvieron de Boehringer Mannheim (R.F.A.), y se usaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

La enzima T4 DNA ligasa se obtuvo de Boehringer Mannheim (R.F.A.) y se usó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. α - 32 P-dATP (400 Ci/mMol) se obtuvo de Amersham International (U.K.)

Asimismo, en este estudio se utilizaron los siguientes antibióticos: kanamicina (Km), tetraciclina (Tc) y cloranfenicol (Cpn); dichos antibióticos se disolvieron en agua destilada estéril (kanamicina, tetraciclina) o en etanol (cloranfenicol) y se añadieron a los medios de cultivo a las siguientes concentraciones finales: 25 μ g/ml, para kanamicina y tetraciclina, y 200 μ g/ml para cloranfenicol.

III.4.4. Análisis de plásmidos en Halococcus.

Una vez producida la lisis de células de Halococcus, tal como se ha descrito anteriormente, se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 20 min. Al sobrenadante se le añadieron 2 volúmenes de etanol y NaCl 5 M hasta una concentración final 0,1 M. La mezcla se dejó durante 10 minutos en hielo seco, y se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en tampón tris/EDTA (10:1 mM). El ADN plasmídico se obtuvo mediante centrifugación en gradientes de CsCl-bromuro de etidio, primero en un rotor Beckman 60Ti a 42.000 r.p.m. durante 48 h y a una temperatura

de 15 °C, y una posterior purificación en un rotor Beckman 80Ti a 55.000 r.p.m. durante 12 h a 15 °C.

Los plásmidos se separaron posteriormente para su identificación individual mediante electroforesis a 4 V cm⁻¹ durante 16 horas en geles de agarosa (Tipo II, Sigma) verticales al 1 % en tampón Tris/acetato/EDTA (TEA; Tris-acetato, 40 mM; EDTA Na₂, 1 mM; pH 8,0) (Maniatis y col., 1982).

III.4.5. Electroforesis en gel de agarosa.

El ADN purificado, total o digerido se corrió en geles horizontales o verticales de agarosa en tampones TEA y preparados al 1 % en el mismo tampón, tal y como indican Maniatis y col. (1982).

Los geles se tiñeron durante una hora con bromuro de etidio (0,5 µg/ml en el tampón adecuado), se destiñó durante 30 minutos en agua destilada y se visualizó en transiluminador de luz ultravioleta a 254 nm. Se fotografió, finalmente, en película Kodak Tri-X Pan 400 Asa, utilizando un filtro Kodak Wratten 23 A.

Los pesos moleculares de los fragmentos de ADN se calcularon según la curva log Pm - movilidad obtenida, de acuerdo con las distancias de migración de los fragmentos HindIII del estandar λCI857 (Biolabs Co., USA): 23,7; 9,5; 6,7; 4,3; 2,3; 2,0; 0,6 y 0,1 kb ó bien de acuerdo con las distancias de migración de los fragmentos obtenidos al digerir el fago øH1 (cedido por la Dra. Pfeifer, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, F.R.G.) con ClaI: 10,8; 6,8; 6,1; 5,2; 4,2; 3,8; 3,6; 3,3; 2,4; 2,1; 1,2; 1,0; 0,9; 0,8; 0,5 y 0,4 kb. (Schnabel y col., 1982)

Para el cálculo de los pesos moleculares de los fragmentos de elevado tamaño, se empleó como patrón el fago ϕ H1 digerido con PstI (fragmentos de 25,8 y 33,2 kb) o una mezcla de los fagos ϕ H1 y λ digeridos con PstI y HindIII, respectivamente empleando en este caso geles de agarosa de baja concentración (0,7 %), realizando la electroforesis a baja tensión (2 V cm^{-1}) durante 18 horas.

III.4.6. Recuperación de ADN a partir de los geles.

Los fragmentos de ADN se recuperaron de los geles por medio de la técnica de electroelución, tal y como describen Maniatis y col. (1982). A continuación se realizó la purificación de dichos fragmentos con cloroformo/fenol y se precipitaron con alcohol. En aquellos casos en los que se obtuvo escaso rendimiento con esta técnica se usó el GeneClean Kit (BIO 101 Inc., USA), que básicamente consiste en añadir NaI a una alta concentración para impedir la formación posterior del gel tras calentamiento, empleando, una matriz a la que se va a unir el ADN y de la que será posteriormente eluido (Laboratorios BIO 101, Inc.).

III.4.7. Extracción y purificación de ADN plasmídico de E. coli.

El ADN plasmídico se aisló, tanto a gran escala como en minipreparaciones (a partir de 1 litro ó 1 ml de cultivo) por el método de lisis alcalina descrito en el manual de Maniatis y col. (1982).

En las preparaciones a gran escala, el ADN se purificó por centrifugación en gradiente de CsCl - bromuro de etido, como se ha descrito previamente.

Tras la última centrifugación, el bromuro de etidio se extrae con alcohol isoamílico (en caso de producirse precipitación se añadió TE saturado de CsCl), y el CsCl se eliminó por diálisis prolongada (al menos 12 h) frente a TE.

Cuando se necesitó, el ADN se concentró por precipitación con etanol.

III.4.8. Transformación.

A partir de *E. coli* K12 D1210 se prepararon células competentes y se transformaron mediante la técnica descrita por Cohen y cols. (1972). A partir de 40 ml de un cultivo con una D.O.₆₀₀ de 0,6, las células se centrifugaron y resuspendieron en el mismo volumen de MgSO₄ 10 mM - Tris HCl 5 mM, pH 7,4, previamente enfriado en hielo. Tras 30 minutos en hielo, las células se centrifugaron nuevamente, se resuspendieron en 40 ml de CaCl₂ 50 mM - Tris HCl 5 mM, pH 7,4 a 0 °C y se mantuvieron durante 20 minutos más en hielo. Finalmente, las células competentes se recuperaron por centrifugación suave (4000 r.p.m.) y se suspendieron en 200 µl de CaCl₂ 50 mM - Tris HCl 5 mM, pH 7,4 preenfriado en hielo. Las células competentes se conservaron a 4 °C hasta su uso, siempre en el mismo día de su preparación.

Con los 200 µl de células así tratadas, procedentes de 40 ml de cultivo, se observó una eficiencia máxima de transformación para 0,4-0,6 µg de ADN, cayendo bruscamente dicha eficiencia cuando se añade más de 1 µg de ADN. Así pues, a los 200 µl de células competentes se añadió el ADN, hasta un máximo de 1 µg, diluido en 100 µl de Tris HCl 5 mM, pH 7,4 .

La mezcla de ADN con las células se mantuvo en hielo durante 1 hora y después se expuso a un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos. A continuación, se añadieron después 5 ml de LB estéril y se incubó 30-60 minutos a 37 °C para permitir la expresión de los marcadores.

Finalmente, las células se concentraron en 0,5 ml de LB y se sembraron en placa en los medios selectivos para los transformantes.

III.4.9. Marcaje de ADN.

En el caso de marcaje radioactivo, se empleó la técnica de Feinberg y Vogelstein (1983), basada en el uso de hexanucleótidos de secuencia variable para primar la síntesis de ADN en el templete de ADN desnaturalizado en numerosos sitios, y utilizando el fragmento "Klenow" de la enzima ADN polimerasa I, que al carecer de actividad 5'-3' exonucleasa asegura que los nucleótidos marcados incorporados no son eliminados posteriormente. Para la realización se empleó el sistema de Amersham RPN. 1600Y/Z, siguiendo las indicaciones del proveedor y dejando la reacción durante 8 horas a temperatura ambiente, tras las cuales el ADN marcado es recuperado por cromatografía en columna Sephadex G-50 (Pharmacia) (Maniatis y cols. 1982).

Para realizar marcajes no radioactivos se empleó el sistema de Boehringer Mannheim (Kit de detección y marcaje de ADN no radioactivo, Boehringer Mannheim, R.F.A., No. 1093657), el cual está basado también en la técnica de Feinberg y Vogelstein (1983), pero que tiene la característica de emplear digoxigenina unida a dUTP; este nucleótido se incorpora en el proceso de síntesis de ADN marcado, de igual manera a un nucleótido marcado, y posteriormente la técnica se basa en un enzima-

inmunoensayo, con anticuerpos antidigoxigenina unidos a fosfatasa alcalina y finalmente una reacción enzimática que se detecta por la aparición de color poniendo en el medio 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato y azul de tetrazolio. Para la realización de todo el proceso de marcaje y revelado con esta técnica se siguieron las indicaciones del proveedor.

III.4.10. Hibridaciones de ADN

La hibridación de ADN se realizó siguiendo el método descrito por Betlach y col. (1983).

Preparación de los filtros.

Los geles de agarosa se desnaturalizaron con NaOH y se neutralizaron con Tris HCl pH 7,5, tal como describen Maniatis y cols. (1982). El ADN de los geles se transfirió a filtros de nitrocelulosa (Scheleicher & Schüll) o nylon (Hybon-N, Amersham) por capilaridad, de acuerdo con la técnica de Southern (1975), utilizando 20 x SSC como solución de transferencia. Tras la transferencia los filtros se secaron y fijaron a vacío durante 2 horas a 80 °C.

Prehibridación.

Los filtros se prehibridaron durante 2 horas a 41 °C en bolsas herméticamente selladas y conteniendo 0,75 M NaCl/0.075 M citrato sódico, pH 7; 0,1 % polivinilpirrolidona; 0,1 % Ficoll 400 (Pharmacia); 1 % albúmina sérica bovina (Boehringer Mannheim); 0,2 M de tampón fosfato sódico, pH 6,5; 50 % formamida conteniendo 100 µg de ARNt de *E. coli* (Sigma) por ml.

En caso de utilizar el sistema de marcaje no radioactivo la prehibridación se realizó durante 4 horas a 68 °C utilizando los productos indicados en el sistema.

Hibridación.

Se llevó a cabo durante 18 horas en idénticas condiciones, pero adicionando a la solución anterior la sonda radioactiva (10^8 - 10^9 c.p.m./ μ g de ADN) desnaturalizada por calor (10-15 minutos a 100 °C).

Para el sistema no radioactivo, la hibridación se realizó durante 24 horas a 68 °C

Lavado de los filtros.

Los filtros se lavaron cuatro veces en periodos de 15 min con 0,3 M NaCl/0,03 M citrato sódico pH 7; 0,5 % SDS a temperatura ambiente y dos veces con 15 mM NaCl/1,5 mM citrato sódico, pH 7; 0,5 % SDS a 58 °C en periodos de 15 minutos. Para los productos del sistema de marcaje no radioactivo se efectuó el mismo tratamiento.

Exposición de los filtros.

Una vez secos, los filtros se expusieron a -70 °C durante 1-3 días sobre película Kodak X-Omat AR5 con pantalla amplificadora Illford (Laskey y Mills, 1977).

Hibridación in situ.

Las colonias de *E. coli* se cultivaron en placas con medio LB conteniendo el marcador apropiado (en nuestro caso, tetraciclina o kanamicina) durante 18 horas.

Sobre dichas placas se colocaron filtros de nylon de idéntico diámetro que las placas y en los que las bacterias quedaban adheridas. Dichas bacterias se lisaron y su ADN se desnaturizó y fijó tal como describen Grunstein y Wallis (1979).

IV. RESULTADOS

IV.1. RESULTADOS PRUEBAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES Y MORFOLOGÍA

En las tablas 3, 4 y 5 se indican los resultados obtenidos en el crecimiento a distintas concentraciones de sal, distintos valores de pH y diferentes temperaturas, respectivamente, para las 8 cepas del género Halococcus estudiadas.

Las figuras 6 y 7 indican la morfología de Halococcus sp. P-423, tanto al microscopio de contraste de fases como al microscopio electrónico.

Tabla 3. Crecimiento de las 8 cepas de Halococcus estudiadas a distintas concentraciones de sal.

Microorganismo	Concentración de sal (%):						
	2	5	10	15	20	25	30
<u>H. morrhuae</u> CCM 537 ^T	- ²	-	-	+	+	+	+
<u>Halococcus</u> sp. N-207 (A) ¹	-	-	-	-	-	+	+
<u>Halococcus</u> sp. P-1140 (C)	-	-	-	+	+	+	+
<u>Halococcus</u> sp. Q-26 (B)	-	-	-	+	+	+	+
<u>Halococcus</u> sp. P-423 (D)	-	-	-	+	+	+	+
<u>Halococcus</u> sp. P-513 (D)	-	-	-	+	+	+	+
<u>Halococcus</u> sp. P-523 (D)	-	-	-	+	+	+	+
<u>Halococcus</u> sp. P-413 (D)	-	-	-	+	+	+	+

¹ Entre paréntesis se indica el fenón en el que se incluyeron en el estudio previo (Montero y col., 1988).

² + = Prueba positiva, crecimiento antes de 20 días de incubación.

- = Prueba negativa, no crecimiento antes de 20 días de incubación.

Tabla 4. Crecimiento de las 8 cepas de Halococcus estudiadas a distintos valores de pH.

Microorganismo	pH:						
	4,7	5,7	6,1	6,7	7,2	7,7	8,1
<u>H. morrhuae</u> CCM 537 ^r	- ²	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. N-207 (A) ¹	-	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-1140 (C)	-	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. Q-26 (B)	-	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-423 (D)	-	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-513 (D)	-	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-523 (D)	-	-	+	+	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-413 (D)	-	-	+	+	+	+	-

¹ Entre paréntesis se indica el fenón en el que se incluyeron en el estudio previo (Montero y col., 1988).

² + = Prueba positiva, crecimiento antes de 20 días de incubación.

- = Prueba negativa, no crecimiento antes de 20 días de incubación.

Tabla 5. Crecimiento de las 8 cepas de Halococcus estudiadas a diferentes temperaturas

Microorganismo	Temperatura (°C):			
	4	28	37	50
<u>H. morrhuae</u> CCM 537 ^T	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. N-207 (A) ¹	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-1140 (C)	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. Q-26 (B)	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-423 (D)	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-513 (D)	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-523 (D)	-	+	+	-
<u>Halococcus</u> sp. P-413 (D)	-	+	+	-

¹ Entre paréntesis se indica el fenón en el que se incluyeron en el estudio previo (Montero y col., 1988).

² + = Prueba positiva, crecimiento antes de 20 días de incubación.

- = Prueba negativa, no crecimiento antes de 20 días de incubación.

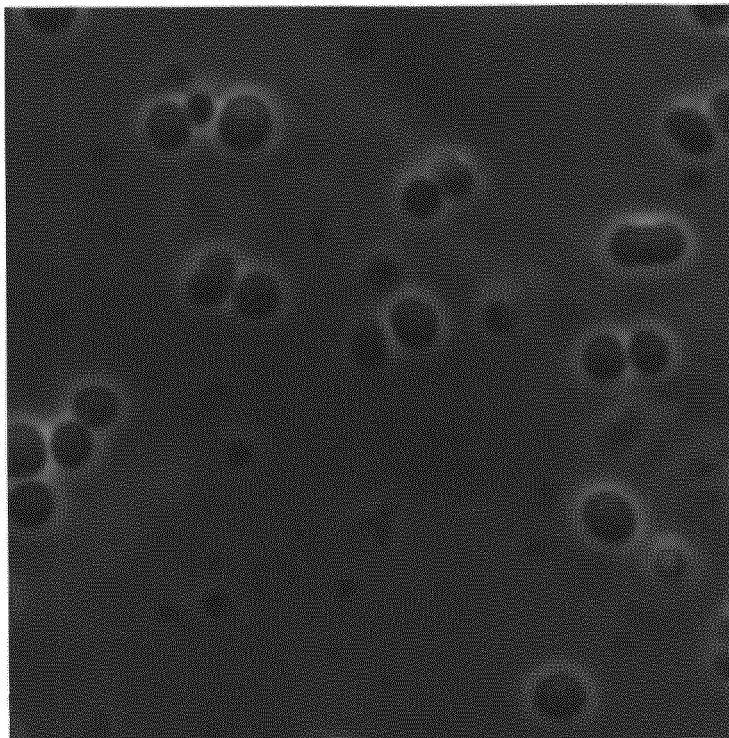


Figura 6. Micrografía de Halococcus sp. P-423 al microscopio de contraste de fases.

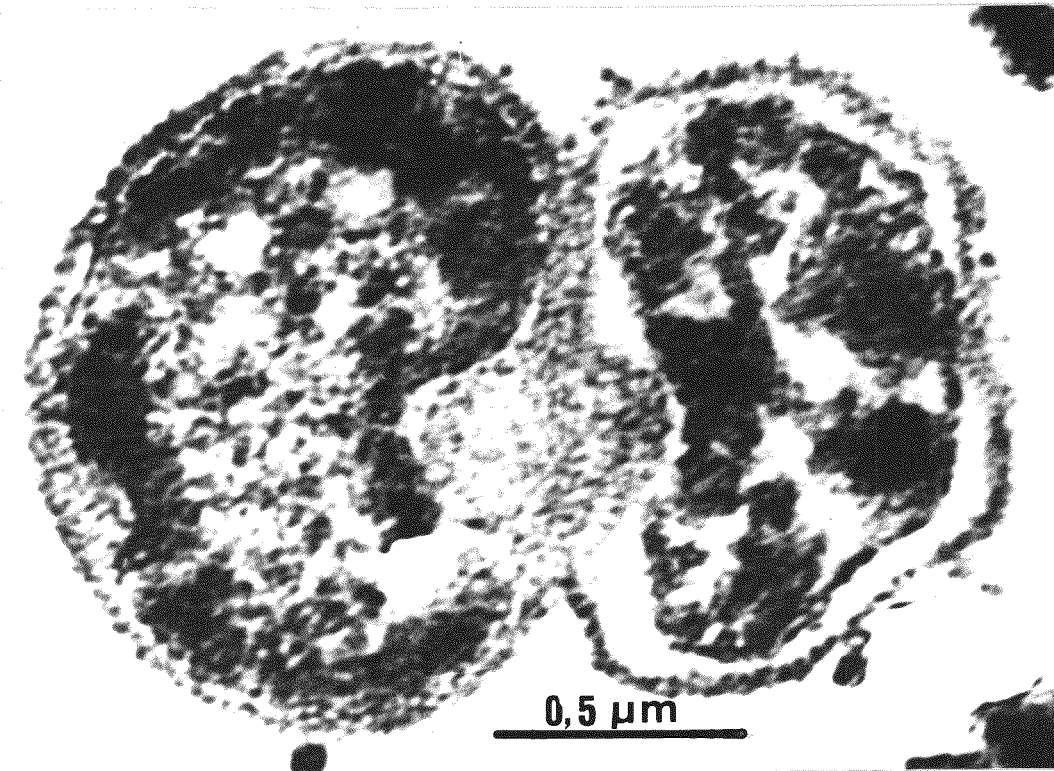


Figura 7. Corte ultrafino de Halococcus sp. P-423.

La tabla 6 expresa los resultados de la movilidad, requerimiento de Mg^{2+} y pruebas bioquímicas de las 8 cepas del género Halococcus estudiadas, de acuerdo a la siguiente clave:

Mov: Movilidad

Mg^{2+} : Requerimiento de un 4 % de Mg^{2+}

Ure: Producción de ureasa

Phe: Fenilalanina desaminasa

NO_3 : Respiración nitrato

NO_2 : Respiración nitrito

Fum: Respiración fumarato

Sel: Reducción de selenito

Tir: Hidrólisis de tirosina

Esc: Hidrólisis de esculina

Tabla 6. Pruebas fenotípicas para las ocho cepas de Halococcus estudiadas.

Microorganismo	Prueba:									
	Mov	Mg ²⁺	Ure	Phe	NO ₃	NO ₂	Fum	Sel	Tir	Esc
<u>H. morrhuae</u> CCM 537 ^r	- ²	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. N-207 (A) ¹	-	ND	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. P-1140 (C)	-	ND	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. Q-26 (B)	-	ND	-	-	-	-	+	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. P-423 (D)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. P-513 (D)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. P-523 (D)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<u>Halococcus</u> sp. P-413 (D)	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

¹ Entre paréntesis se indica el fenón en el que se incluyeron en el estudio previo (Montero y col., 1988).

² + = Prueba positiva, crecimiento antes de 20 días de incubación.

- = Prueba negativa, no crecimiento antes de 20 días de incubación.

ND= No determinado.

IV.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A DIVERSOS
ANTIBIOTICOS Y METALES PESADOS.

La tabla 7 expresa la susceptibilidad de las 8 cepas del género Halococcus estudiadas frente a los siguiente antibióticos, según la clave:

- B: Bacitracina (10 U)
- CR: Cloranfenicol (30 µg)
- S: Estreptomina (10 µg)
- NB: Novobiocina (30 µg)
- N: Neomicina (30 µg)
- P: Penicilina G (10 U)
- RA: Rifampicina (5 µg)
- NA: Acido nalidíxico (30 µg)
- A1: Anisomicina (50 µg/ml)
- A2: Anisomicina (100 µg/ml)
- A3: Anisomicina (1000 µg/ml)

La tabla 8 expresa la concentración mínima inhibitoria de lo 10 iones metálicos ensayados frente a las 8 cepas de Halococcus estudiadas.

Tabla 7. Susceptibilidad de las 8 cepas de Halococcus frente a distintos antibióticos.

Microorganismo											
	B	CR	S	NB	N	P	RA	NA	A1	A2	A3
<u>H. morrhuae</u> CCM 537 ^T	S ²	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<u>Halococcus</u> sp. N-207 (A) ¹	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<u>Halococcus</u> sp. P-1140 (C)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<u>Halococcus</u> sp. Q-26 (B)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
<u>Halococcus</u> sp. P-423 (D)	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
<u>Halococcus</u> sp. P-513 (D)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<u>Halococcus</u> sp. P-523 (D)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<u>Halococcus</u> sp. P-413 (D)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

¹ Entre paréntesis se indica el fenón en el que se incluyeron en el estudio previo (Montero y col., 1988).

² S = Sensible; R = Resistente.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 10 iones metálicos ensayados frente a las 8 cepas de Halococcus estudiadas.

Microorganismo	CMI (mM):									
	Ag	As	Co	Cr	Cd	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
<u>H. morrhuae</u> CCM 537 [†]	0,1	10	1	<u>2,5</u>	1	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,5
<u>Halococcus</u> sp. N-207 (A) [‡]	0,1	10	1	<u>2,5</u>	1	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,5
<u>Halococcus</u> sp. P-1140 (C)	0,1	10	1	<u>2,5</u>	1	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,5
<u>Halococcus</u> sp. Q-26 (B)	0,05	10	1	<u>2,5</u>	1	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	<u>5</u>	0,5
<u>Halococcus</u> sp. P-423 (D)	0,1	10	1	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	1	0,5
<u>Halococcus</u> sp. P-513 (D)	0,1	10	1	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	1	0,5
<u>Halococcus</u> sp. P-523 (D)	0,1	10	1	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	1	0,5
<u>Halococcus</u> sp. P-413 (D)	0,1	10	1	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	<u>2,5</u>	0,05	<u>2,5</u>	1	0,5

[†] Entre paréntesis se indica el fenón en el que se incluyeron en el estudio previo (Montero y col., 1988).

[‡] Aquellas concentraciones que se corresponden con tolerancia al metal aparecen subrayadas.

IV.3. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACION QUIMIOTAXONOMICA

La tabla 9 indica las movilidades en cromatografía en capa fina y propiedades de tinción de los lípidos de la cepa P-423.

El porcentaje de guanina más citosina de la cepa P-423 correspondiente a una temperatura de desnaturalización de 78,8 °C fue del 59,5 %.

Las tablas 10 a 19 indican los porcentajes de hibridación entre cada uno de los ARNr de las 11 cepas estudiadas y los diferentes ADN de esas mismas cepas. En el caso de Methanobolus tindarius T13, sólo se realizaron hibridaciones cruzadas con Halobacterium halobium Nrc 817 y Thermoproteus tenax DSM 2078^T.

La clave empleada es la siguiente:

cpm/cor = cuentas Cerenkov de cada uno de los filtros de ADN corregidas respecto al filtro patrón (sin ADN).

D.O.595 = densidad óptica a 595 nm obtenida para cada uno de los filtros, una vez realizada la reacción de Burton modificada (Burton, 1968).

D.O.700 = densidad óptica a 700 nm obtenida para cada uno de los filtros, una vez realizada la reacción de Burton modificada (Burton, 1968).

$\mu\text{g ADN} = \mu\text{g de ADN correspondientes a cada uno de los filtros, tomando como referencia para su determinación ADN de Sulfolobus sp. (Zillig y col., 1980). En este caso se indica:$

Val. obt. = Valor obtenido para cada uno de los filtros de ADN.

V. cons. = Valor medio de los diferentes filtros de ADN correspondiente a cada una de las cepas.

%H.Ho = Porcentaje de hibridación entre cada uno de los ARNr estudiados y el ADN de las diferentes cepas.

H. hispanica = Haloarcula hispanica ATCC 33960^r.

H. halobium = Halobacterium halobium NRC 817

H. volcanii = Haloferax volcaninii NCMB 2012^r

H. gibbonsii = Haloferax gibbonsii ATCC 33959^r

H. sinaiensis = "Haloarcula sinaiensis" ATCC 33800

H. californiae = "Haloarcula californiae" ATCC 33799

T. tenax = Thermoproteus tenax DSM 2078^r

Halococcus sp. = Halococcus sp. P-423

H. mediterranei = Haloferax mediterranei ATCC 33500^r

H. morrhuae = Halococcus morrhuae CCM 537^r.

Tabla 9. Movilidades en cromatografía en capa fina y propiedades de tinción de los lípidos de la cepa P-423

Mancha No.	Rf ¹		Tinción-P ²	Tinción-azúcar ²	Identificación tentativa ³
	A	B			
0	0,05	0,03	-	+	Glicolípido no identificado (trazas)
1	0,11	0,08	+	+	Fosfoglicolípido no identificado (X ₁)
1'	0,20	0,12	-	+	Glicolípido no identificado (trazas)
2	0,33	0,35	-	+	S-DGD
3	0,35	0,66	+++	-	PGP (C ₂₀ -C ₂₀)
4	0,38	0,66	++	-	PGP (C ₂₀ -C ₂₅)
5	0,47	0,73	+	-	Fosfoglicolípido no identificado (X ₂)
6	0,74	0,84	+	-	PG (C ₂₀ -C ₂₀)
7	0,77	0,84	+	-	PG (C ₂₀ -C ₂₅)
8	0,92	0,96	+	-	PA
9	0,98	0,98	-	-	Lípidos neutros y pigmentos

¹ En sistema solvente: A, cloroformo-metanol-acido acético-agua (85:22.5:10:4, v/v) en placas de silica gel G (doble revelado) y B, cloroformo-metanol-90 % acido acético (65:4:35, v/v).

² Ver Kates (1986)

³ PA, ácido fosfatídico; PG, fosfatidilglicerol; PGP, fosfatidilglicerofosfato; S-DGD, diglicosilgliceroldieter sulfatado; todos los lípidos derivan de C₂₀-C₂₀ y/o C₂₀-C₂₅ isoprenil glicerol dieter.

Tabla 10. Porcentajes de hibridación entre ARNr de Haloarcula hispanica ATCC 33960^r y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN	%	
						Val. obt.	V. cons.
H. <u>gibbonsii</u>	4811	276	213	21,06	228,4		
H. <u>gibbonsii</u>	1168	189	160	11,22	104,1	132,6	16,48
H. <u>gibbonsii</u>	1234	187	159	10,93	112,9		
H. <u>gibbonsii</u>	1180	171	154	7,75	152,3		
H. <u>mediterranei</u>	3701	279	226	18,17	203,7		
H. <u>mediterranei</u>	3482	275	217	19,62	177,5		
H. <u>mediterranei</u>	2969	258	204	18,46	160,8	183,5	22,8
H. <u>mediterranei</u>	4296	260	206	18,46	232,7		
H. <u>mediterranei</u>	3270	260	203	19,32	169,2		
T. <u>tenax</u>	1006	242	205	13,54	74,32		
T. <u>tenax</u>	1132	261	208	18,17	62,31		
T. <u>tenax</u>	687	230	197	13,54	50,75	59,14	7,35
T. <u>tenax</u>	630	222	191	11,80	53,4		
T. <u>tenax</u>	639	229	203	10,35	61,7		
H. <u>morrhuae</u>	2727	248	199	17,01	160,3		
H. <u>morrhuae</u>	2701	265	211	18,46	146,3		
H. <u>morrhuae</u>	2114	261	214	16,43	128,7	145,1	18,03
H. <u>morrhuae</u>	866	244	193	17,59	49,2		
H. <u>morrhuae</u>	3362	257	225	12,08	278,1		
H. <u>halobium</u>	2329	182	161	8,90	261,6		
H. <u>halobium</u>	1705	190	167	10,35	164,7		
H. <u>halobium</u>	2991	178	152	10,35	288,0	260,4	32,35
H. <u>halobium</u>	4717	244	213	11,80	399,8		
H. <u>halobium</u>	1919	177	158	8,32	230,5		

Tabla 10. Continuación

ADN	cpm/cor D.O.595 D.O.700 μ g ADN			cpm/ μ g ADN		% H.Ho	
					Val.obt.	V.cons.	
H. <u>volcanii</u>	2065	304	241	21,66	98,0		
H. <u>volcanii</u>	3138	236	194	14,98	209,4	143,3	17,8
H. <u>volcanii</u>	2899	273	202	23,67	122,5		
H. <u>sinaiensis</u>	7913	225	200	10,06	786,4		
H. <u>sinaiensis</u>	6651	205	166	14,12	471,2		
H. <u>sinaiensis</u>	9274	253	216	13,54	685,1	614,4	76,34
H. <u>sinaiensis</u>	15718	290	210	26,00	604,9		
H. <u>sinaiensis</u>	14696	292	210	26,56	553,3		
H. <u>salinarium</u>	1045	205	170	12,96	80,7		
H. <u>salinarium</u>	892	300	222	25,41	35,1	50,68	6,3
H. <u>salinarium</u>	676	189	159	36	11,51	58,7	
H. <u>salinarium</u>	1368	306	205	32,07	42,7		
H. <u>californiae</u>	20844	261	197	21,4	976,1		
H. <u>californiae</u>	29348	313	215	31,2	940,7	958,4	119,07
H. <u>californiae</u>	17579	264	205	19,6	896,1		
H. <u>californiae</u>	23207	274	210	21,4	1086,8		
H. <u>hispanica</u>	8086	188	166	9,19	879,6		
H. <u>hispanica</u>	9900	195	164	11,80	839,0		
H. <u>hispanica</u>	14003	232	189	15,27	916,8	804,8	100,00
H. <u>hispanica</u>	11453	252	200	17,88	640,6		
H. <u>hispanica</u>	8008	193	163	11,51	695,8		

Tabla 11. Porcentajes de hibridación entre ARNr de Halobacterium halobium NRC 817 y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN	%	
						Val. obt.	V. cons.
H. <u>gibbonsii</u>	4167	151	131	14,40	289,5		
H. <u>gibbonsii</u>	6757	156	134	15,05	448,8	310,9	21,67
H. <u>gibbonsii</u>	5549	172	145	16,70	332,2		
H. <u>gibbonsii</u>	4027	171	152	14,07	286,3		
H. <u>mediterranei</u>	9457	229	177	24,94	379,2		
H. <u>mediterranei</u>	13799	260	190	30,87	447,0		
H. <u>mediterranei</u>	4494	175	141	19,01	236,4	442,7	30,86
H. <u>mediterranei</u>	13841	250	190	27,58	501,9		
H. <u>mediterranei</u>	15569	248	191	26,59	585,6		
T. <u>tenax</u>	2466	193	167	16,37	150,6		
T. <u>tenax</u>	4215	255	190	29,22	144,2	149,3	10,41
T. <u>tenax</u>	3739	235	182	25,27	148,0		
T. <u>tenax</u>	3697	232	190	21,64	170,8		
H. <u>morrhuae</u>	6567	238	179	27,25	241,0		
H. <u>morrhuae</u>	5985	239	189	24,28	246,5	243,8	16,99
H. <u>morrhuae</u>	6858	232	179	25,60	267,9		
H. <u>morrhuae</u>	5548	231	180	24,61	225,4		
H. <u>halobium</u>	31035	204	162	21,64	1433,8		
H. <u>halobium</u>	15302	159	135	15,71	973,8	1434,5	100,00
H. <u>halobium</u>	32953	236	190	22,96	1435,1		
H. <u>halobium</u>	34776	226	177	23,95	1451,9		
H. <u>volcanii</u>	12178	175	131	22,30	546,0		
H. <u>volcanii</u>	13865	352	246	42,73	324,5	438,2	30,54
H. <u>volcanii</u>	11856	246	194	24,94	475,4		

Tabla 11. Continuación

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<i>H. volcanii</i>	12509	271	200	31,20	400,9		
<i>H. sinaiensis</i>	4878	184	139	22,63	215,5		
<i>H. sinaiensis</i>	6959	168	137	18,02	386,2	339,8	23,69
<i>H. sinaiensis</i>	4610	163	139	15,71	293,4		
<i>H. sinaiensis</i>	6744	164	139	16,04	420,4		
<i>H. salinarium</i>	5069	217	174	21,97	230,7		
<i>H. salinarium</i>	10397	250	176	32,19	323,0	282,7	19,71
<i>H. salinarium</i>	6325	174	144	17,69	357,5		
<i>H. salinarium</i>	5487	327	182	22,63	242,4		
<i>H. californiae</i>	10553	234	205	17,36	607,9		
<i>H. californiae</i>	10825	175	140	19,34	559,8	632,0	44,06
<i>H. californiae</i>	17442	284	235	23,95	728,2		
<i>H. hispanica</i>	17388	257	192	29,22	595,0		
<i>H. hispanica</i>	15715	252	189	28,56	550,2	541,3	37,73
<i>H. hispanica</i>	9593	186	155	18,02	532,3		
<i>H. hispanica</i>	9493	185	151	19,01	499,4		

Tabla 12. Porcentajes de hibridación entre ARNr de Haloferax volcanii NCMB 2012^r y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
H. <u>gibbonsii</u>	5375	190	140	18,44	291,55		
H. <u>gibbonsii</u>	9499	342	180	21,64	439,00	431,85	88,6
H. <u>gibbonsii</u>	20633	412	249	48,58	424,70		
H. <u>mediterranei</u>	12662	288	193	30,44	415,94		
H. <u>mediterranei</u>	11565	308	213	30,44	379,9		
H. <u>mediterranei</u>	6681	308	210	31,24	213,84	415,74	85,3
H. <u>mediterranei</u>	14109	256	163	29,9	471,74		
H. <u>mediterranei</u>	14223	283	184	31,5	451,39		
L. <u>tenax</u>	440	203	180	11,23	39,17		
L. <u>tenax</u>	445	235	183	18,97	23,46	30,90	6,3
L. <u>tenax</u>	690	269	196	24,57	28,08		
L. <u>tenax</u>	650	211	156	19,77	32,87		
H. <u>morruhae</u>	2756	274	195	26,17	105,30		
H. <u>morruhae</u>	2224	276	190	28,04	79,3	112,39	23,00
H. <u>morruhae</u>	4319	258	171	28,3	152,57		
H. <u>halobium</u>	4693	266	197	23,5	199,6		
H. <u>halobium</u>	1768	224	159	22,4	78,79		
H. <u>halobium</u>	5387	262	186	25,37	212,3	191,5	39,3
H. <u>halobium</u>	6512	273	200	24,5	265,00		
H. <u>halobium</u>	2496	161	135	12,03	207,4		
H. <u>halobium</u>	3410	232	164	23,24	146,73		
H. <u>volcanii</u>	15127	281	174	33,64	449,63		
H. <u>volcanii</u>	8361	283	227	20,04	417,27	487,6	100,00
H. <u>volcanii</u>	16320	295	208	28,30	576,52		

Tabla 12. Continuación

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN	%	
						Val.obt.	V.cons.
<i>H. volcanii</i>	13616	255	177	25,9	525,58		
<i>H. sinaiensis</i>	5605	294	177	36,3	154,36		
<i>H. sinaiensis</i>	3963	231	171	21,1	187,78		
<i>H. sinaiensis</i>	5675	263	189	24,83	228,47	169,94	34,9
<i>H. sinaiensis</i>	1679	185	147	15,23	110,2		
<i>H. sinaiensis</i>	3047	207	158	18,17	167,69		
<i>H. salinarium</i>	1683	266	190	25,37	66,33		
<i>H. salinarium</i>	860	303	209	30,17	28,50	48,26	9,9
<i>H. salinarium</i>	1638	288	206	26,97	60,72		
<i>H. salinarium</i>	882	270	201	23,50	37,52		
<i>H. californiae</i>	8991	348	206	42,98	209,19		
<i>H. californiae</i>	7704	366	202	48,55	157,71		
<i>H. californiae</i>	4973	314	197	36,31	136,95	161,61	33,1
<i>H. californiae</i>	2155	191	142	18,17	118,6		
<i>H. californiae</i>	6601	311	200	34,71	190,17		
<i>H. hispanica</i>	4527	296	200	30,71	147,42		
<i>H. hispanica</i>	8243	286	196	29,1	283,19	150,23	30,8
<i>H. hispanica</i>	6578	365	223	42,98	153,04		
<i>H. hispanica</i>	4594	331	226	33,11	138,75		

Tabla 13. Porcentajes de hibridación entre ARNr de *Haloferax gibbonsii* ATCC 33959^r y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<i>H. gibbonsii</i>	11821	378	132	13,25	891,9		
<i>H. gibbonsii</i>	20447	435	117	17,27	1184,2		
<i>H. gibbonsii</i>	23176	626	142	26,52	877,8	1025,4	100,00
<i>H. gibbonsii</i>	20840	530	133	21,67	961,8		
<i>H. gibbonsii</i>	48521	870	143	40,06	1211,3		
<i>H. mediterranei</i>	9336	382	121	14,09	662,6		
<i>H. mediterranei</i>	15477	499	130	20,11	769,7	738,3	72,0
<i>H. mediterranei</i>	8577	328	120	11,14	770,2		
<i>H. mediterranei</i>	9053	350	112	12,80	706,8		
<i>T. tenax</i>	730	307	138	8,96	81,4		
<i>T. tenax</i>	950	328	127	10,75	88,4	81,6	7,95
<i>T. tenax</i>	754	373	131	13,03	57,9		
<i>T. tenax</i>	982	363	119	13,14	74,71		
<i>Halococcus</i> sp.	1518	190	109	4,06	373,9		
<i>Halococcus</i> sp.	1136	167	102	3,17	358,5		
<i>Halococcus</i> sp.	1391	172	103	3,39	410,2	370,1	36,1
<i>Halococcus</i> sp.	1230	181	111	3,45	356,8		
<i>Halococcus</i> sp.	1598	193	109	4,23	378,0		
<i>H. morrhuae</i>	3696	457	126	17,99	205,4		
<i>H. morrhuae</i>	8582	608	139	25,68	334,2		
<i>H. morrhuae</i>	7290	609	141	25,85	282,0	240,8	23,48
<i>H. morrhuae</i>	2555	359	115	13,14	194,4		
<i>H. morrhuae</i>	2498	311	112	10,64	234,9		
<i>H. halobium</i>	13617	551	132	22,89	594,8		
<i>H. halobium</i>	8912	531	125	22,17	402,0	584,3	56,98

Tabla 13. Continuación

ADN	cpm/cor D.O.595 D.O.700 µg ADN			cpm/µg ADN		% H.Ho	
				Val.obt.	V.cons.		
H. <u>halobium</u>	13262	539	134	22,11	599,7		
H. <u>halobium</u>	13009	548	133	22,67	573,8		
H. <u>volcanii</u>	29049	622	134	26,74	1086,4		
H. <u>volcanii</u>	34918	875	168	38,94	896,7	916,1	89,34
H. <u>volcanii</u>	20846	631	134	27,24	765,3		
H. <u>sinaiensis</u>	11362	752	140	33,65	337,7		
H. <u>sinaiensis</u>	10172	721	148	31,48	323,2	351,8	34,31
H. <u>sinaiensis</u>	6199	574	129	24,34	417,9		
H. <u>sinaiensis</u>	8215	541	130	22,45	366,0		
H. <u>salinarium</u>	2415	531	128	22,00	109,8		
H. <u>salinarium</u>	2841	498	127	20,28	140,1		
H. <u>salinarium</u>	1713	523	125	21,72	78,9	134,7	13,14
H. <u>salinarium</u>	3179	388	119	14,54	218,7		
H. <u>salinarium</u>	1839	340	118	11,92	154,3		
H. <u>californiae</u>	5885	414	121	15,87	370,8		
H. <u>californiae</u>	10803	733	151	31,98	337,8	361,9	35,29
H. <u>californiae</u>	7282	455	121	18,16	401,0		
H. <u>californiae</u>	6292	451	123	17,82	353,0		
H. <u>hispanica</u>	9583	697	142	30,47	314,5		
H. <u>hispanica</u>	4755	390	123	14,42	329,7	335,8	32,75
H. <u>hispanica</u>	10140	645	136	27,90	363,3		

Tabla 14. Porcentajes de hibridación entre ARNr de "Haloarcula sinaiensis" ATCC 33800 y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O.595	D.O.700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<u>H. gibbonsii</u>	2848	541	123	24,28	117,30		
<u>H. gibbonsii</u>	1598	376	121	14,77	108,19	112,75	19,44
<u>H. gibbonsii</u>	1765	530	123	23,64	74,66		
<u>H. gibbonsii</u>	8187	1156	159	58,08	140,96		
<u>H. mediterranei</u>	4090	550	123	18,79	217,67		
<u>H. mediterranei</u>	2043	428	120	17,86	114,39		
<u>H. mediterranei</u>	3833	511	124	22,47	167,16	138,20	23,83
<u>H. mediterranei</u>	3184	536	124	23,93	133,05		
<u>H. mediterranei</u>	2687	538	127	431	25,04	107,31	
<u>I. tenax</u>	375	375	121	14,71	25,49		
<u>I. tenax</u>	344	292	117	10,1	34,06	33,61	5,79
<u>I. tenax</u>	476	363	115	14,36	33,15		
<u>I. tenax</u>	1125	577	116	26,67	42,16		
<u>Halococcus</u> sp.	710	185	109	4,32	164,35		
<u>Halococcus</u> sp.	5553	211	110	5,78	960,73		
<u>Halococcus</u> sp.	418	184	107	4,37	95,53	138,73	23,92
<u>Halococcus</u> sp.	661	194	113	4,61	143,38		
<u>Halococcus</u> sp.	500	178	97	4,61	108,45		
<u>H. morrhuae</u>	2480	581	132	26,09	95,06		
<u>H. morrhuae</u>	2485	536	119	24,22	102,60	98,84	17,04
<u>H. morrhuae</u>	3066	510	117	22,82	134,36		
<u>H. morrhuae</u>	1697	537	117	24,40	69,55		
<u>H. halobium</u>	2502	301	110	11,63	229,84		
<u>H. halobium</u>	3040	318	107	12,20	249,18	239,51	41,29
<u>H. halobium</u>	5855	520	120	23,23	252,00		

Tabla 14. Continuación.

ADN	cpm/cor D.O. 595 D.O. 700 µg ADN				cpm/µg ADN		% H. Ho	
	Val. obt.		V. cons.					
H. <u>halobium</u>	4754	525	119	23,58	201,61			
H. <u>volcanii</u>	2627	573	123	26,15	100,46			
H. <u>volcanii</u>	3188	646	123	31,58	100,95	100,71	17,36	
H. <u>volcanii</u>	2892	526	123	23,41	123,54			
H. <u>sinaiensis</u>	18538	645	125	30,24	613,03			
H. <u>sinaiensis</u>	5894	335	110	19,01	452,89			
H. <u>sinaiensis</u>	9769	390	114	15,99	610,94	580,05	100,00	
H. <u>sinaiensis</u>	12735	528	120	23,70	537,34			
H. <u>sinaiensis</u>	13335	510	122	22,53	591,88			
H. <u>salinarium</u>	862	538	120	24,28	35,50			
H. <u>salinarium</u>	557	338	105	13,48	41,32			
H. <u>salinarium</u>	1362	483	119	21,13	64,46	47,09	8,12	
H. <u>salinarium</u>	331	443	115	19,03	17,92			
H. <u>salinarium</u>	3789	464	123	19,79	191,46			
H. <u>californiae</u>	14098	562	122	25,57	551,35			
H. <u>californiae</u>	11047	480	124	20,66	534,70			
H. <u>californiae</u>	29886	765	134	36,72	813,89	648,58	111,81	
H. <u>californiae</u>	20026	709	123	34,09	587,45			
H. <u>californiae</u>	27032	748	133	35,78	755,51			
H. <u>hispanica</u>	16111	597	120	27,73	581,00			
H. <u>hispanica</u>	12013	368	113	14,77	813,32	726,61	125,27	
H. <u>hispanica</u>	10355	343	103	13,89	745,50			
H. <u>hispanica</u>	9830	336	108	13,18	707,72			

Tabla 15 Porcentajes de hibridación entre ARNr de Haloarcula californiae ATCC 33790 y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
H. <u>gibbonsii</u>	1630	271	142	11,50	141,7		
H. <u>gibbonsii</u>	6453	576	162	38,52	167,5	154,5	17,92
H. <u>gibbonsii</u>	4106	470	159	28,76	142,8		
H. <u>gibbonsii</u>	3786	404	156	22,79	166,2		
H. <u>mediterranei</u>	6932	458	162	27,34	253,6		
H. <u>mediterranei</u>	4622	443	159	26,20	176,64		
H. <u>mediterranei</u>	704	307	142	14,92	47,2	206,4	23,94
H. <u>mediterranei</u>	6870	444	160	26,20	262,2		
H. <u>mediterranei</u>	5170	450	156	27,34	189,1		
T. <u>tenax</u>	1786	430	150	25,88	69,2		
T. <u>tenax</u>	1280	465	157	28,47	45,0	68,9	7,99
T. <u>tenax</u>	1615	410	154	23,54	68,6		
T. <u>tenax</u>	1561	360	143	19,84	78,7		
<u>Halococcus</u> sp.	486	196	134	5,15	94,3		
<u>Halococcus</u> sp.	811	201	142	4,87	166,6	113,3	13,14
<u>Halococcus</u> sp.	535	205	142	5,25	102,0		
<u>Halococcus</u> sp.	488	194	145	3,92	124,5		
H. <u>morrhuae</u>	4938	415	155	23,92	206,4		
H. <u>morrhuae</u>	3286	419	155	24,30	135,2	156,0	18,10
H. <u>morrhuae</u>	4414	423	152	24,97	176,8		
H. <u>morrhuae</u>	3016	424	150	25,25	119,4		
H. <u>halobium</u>	5488	379	142	21,74	252,4		
H. <u>halobium</u>	3516	292	143	13,40	262,4	257,4	29,85
H. <u>halobium</u>	2573	277	146	11,69	220,0		
H. <u>halobium</u>	6829	388	149	21,93	311,4		

Tabla 15. Continuación.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<i>H. volcanii</i>	2931	407	152	23,45	125,0		
<i>H. volcanii</i>	2644	406	152	23,35	113,2	109,8	12,73
<i>H. volcanii</i>	1618	340	145	17,76	91,1		
<i>H. sinaiensis</i>	12466	352	145	18,90	659,6		
<i>H. sinaiensis</i>	17291	449	147	27,91	617,5	583,7	67,70
<i>H. sinaiensis</i>	16992	486	152	30,94	549,2		
<i>H. sinaiensis</i>	14821	443	151	26,96	549,8		
<i>H. salinarium</i>	2102	424	154	24,87	84,51		
<i>H. salinarium</i>	960	421	155	24,49	39,20		
<i>H. salinarium</i>	490	262	152	9,70	50,50	61,88	7,18
<i>H. salinarium</i>	3339	462	154	28,47	117,26		
<i>H. salinarium</i>	1178	403	150	23,26	50,64		
<i>H. californiae</i>	14476	320	143	16,05	901,7		
<i>H. californiae</i>	15250	325	145	16,34	933,3		
<i>H. californiae</i>	28185	512	151	33,50	841,4	862,1	100,00
<i>H. californiae</i>	14167	339	147	17,48	810,6		
<i>H. californiae</i>	25288	477	153	29,99	843,2		
<i>H. hispanica</i>	11028	326	150	15,96	691,0		
<i>H. hispanica</i>	11670	321	147	15,77	740,0	715,5	83,00
<i>H. hispanica</i>	11666	310	146	14,82	787,1		
<i>H. hispanica</i>	16335	430	156	25,25	646,9		

Tabla 16. Porcentajes de hibridación entre ARNr de Thermoproteus tenax DSM 2078^T y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor D.O.595 D.O.700 µg ADN				cpm/µg ADN		% H. Ho
	Val. obt.		V. cons.				
H. <u>gibbonsii</u>	3181	506	144	27,48	115,8		
H. <u>gibbonsii</u>	1445	354	134	16,79	86,1	116,6	14,88
H. <u>gibbonsii</u>	1898	339	129	16,04	118,3		
H. <u>gibbonsii</u>	5010	720	156	42,67	117,4		
H. <u>mediterranei</u>	3033	517	146	28,15	107,7		
H. <u>mediterranei</u>	2377	494	159	17,91	132,7	107,7	13,74
H. <u>mediterranei</u>	857	265	124	10,85	79,0		
H. <u>mediterranei</u>	3038	511	149	28,23	107,6		
T. <u>tenax</u>	13461	353	136	16,56	812,8		
T. <u>tenax</u>	26679	491	146	26,20	1018,4		
T. <u>tenax</u>	15577	420	132	21,90	711,0	783,8	100,00
T. <u>tenax</u>	11588	348	144	15,59	743,5		
T. <u>tenax</u>	17477	429	140	21,98	795,0		
<u>Halococcus</u> sp.	546	222	19	6,48	84,3		
<u>Halococcus</u> sp.	564	202	138	5,05	111,7	106,3	13,56
<u>Halococcus</u> sp.	449	188	132	4,45	100,9		
<u>Halococcus</u> sp.	1544	200	128	5,65	273,1		
H. <u>morrhuae</u>	2527	476	142	25,37	99,6		
H. <u>morrhuae</u>	2912	474	149	24,69	117,9	96,5	12,31
H. <u>morrhuae</u>	2078	434	141	22,28	93,3		
H. <u>morrhuae</u>	2309	517	144	28,30	81,6		
H. <u>halobium</u>	4015	475	136	25,75	156,0		
H. <u>halobium</u>	4729	460	134	24,77	190,9	168,00	21,42
H. <u>halobium</u>	4195	488	132	27,02	155,2		
H. <u>halobium</u>	4482	461	133	24,98	179,9		

Tabla 16. Continuación.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
H. <u>volcanii</u>	4522	663	149	38,97	116,2		
H. <u>volcanii</u>	3644	580	139	33,42	109,0	102,03	13,01
H. <u>volcanii</u>	2679	512	140	28,23	94,9		
H. <u>volcanii</u>	1951	410	124	21,76	89,7		
H. <u>sinaiensis</u>	5212	622	138	36,66	142,8		
H. <u>sinaiensis</u>	3387	429	140	21,98	154,1	148,5	18,94
H. <u>sinaiensis</u>	1206	324	129	14,91	80,9		
H. <u>salinarium</u>	2410	475	142	25,29	95,3		
H. <u>salinarium</u>	2068	482	140	25,97	79,6	86,6	11,05
H. <u>salinarium</u>	2009	444	131	23,79	84,5		
H. <u>salinarium</u>	1949	416	127	21,98	88,7		
H. <u>californiae</u>	5218	584	137	33,87	154,0		
H. <u>californiae</u>	7458	877	148	41,57	157,0	147,8	18,86
H. <u>californiae</u>	5367	678	143	40,49	132,5		
H. <u>halobium</u>	2535	369	127	18,15	137,4		
H. <u>halobium</u>	6161	495	140	26,94	228,6	143,8	18,34
H. <u>halobium</u>	2531	353	132	16,87	150,1		
H. <u>halobium</u>	2000	339	136	15,51	128,9		

Tabla 17. Porcentajes de hibridación entre ARNr de *Halococcus* sp. P-423 y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<i>H. gibbonsii</i>	6015	461	142	22,91	262,6		
<i>H. gibbonsii</i>	6388	450	130	22,98	277,9		
<i>H. gibbonsii</i>	5201	412	134	19,78	262,9	267,8	13,12
<i>H. gibbonsii</i>	7284	552	130	30,77	236,8		
<i>H. gibbonsii</i>	4369	347	129	15,20	287,4		
<i>H. mediterranei</i>	2546	328	128	13,83	184,1		
<i>H. mediterranei</i>	3011	291	122	11,40	262,6	239,6	11,74
<i>H. mediterranei</i>	1806	245	117	8,34	216,6		
<i>H. mediterranei</i>	2230	258	134	8,03	277,6		
<i>T. tenax</i>	1247	247	122	8,11	153,8		
<i>T. tenax</i>	1043	280	134	9,71	10,74	119,4	5,85
<i>T. tenax</i>	1575	301	125	12,00	131,3		
<i>T. tenax</i>	2479	464	141	23,98	103,4		
<i>Halococcus</i> sp.	13183	396	131	18,79	701,6		
<i>Halococcus</i> sp.	8848	202	124	4,52	1956,4		
<i>Halococcus</i> sp.	8535	193	127	3,61	2366,2	2041,4	100,00
<i>Halococcus</i> sp.	8843	192	109	4,90	1801,6		
<i>Halococcus</i> sp.	8354	190	126	3,45	2418,0		
<i>H. morrhuae</i>	10987	446	132	22,53	487,7		
<i>H. morrhuae</i>	13029	427	133	21,00	620,4	485,8	23,79
<i>H. morrhuae</i>	11302	450	125	23,37	483,7		
<i>H. morrhuae</i>	11722	512	139	27,03	433,7		
<i>H. halobium</i>	6653	293	114	12,22	544,1		
<i>H. halobium</i>	8639	428	132	21,15	408,4	531,3	26,03
<i>H. halobium</i>	13196	456	134	23,14	570,3		

Tabla 17. Continuación.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<i>H. halobium</i>	5272	283	131	10,16	518,5		
<i>H. volcanii</i>	3966	296	120	12,00	330,5		
<i>H. volcanii</i>	8251	474	132	24,66	334,6		
<i>H. volcanii</i>	15869	794	148	47,85	331,6	327,1	16,02
<i>H. volcanii</i>	12056	664	150	37,78	319,1		
<i>H. volcanii</i>	5990	543	129	30,16	198,6		
<i>H. sinaiensis</i>	7392	528	132	28,78	256,8		
<i>H. sinaiensis</i>	8551	539	118	30,69	278,6	275,7	13,51
<i>H. sinaiensis</i>	8196	522	135	28,10	291,7		
<i>H. salinarium</i>	3617	464	126	23,59	153,3		
<i>H. salinarium</i>	1910	339	131	14,44	132,3	117,6	5,76
<i>H. salinarium</i>	2496	463	123	24,51	161,6		
<i>H. salinarium</i>	2616	487	135	25,42	102,9		
<i>H. californiae</i>	4978	340	122	15,20	327,5		
<i>H. californiae</i>	8769	576	143	31,61	277,5	325,6	15,95
<i>H. californiae</i>	4847	336	119	14,97	323,7		
<i>H. hispanica</i>	6290	364	133	16,19	388,4		
<i>H. hispanica</i>	14838	684	139	40,15	369,5	358,2	17,55
<i>H. hispanica</i>	5486	356	130	15,81	346,9		
<i>H. hispanica</i>	6735	486	142	24,82	271,4		

Tabla 18 Porcentajes de hibridación entre ARNr de Haloferax mediterranei ATCC 33500^T y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor D.O.595 D.O.700 µg ADN				cpm/µg ADN		% H.Ho
	Val.obt.		V.cons.				
H. <u>gibbonsii</u>	32606	437	155	25,21	1293,33		
H. <u>gibbonsii</u>	15613	308	150	13,96	1118,01	1217,28	71,23
H. <u>gibbonsii</u>	18033	305	147	13,96	1291,29		
H. <u>gibbonsii</u>	15022	287	141	12,88	1166,5		
H. <u>mediterranei</u>	14164	268	148	10,51	1346,5		
H. <u>mediterranei</u>	17257	281	130	13,33	1294,58		
H. <u>mediterranei</u>	59274	450	162	25,75	230,147	1708,8	100,00
H. <u>mediterranei</u>	14970	255	147	9,43	1587,4		
H. <u>mediterranei</u>	55275	445	163	25,21	2192,5		
T. <u>tenax</u>	2507	461	158	27,11	92,45		
T. <u>tenax</u>	916	311	150	14,23	64,34	71,36	4,17
T. <u>tenax</u>	1905	432	160	24,30	78,38		
T. <u>tenax</u>	318	238	137	8,79	36,15		
H. <u>morrhuae</u>	7801	397	155	21,58	361,44		
H. <u>morrhuae</u>	7661	432	163	24,03	318,78	310,11	18,14
H. <u>morrhuae</u>	6947	471	153	28,47	243,96		
H. <u>morrhuae</u>	6916	410	153	22,94	301,44		
H. <u>halobium</u>	7101	252	135	10,25	693,00		
H. <u>halobium</u>	10973	258	142	10,16	1080,44		
H. <u>halobium</u>	7938	241	140	8,79	902,49	861,37	50,4
H. <u>halobium</u>	9973	268	142	11,06	901,47		
H. <u>halobium</u>	20164	441	152	25,85	780,17		
H. <u>volcanii</u>	37469	461	157	27,2	1377,23		
H. <u>volcanii</u>	40214	455	157	26,66	1508,30	1442,77	84,43
H. <u>volcanii</u>	36330	403	153	22,30	1628,52		

Tabla 18. Continuación.

ADN	cpm/cor	D.O. 595	D.O. 700	µg ADN	cpm/µg ADN		% H. Ho
					Val. obt.	V. cons.	
<i>H. volcanii</i>	14508	333	148	16,4	883,89		
<i>H. sinaiensis</i>	6326	311	149	14,32	441,52		
<i>H. sinaiensis</i>	4402	286	143	12,6	349,24	395,38	23,13
<i>H. sinaiensis</i>	4788	317	143	15,4	310,58		
<i>H. sinaiensis</i>	9920	338	139	17,68	560,98		
<i>H. salinarium</i>	1122	333	142	7,88	142,22		
<i>H. salinarium</i>	3412	416	148	23,94	142,52	159,31	9,32
<i>H. salinarium</i>	4604	421	153	23,94	192,3		
<i>H. salinarium</i>	2034	292	148	12,69	160,2		
<i>H. californiae</i>	6753	400	156	21,76	310,28		
<i>H. californiae</i>	9811	415	156	23,12	414,26	377,69	22,1
<i>H. californiae</i>	8132	379	150	20,40	398,54		
<i>H. hispanica</i>	11437	453	158	26,39	433,38		
<i>H. hispanica</i>	17690	471	166	27,29	648,06	436,9	25,56
<i>H. hispanica</i>	5843	472	158	28,11	207,84		
<i>H. hispanica</i>	11984	465	161	27,2	440,49		

Tabla 19. Porcentajes de hibridación entre ARNr de Halococcus morrhuae CCM 537^T y los diferentes ADN estudiados.

ADN	cpm/cor D.O.595 D.O.700 µg ADN				cpm/µg ADN		% H. Ho
	Val. obt.	V. cons.					
<u>H. gibbonsii</u>	8482	511	175	23,70	357,9		
<u>H. gibbonsii</u>	11710	525	174	24,90	470,1		
<u>H. gibbonsii</u>	12873	547	174	26,57	484,5	429,5	29,98
<u>H. gibbonsii</u>	7963	420	170	17,29	460,4		
<u>H. gibbonsii</u>	6665	495	172	22,80	292,4		
<u>H. mediterranei</u>	4765	355	162	13,00	366,6		
<u>H. mediterranei</u>	13402	496	174	22,72	589,8		
<u>H. mediterranei</u>	5077	517	190	23,10	219,8	354,33	24,74
<u>H. mediterranei</u>	3386	314	177	8,77	385,9		
<u>H. mediterranei</u>	1952	273	169	6,29	310,5		
<u>T. tenax</u>	1981	497	184	22,04	89,9		
<u>T. tenax</u>	1395	384	178	13,98	99,8	94,85	6,62
<u>T. tenax</u>	1257	469	182	20,08	62,6		
<u>T. tenax</u>	2284	485	188	20,99	108,8		
<u>Halococcus sp.</u>	6337	251	163	5,08	1247,3		
<u>Halococcus sp.</u>	4919	233	169	3,27	1503,5		
<u>Halococcus sp.</u>	5437	244	165	4,40	1235,2	1382,7	92,76
<u>Halococcus sp.</u>	4708	230	174	2,67	1764,7		
<u>Halococcus sp.</u>	4225	239	171	3,57	1182,6		
<u>H. morrhuae</u>	25280	522	195	23,10	1094,4		
<u>H. morrhuae</u>	45492	494	191	21,29	2136,7		
<u>H. morrhuae</u>	32771	530	185	24,46	1340,0	1432,3	100,00
<u>H. morrhuae</u>	41932	567	185	27,25	1539,0		
<u>H. morrhuae</u>	26229	446	180	18,50	1417,7		
<u>H. halobium</u>	19849	522	193	23,25	853,7		

Tabla 19. Continuación.

ADN	cpm/cor D.O.595 D.O.700 µg ADN				cpm/µg ADN		% H.Ho
	Val.obt.		V.cons.				
H. <u>halobium</u>	15647	532	187	24,46	639,8	717,5	50,09
H. <u>halobium</u>	7372	339	170	11,19	659,0		
H. <u>volcanii</u>	8840	379	195	12,32	717,6		
H. <u>volcanii</u>	14953	537	171	26,05	574,2	546,5	38,16
H. <u>volcanii</u>	12570	538	166	24,23	528,8		
H. <u>volcanii</u>	11781	512	162	24,83	474,3		
H. <u>sinaiensis</u>	6940	433	164	18,72	370,6		
H. <u>sinaiensis</u>	11685	613	176	31,39	372,2	371,4	25,93
H. <u>sinaiensis</u>	8910	509	166	24,31	366,6		
H. <u>sinaiensis</u>	12441	593	170	30,34	410,1		
H. <u>salinarium</u>	4770	461	165	20,69	230,6		
H. <u>salinarium</u>	2295	348	160	12,54	183,0	206,8	14,14
H. <u>salinarium</u>	5479	454	171	19,71	278,0		
H. <u>salinarium</u>	2700	331	160	20,39	132,4		
H. <u>californiae</u>	9018	461	169	20,39	442,4	442,4	14,32
H. <u>hispanica</u>	8723	379	166	14,43	604,5		
H. <u>hispanica</u>	6888	378	168	14,28	482,4	465,5	32,50
H. <u>hispanica</u>	6404	374	164	14,28	448,5		
H. <u>hispanica</u>	6738	387	166	15,11	446,0		

Las tablas 20 y 21 presentan los porcentajes de hibridación ADN-ARNr para las 11 cepas estudiadas, la homología de hibridación entre estas mismas cepas y sus correspondientes distancias filogenéticas, de acuerdo con las siguientes abreviaturas.

- H. hispanica, H. his = Halocarcula hispanica ATCC 33960^T.
- H. halobium, H. hal = Halobacterium halobium NRC 817
- H. volcanii, H. vol = Haloferax volcaninii NCMB 2012^T
- H. gibbonsii, H. gib = Haloferax gibbonsii ATCC 33959^T
- H. sinaiensis, H. sin = "Halocarcula sinaiensis" ATCC 33800
- H. californiae, H. cal = "Halocarcula californiae" ATCC 33799
- T. tenax, T. ten = Thermoproteus tenax DSM 2078^T
- Halococcus sp., H. sp. = Halococcus sp. P-423
- H. mediterranei, H. med = Haloferax mediterranei ATCC 33500^T
- H. morrhuae (RS), H. mor = Halococcus morrhuae CCM 537^T.
- M. tindarius, M. tin = Methanlobus tindarius T13.

Tabla 20. Porcentajes de hibridación ADN-ARNr para las 11 cepas ensayadas.

ADN ¹	ARNr									
	H. his	H. hal	H. vol	H. gib	H. sin	H. cal	T. ten	H. sp.	H. med	H. mor
<i>H. hispanica</i>	X	37,73	30,80	32,75	125,27	83,00	18,34	17,55	25,56	32,50
<i>H. halobium</i>	32,35	X	39,30	56,98	41,29	29,85	21,42	26,03	50,40	50,09
<i>H. volcanii</i>	16,48	30,54	X	89,34	17,36	12,73	13,01	16,02	84,43	38,16
<i>H. gibbonsii</i>	16,48	21,67	88,60	X	19,44	17,92	14,88	13,12	71,23	29,98
<i>H. sinaiensis</i>	76,34	23,69	34,9	34,31	X	67,70	18,94	13,51	23,13	25,93
<i>H. californiae</i>	119,09	44,06	33,10	35,29	111,81	X	18,86	15,95	22,10	14,32
<i>T. tenax</i>	7,35	10,41	6,30	7,95	5,79	7,99	X	5,85	4,17	6,62
<i>Halococcus</i> sp.	ND ²	ND	ND	36,10	23,92	13,14	13,56	X	ND	92,76
<i>H. mediterranei</i>	22,80	30,86	85,30	72,00	23,83	23,94	13,74	11,74	X	24,74
<i>H. morrhuae</i> (RS)	18,03	16,99	23,00	23,48	17,04	18,10	12,31	23,79	18,14	X
<i>M. tindarius</i>	ND	20,97	ND	ND	ND	ND	3,82	ND	ND	ND

¹ La tabla es simétrica presentando los datos contenidos las homologías de hibridación entre cada uno de los ADN (en filas) y sus correspondientes ARNr (en columnas).

² ND = Resultado no determinado.

Tabla 21. Homologías de hibridación (H) y sus correspondientes distancias filogenéticas (S) para las 11 cepas ensayadas¹.

	H.	H.	H.	H.	H.	H.	T.	H.	H.	H.
	his	hal	vol	gib	sin	cal	ten	sp.	med	mor
H. <u>Hispanica</u>	X	15,17	20,94	21,06	0,32	0,08	31,07	ND	20,51	20,46
H. <u>halobium</u>	34,93	X	15,29	15,17	16,77	14,63	27,44	ND	13,42	17,77
H. <u>volcanii</u>	23,41	34,64	X	1,69	20,23	22,83	34,61	ND	2,37	17,53
H. <u>gibbonsii</u>	23,23	35,13	88,97	X	19,53	19,91	32,00	22,00	4,82	19,14
H. <u>sinaiensis</u>	97,79	31,27	24,61	25,82	X	2,01	32,56	24,76	20,90	22,50
H. <u>californiae</u>	99,42	36,26	20,52	25,15	87,00	X	30,26	27,88	21,20	26,35
T. <u>tenax</u>	11,61	14,93	9,05	10,88	10,47	12,27	X	34,88	37,24	34,69
<u>Halococcus</u> sp.	ND ²	ND	ND	21,76	17,97	14,47	8,91	X	ND	10,90
H. <u>mediterranei</u>	24,14	39,43	84,86	71,61	23,47	23,00	7,56	ND	X	22,39
H. <u>morrhuae (RS)</u>	24,20	29,17	29,62	26,53	21,02	16,10	9,03	46,97	21,18	X
M. <u>tindarius</u>	ND	17,86	ND	ND	ND	ND	3,30	ND	ND	ND

¹ La parte inferior izquierda de la tabla contiene las homologías de hibridación en porcentaje, la parte superior derecha muestra las correspondientes distancias filogenéticas (S).

² ND = Resultado no determinado.

Las figuras 8 y 9 se corresponden con los dos árboles obtenidos a partir de las distancias filogenéticas, de acuerdo con la siguiente clave:

- H. hispanica = Haloarcula hispanica ATCC 33960^T.
- H. halobium = Halobacterium halobium NRC 817
- H. volcanii = Haloferax volcaninii NCMB 2012^T
- H. gibbonsii = Haloferax gibbonsii ATCC 33959^T
- H. sinaiensis = "Haloarcula sinaiensis" ATCC 33800
- H. californiae = "Haloarcula californiae" ATCC 33799
- T. tenax = Thermoproteus tenax DSM 2078^T
- P-423 = Halococcus sp. P-423
- H. mediterranei = Haloferax mediterranei ATCC 33500^T
- H. morrhuae = Halococcus morrhuae CCM 537^T.
- M. tindarius = Methanlobus tindarius Ti3.

Haloferax

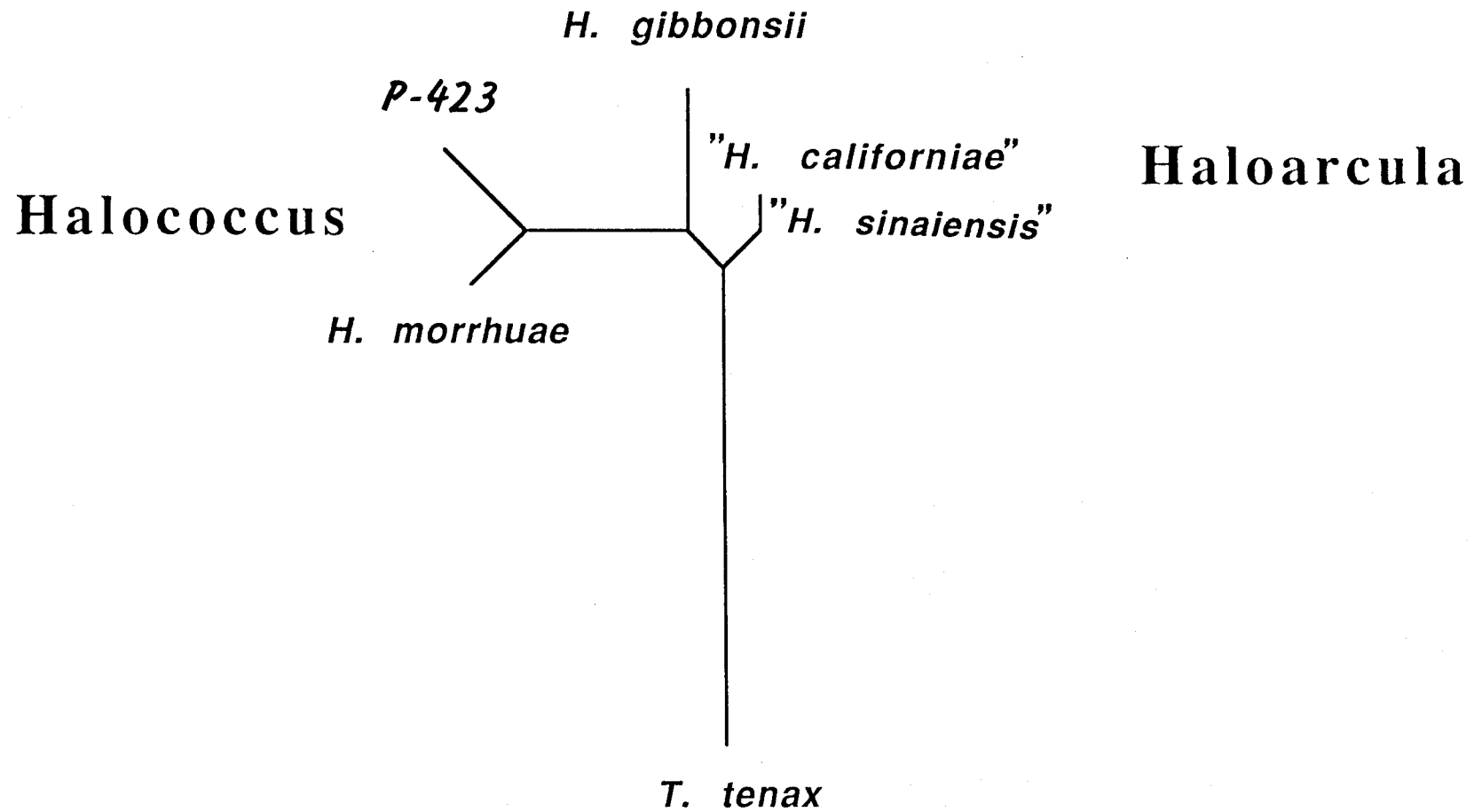


Figura 8. Arbol construido con todas las cepas de las cuales se conocen las distancias filogenéticas a Halococcus sp. P-423.

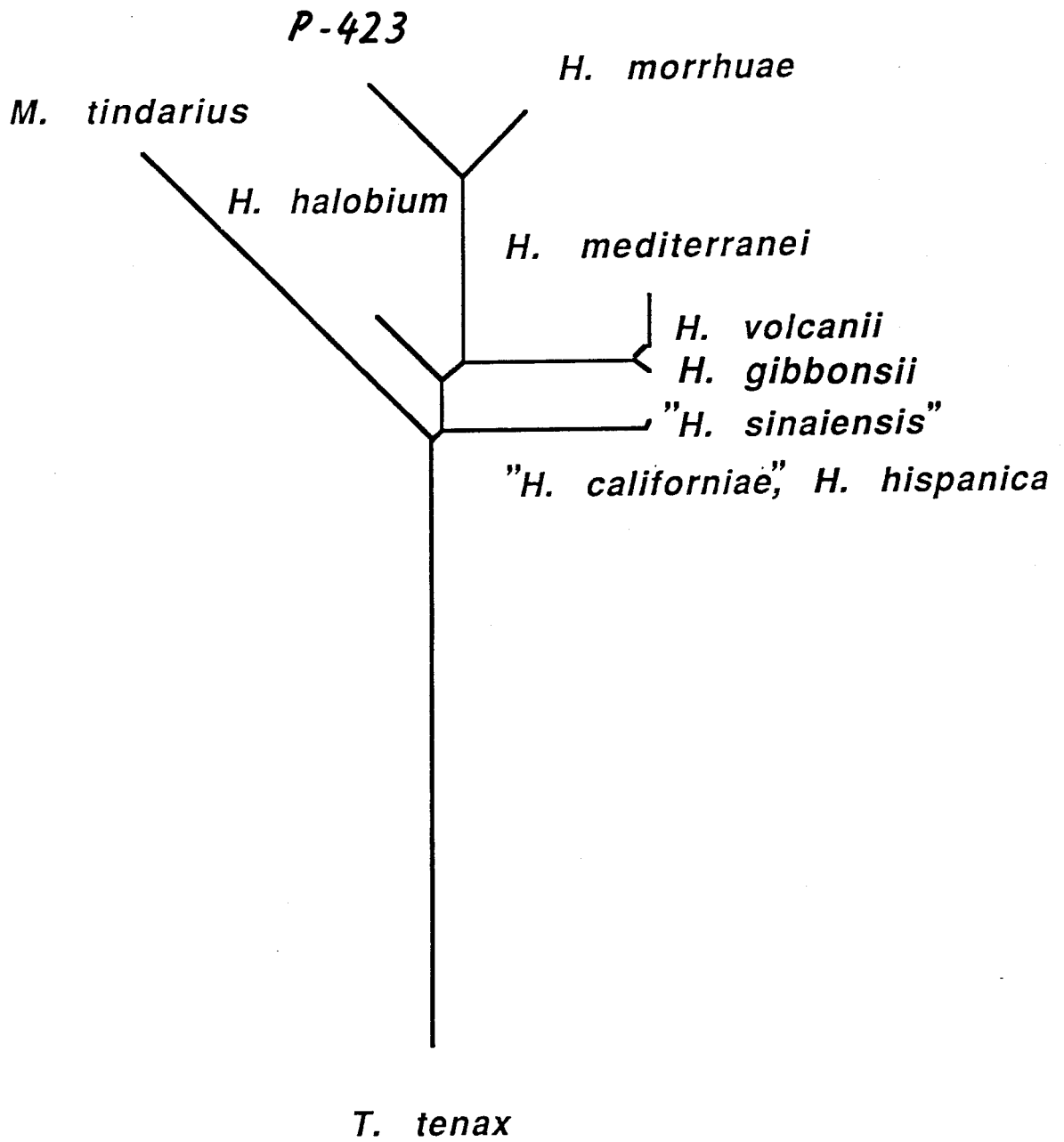


Figura 9. Arbol construido con las 11 cepas utilizadas en el presente estudio.

IV.4. RESULTADOS ESTUDIOS GENETICOS

IV.4.1. Presencia de plásmidos en Halococcus.

Usando el método de lisis descrito anteriormente, se ha aislado ADN plasmídico y cromosómico de Halococcus morrhuae CCM 537. En esta cepa se han detectado dos plásmidos (pHM1 y pHM2), con pesos moleculares aproximados de 48 y 6 kb, respectivamente. El plásmido pequeño se ha estudiado en detalle por su pequeño peso molecular, lo cual lo puede hacer útil en el desarrollo de vectores de clonación para halobacterias. Para su estudio se procedió a realizar una electroforesis en TEA a 4 V cm^{-1} durante 16 h en geles de agarosa verticales al 1 % del ADN plasmídico, y posterior electroelución de la banda correspondiente a dicho plásmido.

El análisis de restricción del plásmido pHM2 mostró dos fragmentos al utilizar EcoRI (Figura 10, banda f). Estos dos fragmentos EcoRI se ligaron en el sitio EcoRI del vector pUM121, y usados para transformar E. coli K12 cepa D1210. Los plásmidos recombinantes se aislaron de los transformantes resistentes a tetraciclina y se denominaron pCM1 y pCM2. Los fragmentos insertados en pCM1 y pCM2 fueron de 3,2 y 2,8 kb respectivamente, correspondientes a los fragmentos EcoRI originados del plásmido pHM2. La orientación de ambos fragmentos en pHM2 se dedujo de restricciones simples y dobles con EcoRI y ClaI (Figura 10, líneas d a k). Los mapas de restricción de los plásmidos pCM1, pCM2 y pHM2, obtenidos mediante análisis de los fragmentos producidos por restricciones simples y dobles mediante electroforesis en gel de agarosa se muestran en la

figura 11. Con este objeto se emplearon las siguientes enzimas de restricción: AluI, AvaI, BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindIII, HpaII, PstI, SalI, TaqI y XhoI. Se encontraron más de cinco puntos de corte para AluI, HaeIII, HpaII o TaqI. Por otra parte, EcoRV, HindIII, PstI o XhoI no originaron ningún fragmento en el plásmido pHM2. La única enzima que originó un lugar único de restricción fue BamHI.

Halococcus sp. N-207, representante del fenón A también presenta dos plásmidos de similar peso molecular y análisis de restricción a los encontrados en Halococcus morrhuae CCM 537^T, tratándose, por tanto, que se trata de los mismos plásmidos. En el caso de Halococcus sp. P-423, sin embargo, no se ha detectado presencia de plásmidos, no habiéndose detectado tampoco banda plasmídica al realizar gradientes de cloruro de cesio.

IV.4.2. Hibridación del plásmido pHM2 con Halococcus y otras halobacterias.

El plásmido pHM2 se usó como sonda marcada con ³²P para estudiar la posible presencia de este plásmido en otras cepas del género Halococcus (Figura 12) y la relación con plásmidos presentes en otras halobacterias (Figura 13). La sonda no hibridó con ADN total de Halococcus sp. P-423 digerido con SstI, pero sí hibridó con los mismos fragmentos de restricción obtenidos con ADN total digerido con SstI de

a b c d e f g h i j k

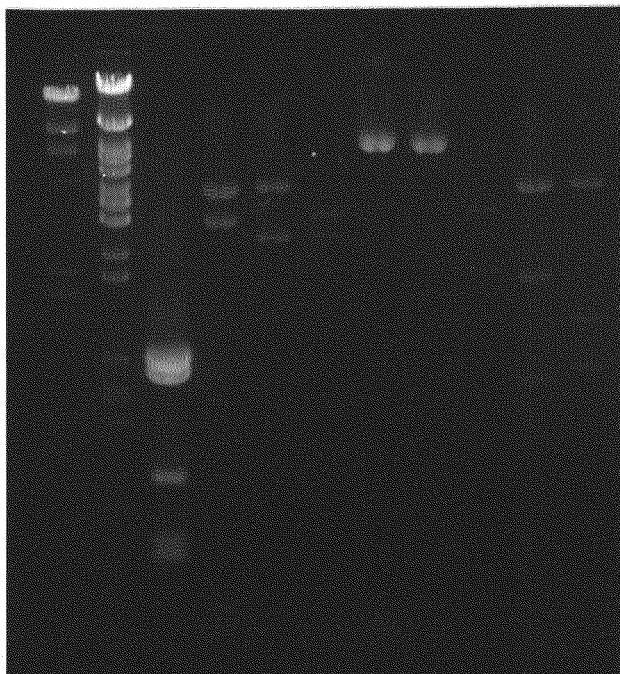


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los fragmentos de restricción de pCM1, pCM2 y pHM2. (a) ADN del fago λ digerido con HindIII; (b) ϕ H digerido con ClaI; (c) pBR322 digerido con TaqI; (d) pCM1 digerido con EcoRI; (e) pCM2 digerido con EcoRI; (f) pHM2 digerido con EcoRI; (g) pCM1 digerido con ClaI; (h) pCM2 digerido con ClaI; (i) pHM2 digerido con ClaI; (j) pCM1 digerido con EcoRI y ClaI; (k) pCM2 digerido con EcoRI y ClaI.

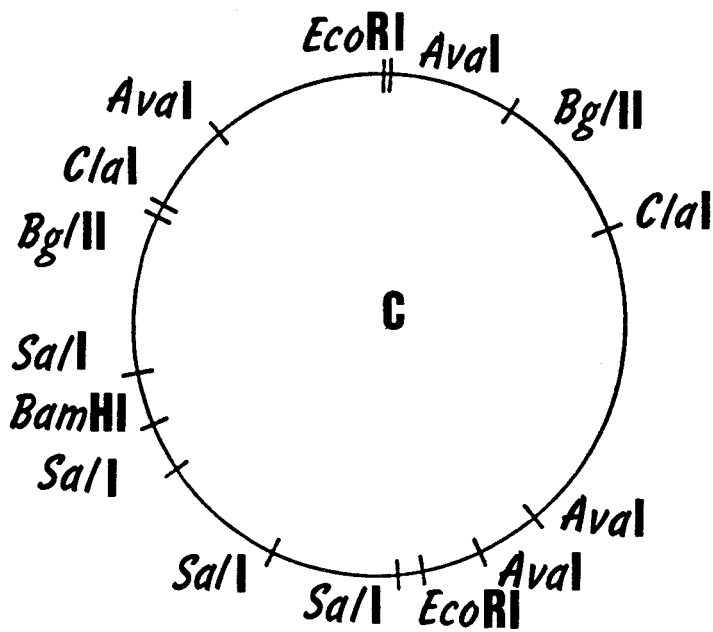
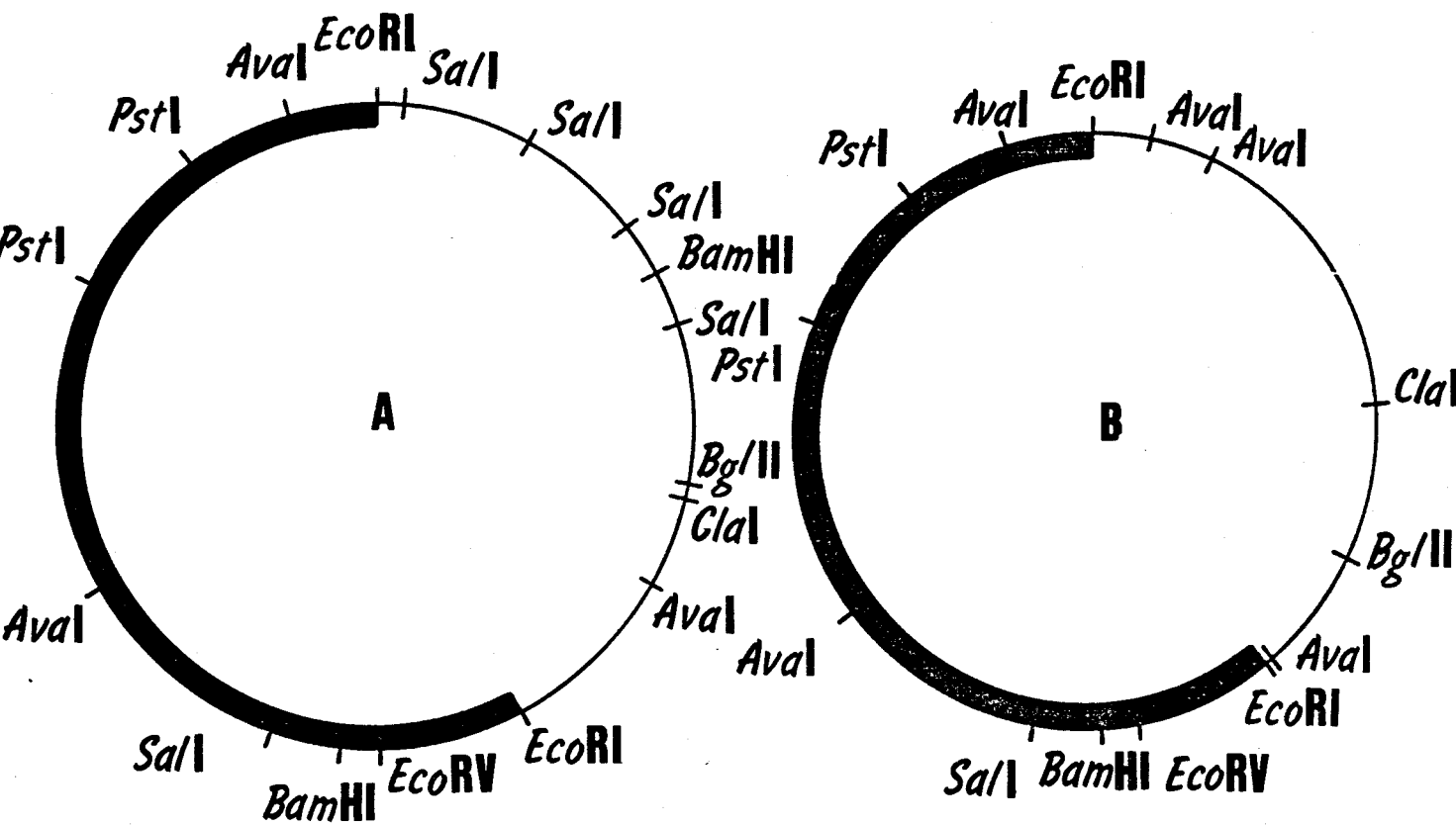


Figura 11. Mapas de restricción de pCM1 (a), pCM2 (b) y pHM2 (c).

—, El vector pUM121; —, los fragmentos EcoRI subclonados de pHM2.

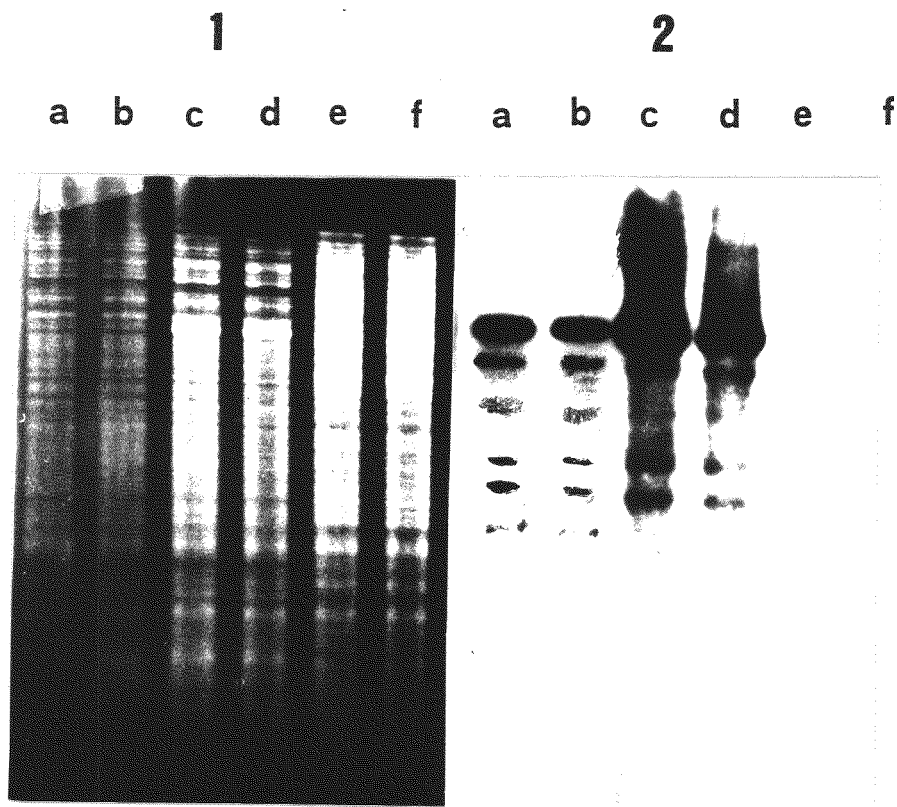


Figura 12. (1) Electroforesis cepas de Halococcus digeridas con SstI. (2) Hibridación de las cepas anteriores con pHM2 marcado con ^{32}P . En ambos casos el orden es el siguiente: (a) y (b) Halococcus morrhuae CCM 537^T; (c) y (d) Halococcus sp. N-207; (e) y (f) Halococcus sp. P-423.

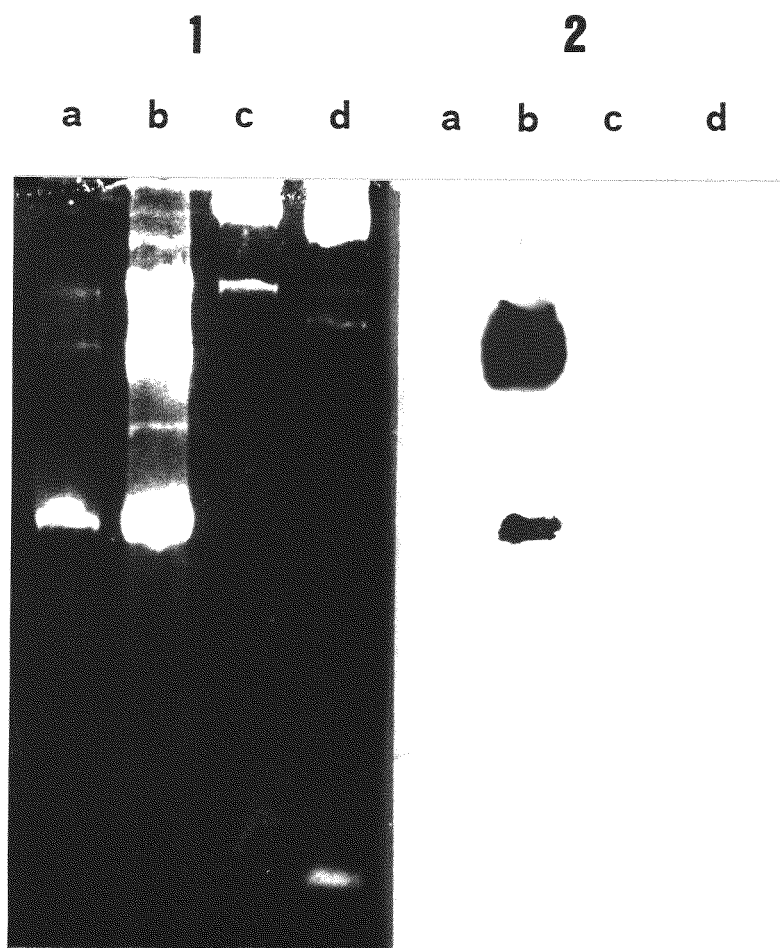


Figura 13. (1) Plásmidos de halobacterias. (2) Hibridación de pHM2 marcado con ^{32}P con plásmidos de halobacterias. En ambos casos el orden es el siguiente: (a) Haloferax volcanii NCMB 2012; (b) Halobacterium trapanicum CHB-83; (c) Halobacterium halobium NRC 34040; (d) Halobacterium sp. cepa SB3.

Halococcus sp. N-207. En este tipo de experimentos se usó como patrón Halococcus morrhuae CCM 537, el cual porta el plásmido pHM2.

Para comprobar si el plásmido pHM2 posee secuencias comunes a otros plásmidos de halobacterias, utilizamos cuatro plásmidos de halobacterias previamente descritos (Pfeifer y col., 1981a). Sólomente un plásmido (pHT1) de Halobacterium trapanicum CHB-83 mostró secuencias comunes con pHM2 como se muestra en la figura 13.

En la cepa Halococcus sp. P-423, no se ha detectado banda plasmídica al realizar los procedimientos de lisis y gradiente en CsCl-bromuro de etidio tal como se ha realizado para la cepa tipo. Por otra parte, tampoco se ha detectado una región del cromosoma que compartiese secuencias con pHM2, pudiendo carecer por tanto de plásmidos propiamente dichos de tamaño molecular reducido y en el caso de que éstos se encontrasen insertados en el cromosoma no presentan homología alguna con pHM2 (Pfeifer y col., 1981).

IV.4.3. Construcción de una enciclopedia génica de Halococcus sp. P-423.

El ADN total de Halococcus sp. P-423 se digirió con PstI o HindIII. Los vectores pKG2 (Kan^r) y pUM121 (Tc^rKan^r) se cortaron con idénticas enzimas, procediendo a la mezcla de ADN total digerido en proporción 8:1 con el del vector. Con la mezcla se procedió a una ligación con T4 DNA ligasa durante 12 horas a 16 °C. La mezcla resultante se usó para transformar E. coli K12 cepa D1210. Tras dos

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s

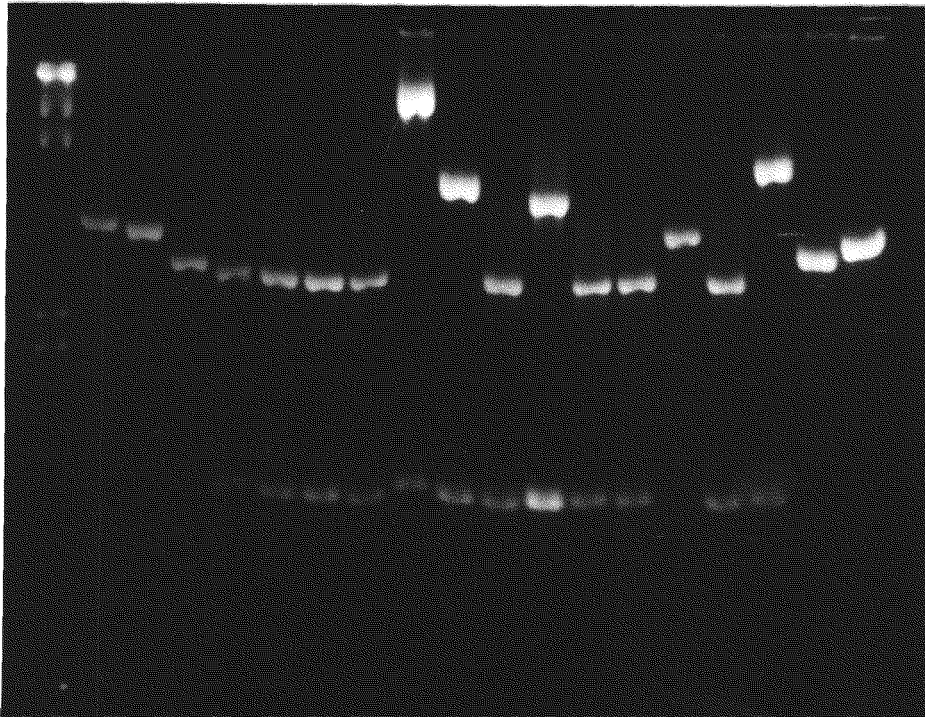


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los fragmentos de restricción de los clones 163-180 del banco en pUM121 digeridas con PstI (líneas b a s); línea a, ADN del fago λ digerido con PstI.

horas de crecimiento a 37 °C, las células se sembraron en medio LB adicionado de kanamicina (caso de usar pKG2), o tetraciclina (caso de usar pUM121), y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Se obtuvieron unos 20.000 transformantes para cada uno de los bancos de genes.

Unos 5.000 transformantes de cada uno de los bancos se analizaron extrayendo ADN por medio de minipreparación y cortando con HindIII, PstI, y la mezcla de ambas, con objeto de conocer el tamaño promedio de los insertos y conocer la posibilidad de solapamiento en los extremos terminales. Así, La figura 14 muestra el patrón de bandas PstI de los clones 163-180 del banco en pUM121.

Si asumimos para Halococcus sp. P-423 un tamaño genómico equivalente al de E. coli (4700 kb) (Daniels y Blattner, 1987) y tomando como válida la expresión de Clark y Carbon (1979):

$$P = 1 - (1-f)^N$$

en la que P es la probabilidad en tanto por uno de encontrar un fragmento de ADN dado en el banco; N, el número de recombinantes, y f, la fracción clonada del total del genoma. Para un tamaño medio de inserto de 6 kb, se tendrá una P = 0,99 cuando:

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1 - (6/4700)) = 3605$$

lo que indica que con sólo 3605 recombinantes se tendrá una certeza del 99 % de contener la totalidad del genoma. Nosotros utilizamos previamente 5.000 de cada uno de los bancos, superior a la cantidad necesaria.

De todos esos recombinantes, una vez analizados mediante electroforesis como se ha descrito anteriormente, se seleccionaron 700

(su tamaño de inserto osciló de 0,1 kb a 34,1 kb) de cada uno de los bancos con la característica de que el fragmento insertado debía contener al menos dos fragmentos al cortarlo con la combinación de enzimas de restricción PstI + HindIII, al objeto de poder realizar un posterior solapamiento entre los distintos clones. Estas 700 colonias se agruparon en dos placas de Petri de 132 cm de diámetro para utilizar un número reducido de filtros a la hora de hibridar.

El solapamiento entre los clones se realizó partiendo de un clon aleatorio, en nuestro caso el de mayor peso molecular, de 34,1 kb, que se corresponde con el clon 919 del banco en pUM121, y a partir de aquí se procedió a cortar con la enzima de restricción apropiada, bien PstI o HindIII según el plásmido en que se encuentre insertado el fragmento. Posteriormente, se procedió a realizar electroforesis de estas restricciones electroeluir los distintos fragmentos clonados (la figura 15 muestra un gel de los utilizados para proceder a la electroelución). Estos fragmentos se utilizaron después como sondas, obtenidas por el procedimiento de marcaje no radioactivo, para enfrentarse con el banco de genes contrario del que procedían los clones. Los miembros del banco se replicaron en placas de LB que se emplearon para preparar los filtros de nylon en los que el ADN de los distintos componentes quedaría unido. Las colonias que hibridaron habían sido previamente analizadas, pudiendo de esta manera descartar falsas hibridaciones o manchas en los filtros, al conocer con anterioridad el tamaño aproximado del fragmento de solapamiento común de los clones que hibridaron. A partir de estos nuevos clones se

procedió a realizar el proceso inverso enfrentándolos con el otro banco, y de un modo teórico se tendría una enciclopedia génica de Halococcus sp. P-423 (la figura 16 muestra un ejemplo de hibridación de colonias in situ).

El hecho de que algunas halobacterias, como Halobacterium halobium, presenten una gran variabilidad genética, con múltiples inserciones, deleciones y reagrupamientos en una fracción del cromosoma, la fracción FII (Pfeifer y col., 1981b), puede dificultar el mapeo por solapamiento tal como se ha propuesto en el caso de que algunas regiones del genoma de Halococcus sp. P-423 presente también inserciones y deleciones. Por otra parte, también es posible que insertos de elevado peso molecular queden fuera del banco de genes debido al hecho de emplear plásmidos, aunque éstos se han escogido para facilitar el mapeo posterior, puesto que el número de fragmentos es sensiblemente menor. La figura 17 muestra un ejemplo de los dos casos mencionados anteriormente, con la pérdida de una banda de 1,2 kb (plásmido 86) y un plásmido de elevado peso molecular (plásmido 87), en ambos casos provienen del banco clonado en el plásmido pKG2.

Con los datos obtenidos, ha sido posible mapear una región del genoma de Halococcus sp. P-423 de un tamaño molecular de unas 257 kb (Figura 18), y para la cual no se han detectado variaciones en los clones obtenidos por solapamiento, lo cual hace suponer que pertenece a una región constante del cromosoma bacteriano. Por otra parte, se han obtenido otros 36 trozos de solapamiento contiguo, cuyo tamaño abarca de 8 a 72 kb.

a b c d e f g h i j k l m n o p q r s

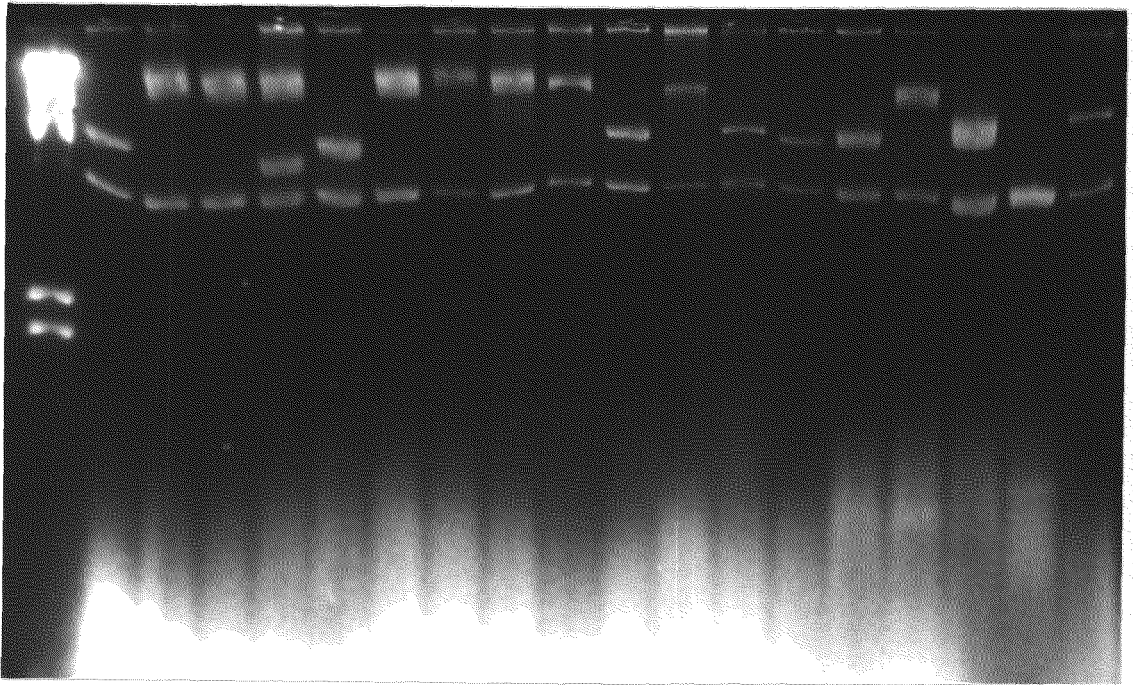


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los fragmentos de restricción de los clones 234-252 del banco en pUM121 digeridos con HindIII (líneas b a s), para su posterior electroelución; línea a, ADN del fago λ digerido con EsiI

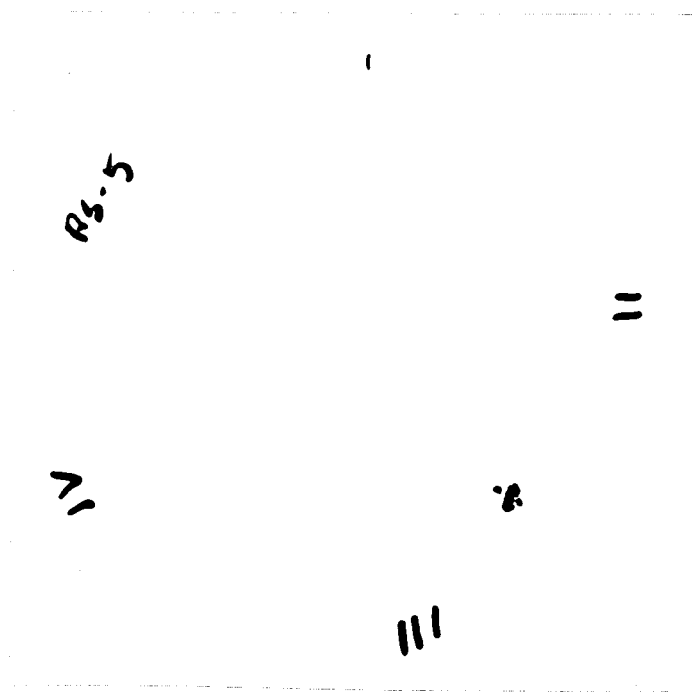


Figura 16. Ejemplo de hibridación de colonias in situ.

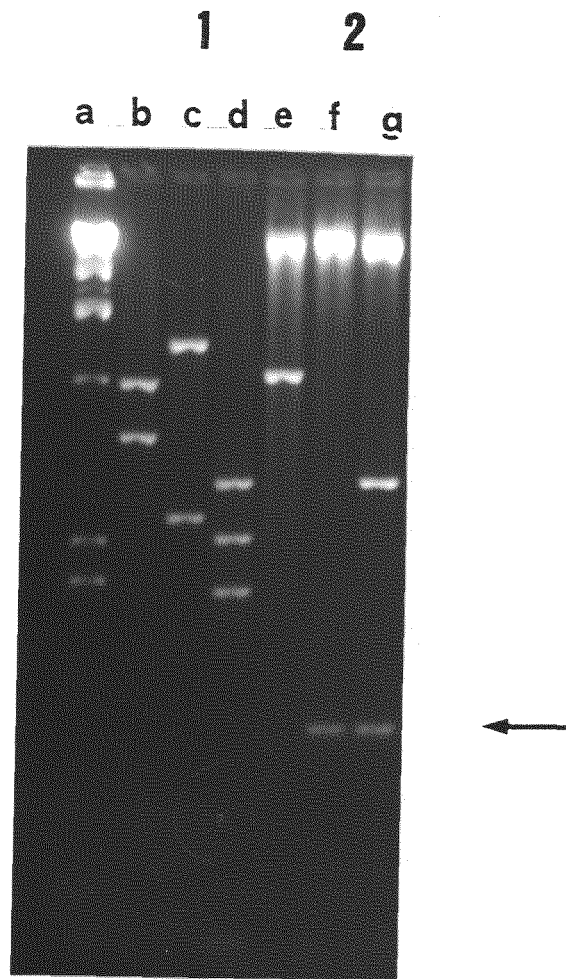
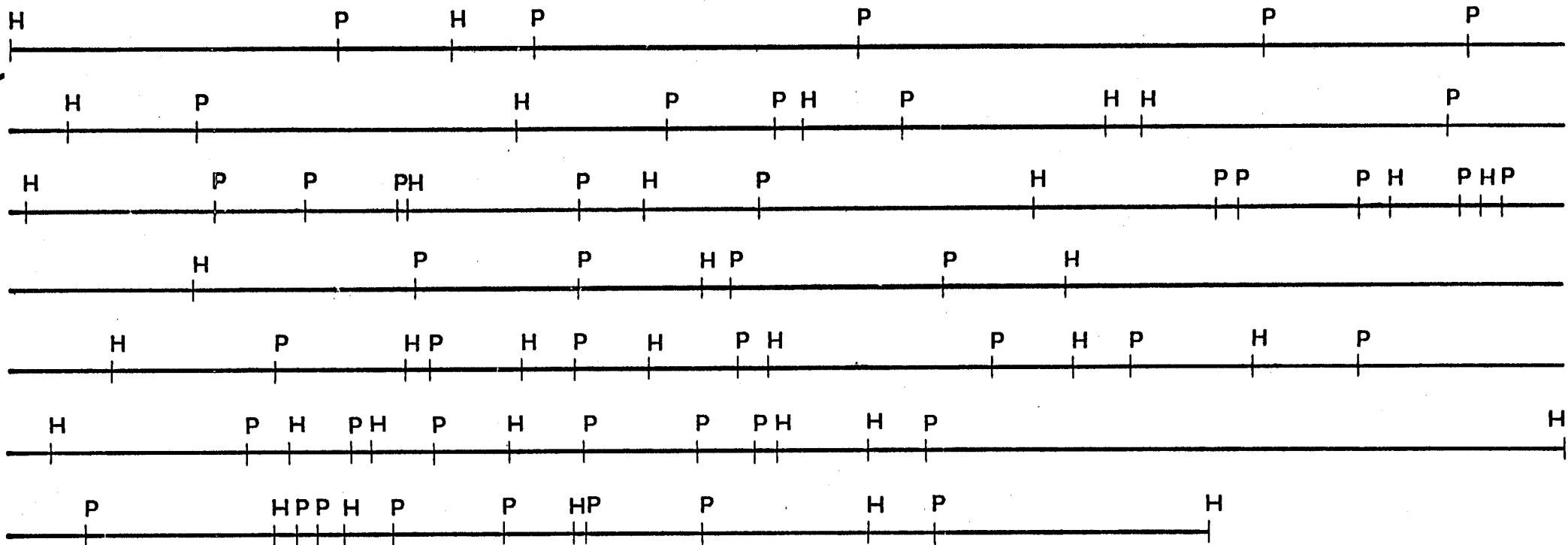


Figura 17. Digestiones de los plásmidos 86 (1) y 87 (2) con PstI (b; e), HindIII (c; f) y PstI + HindIII (d; g), mostrando la ausencia de la banda de 1.2 kb en el plásmido 86 y un elevado peso molecular en el 87. Ambos plásmidos proceden del banco clonado en el plásmido pKG2; línea a, ADN del fago λ digerido con PstI



4 Kb

Figura 18. Mapa físico de la región del genoma de *Halococcus* sp. P-423 estudiada en el presente trabajo.

IV.4.4. Hibridación con genes nif

El ADN total de H. morrhuae y Halococcus sp. P-423, se digirió con PstI, empleando como control positivo Rhizobium trifolii RS1051. El gel se transfirió a un filtro de nylon y se hibridó con la sonda pID1 (cedida por el Dr. Rodríguez-Quñones) (Banfalvi y col., 1981). Ninguna de las cepas de Halococcus mostró hibridación, por tanto no existen secuencias homólogas a los genes nifHDK para estas cepas.

IV.4.5. Hibridación con el gen de la bacteriorrodopsina.

El ADN total de diferentes cepas de Halococcus se digirió con ClaI y EcoRI, empleando como control positivo Halobacterium halobium SB-3. El gel se transfirió a un filtro de nylon y se hibridó con el fragmento de 5,1 kb de Halobacterium halobium R1 (cedido por la Dra. Pfeifer) (Betlach y col., 1983), detectándose una banda de hibridación en las cepas de Halococcus. Para confirmar o descartar la presencia de secuencias homólogas al gen de la bacteriorrodopsina, se utilizó como sonda el fragmento AvaI de 429 bp que comprende gran parte de éste gen, y que se obtuvo mediante digestión del fragmento de 5,1 kb con AvaI y posterior electroelución del fragmento indicado. No se detectó hibridación, ni aún con largas exposiciones, descartándose la presencia de secuencias homólogas a este gen en el género Halococcus.

IV.4.6. Hibridación con elementos de inserción.

Se realizó igual que en los casos anteriores, utilizando sondas cedidas por la Dra. Pfeifer, correspondientes a los elementos de inserción ISH 26, ISH 27, ISH 2 y ISH 1.8 (Pfeifer, 1988). No se detectaron secuencias homólogas en ninguna de las cepas del género Halococcus estudiadas.

IV.4.7. Hibridación con ARN 7S.

El ADN total de diferentes cepas de Halococcus se digirió con PstI, precediendo continuación como en los casos anteriores, utilizando una sonda cedida por la Dra. Pfeifer, correspondiente al ARN 7S de Halobacterium halobium cepa R1, detectándose en este caso al hibridar con ADN total digerido con PstI, dos bandas de hibridación en el caso de la cepa P-423 y una banda de hibridación en el caso de la cepa tipo Halococcus morrhuae CCM-537 (Figura 19).

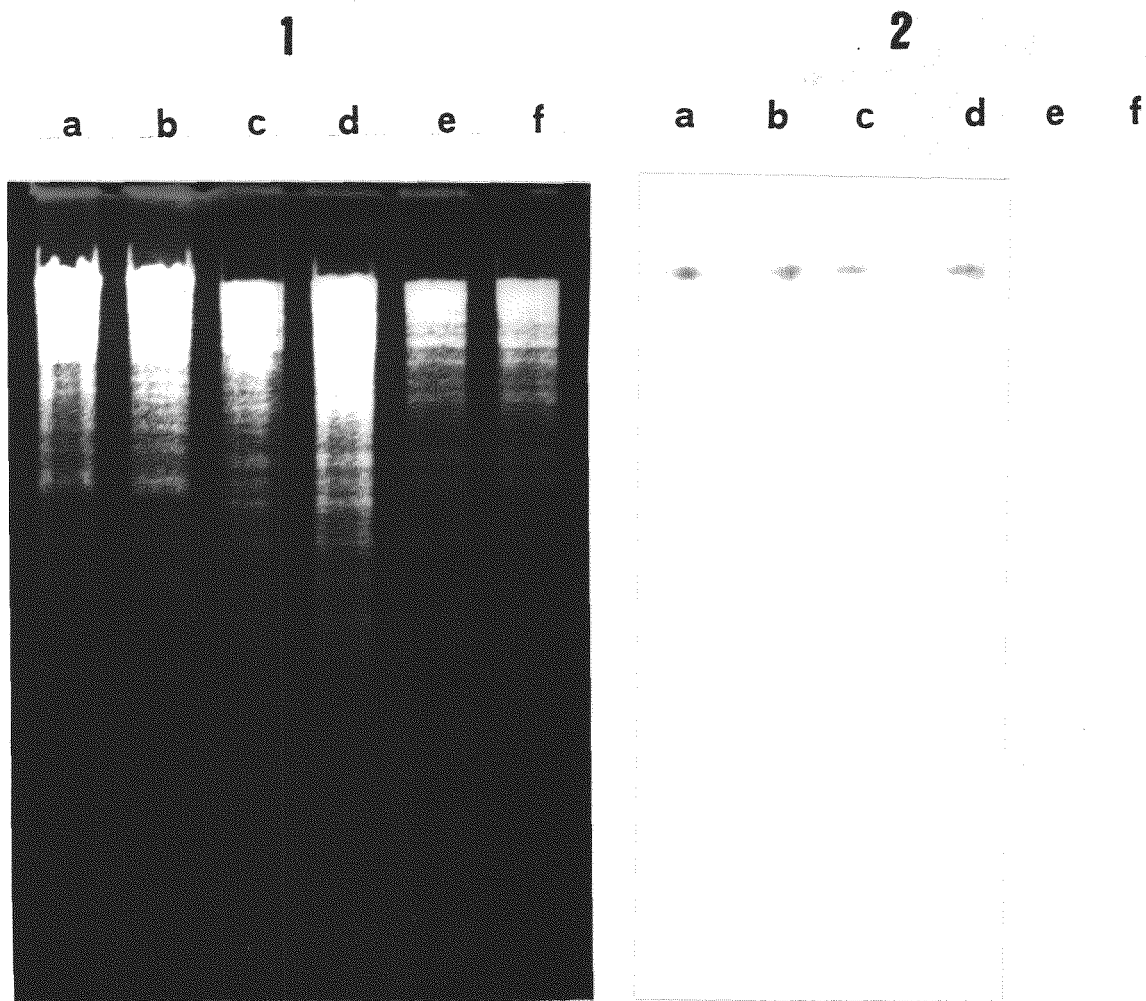


Figura 19. (1) Electroforesis cepas de Halococcus digeridas con PstI. (2) Hibridación de las cepas anteriores con ARN 7S marcado con ^{32}P . En ambos casos el orden es el siguiente: (a) y (b) Halococcus morrhuae CCM 537^T; (c) y (d) Halococcus sp. N-207; (e) y (f) Halococcus sp. P-423.

V. DISCUSSION

Los cocos halófilos extremos no alcalófilos han sido considerados tradicionalmente como un grupo homogéneo de bacterias, incluidas dentro de una única especie Halococcus morrhuae (Kocur y Hodgkiss, 1973; Ramón y col., 1977; Larsen, 1989). Sin embargo, el número de cepas estudiadas ha sido escaso, debido a que el aislamiento de cocos halófilos extremos de ambientes hipersalinos es usualmente más difícil que en el caso de los bacilos, ya que se encuentran en menor proporción en tales ambientes naturales (Rodríguez-Valera y col., 1985; Márquez y col., 1987; Montero y col., 1988). Colwell y col. (1979) realizaron un estudio taxonómico de 95 bacterias halófilas, incluyendo 14 cocos halófilos extremos y concluyeron que existía una considerable variabilidad entre estos microorganismos, aunque no la suficiente para justificar diferencias a nivel de especies. Javor (1984) encontró una considerable variabilidad nutricional al estudiar 3 cocos halófilos extremos aislados en Baja California y demostró que estos microorganismos eran capaces de utilizar un amplio rango de sustratos.

Recientemente, hemos aislado en nuestro laboratorio 96 cocos halófilos extremos, los cuales se han caracterizado mediante pruebas fenotípicas y se han analizado mediante taxonomía numérica, agrupándose finalmente en cuatro fenones (Montero y col., 1988).

Las cepas del fenón A se caracterizan porque utilizan un escaso número de carbohidratos, alcoholes o ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía. En base a éstas y a otras características

fenotípicas, las 87 cepas incluidas en este fenón se identificaron como miembros de la única especie descrita dentro del género Halococcus, H. morrhuae.

Las cepas del fenón B eran capaces de utilizar un mayor número de sustratos que las pertenecientes al fenón A como fuente de carbono y energía, particularmente con respecto a alcoholes. Las cepas del fenón C mostraron también una mayor versatilidad nutricional que las del fenón A, diferenciándose de las del fenón B en que mostraban una menor capacidad de utilizar alcoholes, y una mayor capacidad de metabolizar otros compuestos. Las cepas de los fenones B y C se asignaron al género Halococcus.

Las cepas incluidas en el fenón D mostraron una serie de características fenotípicas que diferían considerablemente de los otros fenones, especialmente una versatilidad metabólica elevada, y su capacidad para producir ácidos a partir de la glucosa (Montero y col., 1988).

En el presente trabajo el objetivo inicial fue el estudio en profundidad de las cepas del fenón D, completando el estudio fenotípico mediante la realización de pruebas fisiológicas, bioquímicas y nutricionales, así como de resistencia a antibióticos y metales pesados y su ultraestructura. Asimismo, se estudió a nivel molecular la cepa P-423, elegida como representante del fenón D.

La caracterización fenotípica de las cepas pertenecientes al fenón D incluyó la realización de varias pruebas fisiológicas: crecimiento a distintas concentraciones salinas, temperatura y pH. En todos los

casos se observó un comportamiento muy homogéneo de las 4 cepas incluídas en el fenón D; dichos resultados son similares a los obtenidos para *H. morrhuae* CCM 537^r y las cepas *Halococcus* sp. N-207, *Halococcus* sp. Q-26 y *Halococcus* sp. P-1140, representantes de los fenones A, B y C, respectivamente. El margen de crecimiento osciló desde el 15 % de sales totales a saturación, con un rango de pH de 6,1 a 7,7 y un rango de temperaturas de 28 °C a 37 °C, estos dos últimos parámetros se estudiaron a una concentración salina del 25 %. Estos resultados se encuentran dentro de los descritos en la literatura para cepas del género *Halococcus* (Juez, 1988; Larsen, 1989).

Las cepas del fenón D han mostrado unos requerimientos de Mg²⁺ mucho más elevados de lo habitual en los cocos halófilos extremos (200 mM frente a 5 mM) y que los requerimientos para el género *Haloferax* (de 10 mM a 40 mM), *Haloarcula* (5 mM), *Natronobacterium* (0,1-2,0 mM), *Natronococcus* (0,1-2,0 mM) y que la mayoría de las especies del género *Halobacterium* (5 mM). Sin embargo, presentaron unos requerimientos de magnitud similar a los encontrados en especies originalmente aisladas del Mar Muerto (el cual presenta una concentración mayor de magnesio que los ambientes talasosalinos) tales como *H. volcanii* (75 mM) y *H. sodomense* (600 mM) (Juez, 1988).

Dentro de las pruebas bioquímicas estudiadas con objeto de completar las previamente descritas (Montero y col., 1988), la única diferencia encontrada entre las cepas pertenecientes al fenón D y el resto de los cocos halófilos extremos ha sido la no utilización del fumarato como aceptor final de los electrones por parte de las cepas

del fenón D, mientras que las demás cepas sí han sido capaces de crecer en anaerobiosis con este sustrato. En la tabla 22 se incluyen asimismo otras características diferenciales existentes entre las cepas del fenón D y H. morrhuae.

Los estudios de tolerancia a metales pesados de cepas de Halococcus han puesto de manifiesto unos niveles de tolerancia muy similares entre ellas, a excepción de Halococcus morrhuae cepa Delft, la cual ha mostrado los niveles más altos de tolerancia al plomo y a la plata, y los menores al arsenato. Todas las otras cepas de colección han mostrado respuestas similares frente al cromo, cobre, mercurio, níquel y zinc. Sin embargo, se ha detectado una mayor toxicidad al plomo y a la plata en H. morrhuae CCM 2226 y Halococcus sp. Q-26. Las cepas de colección se han mostrado sensibles al cobalto, mercurio, plata y zinc y la mayoría de ellas al arsenato y cadmio así como relativamente tolerantes al cromo, cobre y níquel, mientras que la respuesta al plomo ha sido muy heterogénea (Nieto y col., 1989b).

En el presente estudio, las cepas del fenón D aparecen tolerantes al cromo, cadmio, cobre y níquel, mientras que las correspondientes a los fenones A, B y C, junto con la cepa de referencia lo fueron al cromo, cobre, níquel y plomo. De esto se deduce que la única diferencia de las cepas del fenón D con respecto al resto de los cocos halófilos extremos sea su tolerancia al cadmio, aunque se ha descrito que los niveles individuales de susceptibilidad de las cepas de cocos halófilos extremos pueden variar dentro de un amplio margen de

Tabla 22. Características diferenciales de *Halococcus morrhuae* y las 4 cepas incluidas en el fenón D.

Característica	<i>H. morrhuae</i> ¹	Fenón D ¹ (4 cepas)
Producción de ácidos de glucosa	-	+
Hidrólisis de Tween 80	+	-
Respiración en fumarato	+	-
Utilización de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y energía:		
Carbohidratos:		
L-arabinosa	-	+
Amigdalina	-	+
Lactosa	-	+
D-salicina	-	+
Alcoholes:		
Adonitol	-	+
Eritritol	-	+
Etanol	-	+
Propanol	-	+
Sorbitol	-	+
Ácidos carboxílicos:		
cis-aconitato	-	+
D-gluconato	-	+
Hipurato	-	+
DL-lactato	-	+
Propionato	-	+
Quinato	-	+
Aminoácidos:		
L-metionina	-	+

¹Ver Montero y col. (1988).

concentraciones de arsenato, cadmio y cobalto y un 30 % de ellas han mostrado tolerancia al cadmio (Nieto y col., 1989b).

Para la interpretación de los resultados anteriores debe tenerse en cuenta que la composición del medio, tanto de los distintos nutrientes como la concentración salina, afecta en gran medida a la toxicidad a metales pesados por parte de los microorganismos (Babich y Stotzky, 1980). Así, algunos componentes de los medios de cultivo puede unirse a los metales pesados (Ramamoorthy y Kushner, 1975), y de esta manera reducir la concentración de ión libre (Gadd y Griffiths, 1978; Babich y Stotzky, 1980) y provocar una disminución de la toxicidad a metales pesados en los microorganismos. No obstante, en nuestro estudio y con objeto de comparar los resultados obtenidos en cocos halófilos extremos con los obtenidos previamente por Nieto y col. (1987) en bacilos halófilos extremos se utilizó el medio de cultivo indicado por dichos autores.

En otros estudios realizados con eubacterias halófilas (García y col., 1987; Nieto y col., 1989a) y arqueobacterias (Nieto y col., 1987; Nieto y col., 1989b), se han observado altos niveles de toxicidad de la plata, mercurio y zinc. Así, la sensibilidad a estos metales pesados, parece ser un hecho común a las bacterias halófilas, especialmente si consideramos que la toxicidad del Zn se potencia en presencia de altas concentraciones de NaCl, como resultado de la formación de complejos aniónicos Zn-Cl, los cuales eran más tóxicos que el catión de zinc (Babich y Stotzky, 1978). La sensibilidad de las arqueobacterias halófilas al mercurio se ha usado como un carácter

taxonómico (Colwell y col., 1979), y de hecho el mercurio es el metal al que los cocos halófilos extremos han mostrado una menor tolerancia (Nieto y col., 1989b). La sensibilidad más elevada de las cepas del fenómeno D también se ha presentado en el caso del mercurio.

Las cepas del fenómeno D han mostrado una alta tolerancia frente al cromo y cobre, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por Nieto y col. (1987; 1989b), aunque estas tolerancias pueden atribuirse a la unión de estos metales a algún componente del medio (Babich y Stotzky, 1980) o a una acumulación en la membrana celular (Tornabene y Edwards, 1972). La tolerancia al cobre detectada tanto en las formas bacilares como en los cocos halófilos extremos, no se ha detectado en eubacterias halófilas, con lo cual aparece como una característica típica de las arqueobacterias halófilas, aunque esta tolerancia podría ser debida a una mayor concentración salina en el medio.

Los cocos halófilos extremos han mostrado mayor tolerancia al arsenato, cadmio y níquel que los bacilos halófilos extremos (Nieto y col., 1989b) y en el caso de las cepas incluidas en el fenómeno D, todas se mostraron tolerantes al cadmio. Esta mayor tolerancia de las formas cocoides puede ser debida a la diferente naturaleza de las envueltas celulares de ambos tipos bacterianos (Kandler y König, 1985).

Nieto y col. (1989b) detectaron tolerancias a múltiples metales pesados en los cocos halófilos extremos estudiados, detectando con mayor frecuencia (35 %), cepas con tolerancia a cuatro diferentes metales, mientras que el 19.4 % de las cepas fueron tolerantes a seis

metales pesados. 12 cepas fueron tolerantes a cinco (15.6 %), 11 fueron tolerantes a tres (14.3 %), y otras 11 fueron tolerantes a dos (14.3 %), y sólo una cepa fue tolerante a siete metales pesados. Todas las cepas del fenón D, sin embargo, han mostrado tolerancia múltiple a cuatro únicos metales pesados: cromo, cadmio, cobre y níquel. Los bacilos halófilos extremos también habían mostrado niveles similares de tolerancia a los 10 metales pesados ensayados (Nieto y col., 1987). Esta homogeneidad de respuesta observada puede reflejar mecanismos de resistencia a determinados metales pesados que se han adquirido y transferido de unas especies a otras debido a la similitud de características de los ambientes hipersalinos donde se encuentran estos microorganismos.

Los estudios de sensibilidad a antibióticos realizados en cepas pertenecientes al género Halococcus son muy escasos. Colwell y col. (1979), utilizando el método de difusión en agar, estudiaron 42 cocos halófilos extremos; dichos autores mostraron que un 33,3 % de estos microorganismos eran sensibles a la tetraciclina y un 25 % a la polimixina B, mientras que ninguno era sensible a la eritromicina ni a la penicilina. Hilpert y col. (1981) estudiaron la susceptibilidad a 30 antibióticos, utilizando el método de difusión en agar, de H. morrhuae CCM 537, H. morrhuae CCM 859, H. morrhuae CCM 2226 y H. morrhuae CCM 2526, encontrando que eran resistentes a la bacitracina, gardimicina, virginamicina, monensina y lasalocida, mientras que frente a la rifampicina sólo fueron resistentes H. morrhuae CCM 2226 y H. morrhuae CCM 2526. Bonelo y col. (1984) comprobaron mediante el

método de dilución en tubo que *H. morrhuae*, al igual que el resto de las arqueobacterias, no es sensible a un gran número de antibióticos, en especial a inhibidores de la pared celular y síntesis de proteínas; encontraron que la cepa por ellos estudiada, *H. morrhuae* CCM 537, era inhibida por los siguientes antibióticos: bacitracina (94 µg/ml), rifampicina (180 µg/ml), novobiocina (24 µg/ml), neomicina (1500 µg/ml), cloranfenicol (750 µg/ml), eritromicina (180 µg/ml) y haloquinona (94 µg/ml).

En nuestro estudio todos los cocos estudiados fueron resistentes a la bacitracina (salvo el representante del fenón B, la cepa Q-26) y todas se mostraron resistentes al cloranfenicol, ácido nalidíxico, neomicina, novobiocina, penicilina G y rifampicina. Los resultados obtenidos frente a la anisomicina variaron de unas cepas a otras, aunque a la concentración de 50 µg/ml sólo fue sensible la cepa P-423, mientras que todas las cepas fueron inhibidas a una concentración de 1000 µg/ml.

En todos estos estudios se ha observado que las cepas pertenecientes al género *Halococcus*, al igual que el resto de las halobacterias, son sensibles a la bacitracina, lo cual probablemente sea debido a que actúa en los procesos iniciales de la síntesis de pirofosfato de poliisoprenol (Moldoveanu y Kates, 1989).

Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Bonelo y col. (1984) en la resistencia a rifampicina, novobiocina, neomicina y cloranfenicol, y estas diferencias pueden ser debidas al método empleado por nosotros (difusión en agar frente a dilución en medio

líquido) y a que en nuestro caso los discos empleados eran de 30 µg/ml, mientras que las concentraciones a las que era sensible *H. morrhuae* CCM 537 eran superiores a estos 30 µg/ml, excepto en el caso de la novobiocina. De hecho, Hilpert y col. (1981) mostraron que la mitad de las cepas pertenecientes al género *Halococcus* estudiadas eran resistentes a la rifampicina, empleando la misma técnica empleada por nosotros, y en el caso de la neomicina, la sensibilidad sólo se observa a concentraciones muy elevadas (1500 µg/ml). Las halobacterias en general presentan una alta resistencia a los aminoglucósidos, aunque este efecto se debe en mayor grado a las altas concentraciones de sodio y magnesio en el medio que a una resistencia a nivel de ribosomas Hilpert, 1981; Bonelo, 1984; Hummel y Bock, 1987).

Las arqueobacterias halófilas poseen lípidos diéter característicos, habiendo sido utilizados como criterio taxonómico en diversos estudios (Tindall y col., 1984; Torreblanca y col., 1986). Ross y Grant (1985) habían descrito en *H. morrhuae* NCMB 761 la presencia de los siguientes lípidos polares: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerofosfato (PGP), un diglicosilgliceroldiéter sulfatado (S-DGD) y trazas de un triglicosilgliceroldiéter (TGD-1), mientras que Tindall y col. (1984) en *H. morrhuae* NCMB 787 no habían encontrado S-DGD, pero sí un glicosilgliceroldiéter, encontrando asimismo PG, PGP y TGD-1. Posteriormente, debido a la descripción de diferentes triglicosilgliceroldiéter, el lípido conocido como TGD-1 cambió a TGD-2 y el glicosilgliceroldiéter se denominó S-DGD-1 (Larsen, 1989).

El análisis de los lípidos polares de la cepa P-423 (Tabla 9), examinados por cromatografía en capa fina, dio lugar a un componente mayoritario, el difitanilgliceroleter (DPE) análogo del PGP, junto con los DPE análogos de PG, ácido fosfatídico (PA) y un diglicosilgliceroldiéter sulfatado (S-DGD) como componente minoritario. Los fosfolípidos PG y PGP mostraron dobles manchas en los cromatogramas en capa fina revelados con el solvente A (Tabla 9), lo que se ha atribuido a la presencia de grupos $C_{20}-C_{20}$ y $C_{20}-C_{25}$ de estos componentes, tal como se ha observado en otras cepas de Halococcus, en concreto en H. morrhuae NCMB 787 (Tindall y col., 1984). Además, se han detectado dos lípidos no identificados: el fosfolípido X_2 y el fosfoglicolípido X_1 , trazas de dos glicolípidos no identificados en los cuales actualmente se está trabajando para proceder a su identificación, pero no se ha detectado fosfatidilglicerosulfato, el cual tampoco fue detectado en H. morrhuae NCMB 787 (Tindall y col., 1984). La principal diferencia con respecto a los estudios anteriores se presenta en la ausencia de TGD-1 o TGD-2 (Larsen, 1989).

La escasa información existente a nivel genético de los cocos halófilos extremos, puede atribuirse al hecho de que Halococcus posee una de las cubiertas celulares más resistente conocida entre las bacterias, siendo muy difíciles de lisar (Schleifer y col., 1982). Este hecho, hizo necesario el diseño de un nuevo método de lisis, que permitiese estudiar mejor el contenido genómico de los cocos halófilos extremos, así como la presencia de elementos extracromosómicos, y

facilitar posteriores estudios de hibridación. De ahí que se probasen diferentes métodos de lisis celular, incluyendo lisozima, sarcosil, SDS, Triton-X-100 o desoxicolato sódico, así como otros métodos descritos para halobacterias (Pfeifer y col., 1981a) o para otras cepas de Halococcus (Kocur y Bohacek, 1972; Leffers y Garrett, 1984), no pudiendo obtener ADN con ninguno de los procedimientos señalados.

La adición de glicina a los medios de cultivo produce una disminución de la rigidez de la pared celular (Owen y Pitcher, 1985). De acuerdo con este hecho, nosotros añadimos glicina a los medios de cultivo para comprobar si facilitaba la extracción y purificación de ADN de estos microorganismos. Al usar este método de cultivo celular hemos sido capaces de aislar ADN total de cepas del género Halococcus, y hemos obtenido un contenido en G+C, medido a partir del valor de T_m , en Halococcus sp. P-423 de un 59,5 mol %, el valor más bajo encontrado entre los diferentes cocos halófilos extremos estudiados, los cuales tienen valores que oscilan entre el 61-66 mol % (Kocur y Bohacek, 1972). El valor obtenido de G+C está dentro del rango obtenido en los bacilos halófilos extremos (57-72 mol %) (Juez, 1988); asimismo, es similar al encontrado en Natronococcus occultus (valor medio 59 mol %) (Grant, 1989).

Utilizando el método de lisis anteriormente descrito se ha obtenido ADN plasmídico de cepas del género Halococcus, a pesar de que hasta la fecha no se había descrito la presencia de plásmidos en Halococcus morrhuae (Ross y Grant, 1985; Pfeifer, 1988). En la cepa tipo H. morrhuae CCM 537, hemos detectado dos plásmidos pHM1 y pHM2,

con unos pesos moleculares de 48 y 6 kb, respectivamente. El plásmido pHM2 se ha estudiado en detenimiento por su posible potencial uso en el desarrollo de futuros vectores de clonación, tales como los actualmente inicializados con el plásmido pHV2 de *H. volcanii* NCMB 2012 (Charlebois y col., 1987; Cline y col., 1989a; 1989b).

Al analizar el plásmido pHM2 se detectaron dos fragmentos EcoRI, los cuales se introdujeron en el sitio EcoRI del plásmido vector pUM121. Estos plásmidos recombinantes fueron estudiados mediante análisis de restricción, deduciéndose a partir de ellos el mapa físico completo del plásmido pHM2.

El plásmido pHM2 se ha usado como sonda marcada con ^{32}P frente a ADN total aislado de otras cepas del género *Halococcus*, incluyendo entre ellas el representante del fenón D, P-423, detectándose este plásmido en otras cepas de *Halococcus*, incluidas en el mismo fenón A que la cepa tipo (*Halococcus* sp. N-207), pero no en la del fenón D, así como tampoco se ha detectado hibridación con regiones de ADN cromosómico de esta misma cepa P-423. El representante del fenón D presenta asimismo unos fragmentos de restricción totalmente diferentes de las otras cepas, factores que apoyan su separación en una nueva entidad taxonómica.

El tamaño del plásmido pHM2 (6 kb) es similar al de otros plásmidos de halobacterias, como pHT2 de *H. trapanicum* CHB-83 y pHV2 de *H. volcanii* NCMB 2012 (Pfeifer y col., 1981a), de ahí que se haya estudiado también la posible homología del pHM2 con otros plásmidos halobacterianos, tales como los descritos en *H. trapanicum* CHB-83, *H.*

volcanii NCMB 2012, H. halobium NRC 34040 y Halobacterium sp. cepa SB3 (Pfeifer y col., 1981a; Weidinger y col., 1982; Hackett y DasSarma, 1989). Se ha detectado hibridación con el plásmido pHT1 de Halobacterium trapanicum CHB-83, pero no se ha detectado hibridación con pHT2 de la misma cepa a pesar de la similitud en sus tamaños moleculares; sin embargo, la existencia de una fuerte homología entre los dos plásmidos citados indica la posibilidad de intercambio genético en este grupo arqueobacteriano.

Los ARNs ribosómicos son buenos marcadores para la investigación de relaciones filogenéticas (Noller y Woese, 1981). Los métodos de hibridación más rápidos para detectar relaciones filogenéticas se basan en utilizar ARN ribosómico, ya que produce resultados comparables a los métodos de secuenciación y son fácilmente aplicables a estudios taxonómicos, requiriendo solamente pequeñas cantidades de células para el aislamiento de ARNr y ADN, los cuales pueden ser conservadas para su empleo en sucesivos experimentos de hibridación (Schlotterbeck, 1984). Asimismo, estos métodos requieren sólo el uso de bajos niveles de radioactividad para el marcaje *in vitro* de los fragmentos de ARN y producen unos resultados cuantitativos a diferencia de los solamente cualitativos obtenidos con otros métodos inmunológicos. Por último, tienen un rango de aplicación mucho mayor que las hibridaciones ADN-ADN (Klenk y col., 1986). Sin embargo, estos métodos tienen el inconveniente de producir elevados errores en el cálculo de las distancias filogenéticas en caso de presentarse

pequeños errores en las homologías de hibridación (Woese y Olsen, 1986).

Para realizar estos estudios en el presente trabajo, los ARNs ribosómicos marcados con ^{32}P de 11 cepas de arqueobacterias, incluyendo la cepa tipo del género Halococcus, H. morrhuae CCM 537 y la representante del fenón D, P-423, se hibridaron con los ADNs de estos microorganismos, determinándose la homología de hibridación de acuerdo con las ecuaciones descritas por Klenk y col. (1986); en este estudio se determinaron 43 de las 55 distancias existentes entre los microorganismos, siendo más que suficientes para la construcción de un árbol filogenético. La Tabla 21 muestra las homologías de hibridación y las distancias de estas homologías calculadas con las ecuaciones anteriormente descritas. Los valores de distancia filogenética usados en esta misma tabla se usaron para la construcción de un árbol filogenético, representado en la figura 9. El árbol muestra dos grupos bien diferenciados: uno que incluyen a las especies pertenecientes a al nuevo género Haloarcula y otro para las del género Haloferax (Ross y Grant, 1985; Torreblanca y col., 1986; Gutiérrez y col., 1989) y ya separadas aparecen las restantes cepas.

Los estudios de hibridación ADN-ARNr han mostrado una homología de hibridación entre H. morrhuae y Halococcus sp. P-423 del 46,97 %, lo cual corresponde a una distancia filogenética de 10,9 en la escala de distancias filogenéticas de Klenk y col. (1986). Esta distancia filogenética es mucho mayor que la existente entre la mayoría de los miembros del género Halobacterium, tal como se ha mostrado al realizar

los experimentos de hibridación ADN-ARNr. Estos datos apoyan la separación al menos a nivel de especie de los representantes de cada uno de estos grupos.

Como resultado de los anteriores estudios, las cepas del fenón D se han incluido en el género Halococcus ya que mostraron un requerimiento específico de NaCl para su crecimiento (al menos 150 g/l), y presentaban características fenotípicas y lípidos polares comunes con aquellos existentes en el género Halococcus, al tiempo que tenían un contenido de G + C, dentro del rango admitido para el género Halococcus (Larsen, 1989). Sin embargo, parece apropiado considerar que las cepas del fenón D representan una nueva especie para la cual proponemos el nombre de Halococcus saccharolyticus, cuya descripción se expone a continuación:

sac'cha.ro.ly'ti.cus. Gr. n. sacchar azúcar; Gr. adj. lytikos lisis; N. L., adj. neut. saccharolyticus, produce lisis de azúcar.

Cocos Gram-negativos, inmóviles, aerobios estrictos, no formadores de esporas, de 0,8 a 1,5 μm de diámetro, presentándose en parejas, tetradas, sarcinas o agrupaciones irregulares.

Las colonias en medio HM que presenta una concentración final de sales del 25 % (Ventosa y col., 1982) son de tamaño mediano (aproximadamente 2 mm de diámetro después de 2 semanas de incubación a 37 °C), son circulares, convexas, con una pigmentación rojo-anaranjada, conteniendo C₅₀-bacteriorruberas. En medio líquido crecen sin formar velo superficial, produciendo una turbidez uniforme. Crecen de 28 a 42 °C (crecimiento óptimo a 37-40 °C), pH 6,0 a 8,0.

Crecen entre un 15 % de sales totales y saturación, con un óptimo al 25 % de sales a 37 °C. Requieren al menos un 4 % de $MgCl_2$.

Son quimioorganotrofos, con un metabolismo estrictamente respiratorio. Producen catalasa y oxidasa. Producen ácidos a partir de D-glucosa, sin embargo no son producidos a partir de lactosa, D-manitol, ni sacarosa. Hidrolizan almidón, caseína, esculina, tirosina y Tween 80. La hidrólisis de la gelatina es variable. Reducen el selenito. No producen ureasa ni fenilalanina desaminasa.

La prueba del indol es positiva. El H_2S se produce a partir de cisteína, pero no de tiosulfato. Reducen los nitratos a nitritos, aunque la reducción de los nitritos es variable.

Los siguientes compuestos son utilizados como única fuente de carbono y energía: N-acetilglucosamina, amigdalina, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, lactosa, maltosa, D-manosa, D-salicina, trehalosa, adonitol, etanol, eritritol, DL-glicerol, myo-inositol, D-manitol, propanol, D-sorbitol, acetato, cis-aconitato, δ -aminovalerato, butirato, fumarato, D-gluconato, D-glucuronato, hipurato, DL-lactato, DL-malato, piruvato, propionato, quinato, D-sacarato o succinato.

Los siguientes compuestos no son utilizados como única fuente de carbono y energía: esculina, L-arabinosa, D-galactosamina, D-glucosamina, inulina, D-melibiosa, D-rafinosa, L-ramnosa, D-ribosa, sacarosa, D-xilosa, dulcitol, aminobutirato, benzoato, caprilato, p-hidroxibenzoato, malonato, oxalato, salicilato, suberato o D-tartrato.

Los siguientes compuestos son utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía: L-alanina, L-arginina, L-asparragina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-prolina, DL-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptófano o L-valina.

Los siguientes compuestos no son utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía: alantoína, L-aspártico, creatinina, etionina, glicina, putrescina o sarcosina.

Son susceptibles a la anisomicina y bacitracina. No son susceptibles al cloranfenicol, ácido nalidíxico, neomicina, novobiocina, penicilina G, rifampicina o estreptomina.

Tolerantes al cadmio, cobre, cromo y níquel; sensible a arsénico, cobalto, mercurio, plata, plomo y zinc

Los principales lípidos polares son 2,3-diisoprenil glicerol análogos del fosfatidilglicerofosfato (cadenas C₂₀-C₂₀ y C₂₀-C₂₅) y del fosfatidilglicerol (cadenas C₂₀-C₂₀ y C₂₀-C₂₅); como componentes minoritarios se encuentran un diglicosilgliceroldieter sulfatado, ácido fosfatídico, dos fosfolípidos no identificados y dos fosfoglicolípidos no identificados; no se ha detectado fosfatidilglicerosulfato. La composición lipídica es similar a la encontrada en otras cepas de Halococcus (Ross y Grant, 1985), excepto por la ausencia de TGD-2 en esta nueva especie.

Aislado a partir de salinas solares.

La composición de bases del ADN es 59,5 mol % G + C (T_m).

La cepa tipo es la cepa P-423 depositada en la American Type Culture Collection (ATCC 49257), Czechoslovak Collection of Microorganisms (CCM 4147) y Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (5350). Las características de esta cepa coinciden con las descritas para la especie; esta cepa hidroliza la gelatina.

La mayoría de los estudios referentes a la organización genómica de las halobacterias se han realizado en Halobacterium halobium y especies relacionadas, observando la presencia de un gran número de secuencias repetidas y frecuentes alteraciones en el genoma de estas bacterias, probablemente catalizadas a través de elementos transponibles, los cuales se encuentran en múltiples copias en algunas regiones del genoma, en especial en la fracción FII de Halobacterium halobium NRC 817 (Sapienza y Doolittle, 1982; Pfeifer y Betlach, 1985; Pfeifer, 1988). Charlebois y col. (1989) han iniciado un procedimiento sistemático de mapeo genómico de halobacterias.

Nosotros en el presente trabajo hemos procedido a estudiar la organización genómica de esta nueva especie del género Halococcus, H. saccharolyticus, mediante la construcción de dos bancos de genes realizados en diferentes plásmidos y con dos enzimas de restricción distintas, y posterior solapamiento mediante hibridación entre ellos.

Para la realización del presente trabajo, y debido a la carencia de un punto conocido de iniciación del mapeo genómico, hemos elegido el inserto en un plásmido aleatorio, con objeto de construir una enciclopedia genómica de esta cepa.

Asumiendo un tamaño genómico de 4.100 kb para las halobacterias (Moore y McCarthy, 1969), hemos mapeado un fragmento de 257 kb, lo que constituye aproximadamente un 6 % del total del genoma de Halococcus saccharolyticus P-423. Nuestros resultados sugieren un cromosoma estable, al menos en los fragmentos que se han podido solapar, ya que obtenemos una secuencia continua de clones en la zona mapeada y en ningún caso se ha detectado dentro de este fragmento hibridación con dos o más clones diferentes. Se han detectado en numerosos casos pérdidas de fragmentos en los plásmidos originales, los cuales pueden estar causados bien por reordenamiento en el componente FII de esta bacteria o bien por una extensa homología con los plásmidos vectores. Este segundo factor por sí solo no puede explicar que cerca del 10 % del total de los clones de ambas genotecas hayan sufrido un proceso de reordenamiento, ni que se hayan detectado también en otras zonas del genoma distintos del fragmento de 257 kb mapeado numerosos casos de hibridación entre diferentes clones de las dos genotecas, los cuales han sufrido pérdida de fragmentos de restricción comunes. Así, se asume que una parte minoritaria del ADN total cromosómico de Halococcus saccharolyticus (la cual no está constituida por ADN plasmídico, ya que no se ha detectado en esta cepa) se acompaña de múltiples reordenamientos, mientras que la otra se encuentra conservada.

Se estudió finalmente la presencia en cocos halófilos extremos de secuencias homólogas en a una serie de genes presentes en halobacterias, como el bop ampliamente estudiado debido a su actuación

como sistema de fotofosforilación, aunque característico de Halobacterium halobium y especies relacionadas. También se estudió la presencia de los elementos de inserción ISH26, ISH27, ISH2 e ISH1.8, también presentes en halobacterias e implicados en la amplia variabilidad fenotípica de Halobacterium halobium (Pfeifer, 1988), y que podrían estar implicados en las deleciones de fragmentos producidas al mapear el fragmento de 257 kb de Halococcus saccharolyticus. No se detectó homología en ninguno de los casos mencionados.

El proceso de fijación de nitrógeno está ampliamente distribuido entre las eubacterias y se ha descrito recientemente en arqueobacterias, ya que algunos metanógenos son capaces de crecer con nitrógeno molecular como única fuente de carbono, aunque en el caso de halobacterias los datos sobre este proceso no están aclarados (Possot y col., 1986). De ahí que se estudiase la presencia en cocos halófilos extremos de secuencias homólogas al nif, las cuales no se han detectado.

Moritz (1985) describió la presencia de una copia de ARN estable en Halobacterium halobium cepa R1 (el ARN 7S) de función desconocida. Las halobacterias por ellos estudiadas se diferenciaban según el tamaño del fragmento de ADN que hibridaba con la sonda de ARN 7S una vez que este ADN total había sido digerido con PstI. Así, detectaron que en H. halobium, la banda por ellos obtenida fue de 7,3 kb, mientras que en H. morrhuae fue de 2,5 kb. En nuestro caso, hemos detectado una banda de hibridación en la cepa Halococcus morrhuae CCM

537^T, aunque en este caso de un tamaño molecular aproximado de 12 kb, mientras se han detectado en Halococcus saccharolyticus dos bandas de 8 y 0,5 kb de tamaño aproximadamente. Estos resultados manifiestan que las dos especies de Halococcus, H. morrhuae y H. saccharolyticus presentan distinta organización del ARN 7S.

VI. CONCLUSIONES

1. En base a los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales, así como la composición de lípidos polares, porcentaje de guanina más citosina en el ADN e hibridación ADN-ARNr, las cepas del fenón D se han incluido dentro del género Halococcus. Sin embargo, estos datos sugieren su inclusión en una nueva especie, para la cual proponemos la denominación Halococcus saccharolyticus.

2. Como principales lípidos polares de esta nueva especie se han detectado fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerofosfato (PGP) y un diglicosilgliceroldiéter sulfatado (S-DGD). Todos los lípidos derivan del isoprenilglicerol diéter de C₂₀-C₂₀ y/o C₂₀-C₂₅. No se ha detectado la presencia de triglicosilgliceroldiéter (TGD-1 o TGD-2), pero sí la de dos glicolípidos y dos fosfoglicolípidos no identificados.

3. En el estudio de tolerancia a metales pesados las principales diferencias encontradas entre las cepas de esta nueva especie y Halococcus morrhuae consisten en que mientras Halococcus morrhuae mostró tolerancia a cromo, cobre, níquel y plomo, Halococcus saccharolyticus presentó tolerancia a cromo, cadmio, cobre y níquel.

4. Los estudios sobre presencia de ADN extracromosómico en diferentes cepas de cocos halófilos extremos han permitido la identificación de dos plásmidos (pHM1 y pHM2) en Halococcus morrhuae CCM537, mientras que no se han detectado plásmidos en la nueva especie Halococcus saccharolyticus. El plásmido pHM2 ha sido estudiado en detalle y ha mostrado homología tan solo con el plásmido pHT1 de H. trapanicum.

5. El fragmento mapeado del genoma de Halococcus saccharolyticus indica que una porción de dicho genoma se encuentra conservada, sin poseer la variabilidad genética descrita en otras halobacterias. Por otra parte, existen otras regiones del genoma en las que parecen producirse múltiples reordenamientos.

6. Entre las diferentes sondas utilizadas frente a ADN total de las cepas de cocos halófilos extremos estudiadas, sólo se ha detectado hibridación con la correspondiente al ARN 7S de Halobacterium halobium cepa R1. Sin embargo, H. morrhuae y H. saccharolyticus mostraron distintas bandas de hibridación.

VII. BIBLIOGRAFIA

Anderson, L. M., y Young, D. 1985. Quantitative filter hybridization in nucleic acid hybridization. En: Nucleic acids hybridization. Hames, B., y Higgins, S. J. (Eds.). pp. 74-11. IRL Press, Oxford.

Antón, J., Meseguer, I., y Rodríguez-Valera, F. 1988. Production of an extracellular polysaccharide by Haloferax mediterranei. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2381-2386.

Arndt, E., y Kimura, M. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene for the ribosomal S11 from the archaeobacterium Halobacterium marismortui. J. Biol. Chem. 263: 16063-16068.

Babich, H., y Stotzky, G. 1978. Toxicity of zinc to fungi, bacteria and coliphages: influence of chloride ions. Appl. Environ. Microbiol. 36: 906-914.

Babich, H., y Stotzky, G. 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms. CRC Crit. Rev. Microbiol. 8: 99-145.

Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., y Wolfe, R. S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43: 260-296.

Banfálvi, Z., Sakanyon, V., Konc, Z. C., Kiss, A., Dusha, I., y Kondorosí, A. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 184: 318-325.

Bauer, A. W., Serris, J. C., Türck, M., y Kirby, W. M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. Am. J. Clin. Path. 45: 493-496.

Bayley, S. T. 1976. Information transfer. En: Extreme environments: mechanisms of microbial adaptation. Heinrich, M. R. (Ed.). pp. 119-136. Academic Press, New York.

Ben-Mahrez, K., Thierry, D., Sorokine, I., Danna-Muller, A., y Kohiyama, M. 1988. Detection of circulating antibodies against c-myc protein in cancer patient sera. Br. J. Cancer 57: 529-534.

Betlach, M., Pfeifer, F., Friedman, J., y Boyer, H. W. 1983. Bacterio-opsin mutants of Halobacterium halobium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1416-1420.

Betlach, M., Friedman, J., Boyer, H. W., y Pfeifer, F. 1984. Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin expression. Nucleic Acids Res. 12: 7949-7959.

Betlach, M., Leong, D., y Boyer, H. W. 1986. Bacterio-opsin gene expression in Halobacterium halobium. Syst. Appl. Microbiol. 7: 83-89.

Bivin, D. B., y Stoeckenius, W. 1986. Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. J. Gen. Microbiol. 132: 2167-2177.

Blanck, A., y Oesterhelt, D. 1987. The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. EMBO J. 6: 265-273.

Bligh, E. G., y Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canad. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

Bonelo, G., Ventosa, A., Megias, M., y Ruiz-Berraquero, F. 1984. The sensitivity of halobacteria to antibiotics. FEMS Microbiol. Lett. 21: 341-345.

Bonner, T. I., Brenner, D. J., Neufield, B. R., y Britten, R. J. 1973. Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. J. Mol. Biol. 81: 123-135.

Boone, D. R., y Mah, R. A. 1989. Group I. Methanogenic archaeobacteria. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2173. Williams y Wilkins, Baltimore.

Breed, R. S., Murray, R. G. E., y Hitchens, A. P. (Eds.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 6ª ed. Williams y Wilkins, Baltimore.

Brock, T. D. 1969. Microbial growth under extreme conditions. En: Microbial growth. 19 Symposium of the Society for General Microbiology. Meadow, P. M., y Pirt, S. J. (Eds.). pp. 15-41. Cambridge University Press, Cambridge.

Brock, T. D. 1979. Ecology of saline lakes. En: Strategies of microbial life in extreme environments. Shilo, M. (Ed.). pp. 29-47. Verlag Chemie, Berlín.

Brown, A. D. 1976. Microbial water stress. Bacteriol. Rev. 40: 803-846.

Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods Enzymol. 12: 163-166.

Cazzulo, J. J. 1975. Las bacterias halófilas extremas. I. Generalidades, composición y estructura. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 7: 28-37.

Charlebois, R. L., Lam, W. L., Cline, S. W., y Doolittle, W. F. 1987. Characterization of pHV2 from Halobacterium volcanii an its use in demostrating transformation of an archaeobacterium. Proc, Natl. Acad. Sci. USA 84: 8530-8534.

Charlebois, R. L., Hofman, J. D., Schalwyk, L. C., Lam, W. L., y Doolittle, W. F. 1989. Genome mapping in halobacteria. *Can. J. Microbiol.* 35: 21-29.

Christensen, W. B. 1946. Urea descomposition as a means of differentiting Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *J. Bacteriol.* 52: 461-466.

Clark, L., y Carbon, J. 1979. Selection of specific clones from colony banks by suppression of complementation tests. *Methods Enzymol.* 68: 396-408.

Cline, S. W., y Doolittle, W. F. 1987. Efficient transfection of the archaeobacterium Halobacterium halobium. *J. Bacteriol.* 169: 1341-1344.

Cline, S. W., Lam, W. L., Charlebois, R. L., Schalwyk, L. C., y Doolittle, W. F. 1989a. Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* 35: 148-152.

Cline, S. W., Schalwyk, L. C., y Doolittle, W. F. 1989b. Transformation of the archaeobacterium Halobacterium volcanii with genomic DNA. *J. Bacteriol.* 171: 4987-4991.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., y Hsu, L. 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114.

Cohen, S. N., y Chang, A. C. Y. 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J. Bacteriol.* 132: 734-737.

Cohen, S., Oren, A., y Shilo, M. 1983. the divalent cation requirement of Dead Sea halobacteria. *Arch. Microbiol.* 136: 184-190.

Collies, E., y Mannheim, W. 1978. Classification of the Flavobacterium-Cytophaga complex on the basis of respiratory quinones and fumarate respiration. *Int. J. System. Bact.* 28: 14-19.

Colwell, R. R., Litchfield, C. D., Vreeland, R. H., Kiefer, L. A., y Gibbons, N. E. 1979. Taxonomic studies of red halophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29: 379-399.

Copeland, B. J. 1967. Environmental characteristics of hypersaline lagoons. *Contrib. Mar. Sci.* 12: 207-218.

Cowan, S. T., y Steel, K. J. 1982. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. C.E.C.S.A., México.

Daniels, D. L., y Blattner, F. R., 1987. Mapping using gene encyclopaedias. *Nature* 325: 831-832.

Daniels, C. J., Gupta, G., y Doolittle, W. F. 1985. Transcription and excision of a large intron in the tRNA^{trp} gene of an archaeobacterium, H. volcanii. *J. Biol. Chem.* 260: 3132-3134.

Danson, M. J., Black, S. C., Woodland, D. L., y Wood, P. A. 1985. Citric acid cycle enzymes of the archaeobacteria: citrate synthase and succinate thiokinase. *FEBS Lett.* 179: 120-124.

Darland, G., Brock, T. D., Samsonoff, W., y Conti, S. F. 1970. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* 170: 1416-1418.

DasSarma, S., Halladay, J. T., Jones, J. G., Donovan, J. W., Giannasca, P. J., y De Marsac, N. T. 1988. High-frequency mutations in a plasmid-encoded gas vesicle gene in Halobacterium halobium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6861-6865.

Davis, J. S. 1978. Biological communities of a nutrient enriched salina. *Aquat. Bot.* 4: 23-42.

De Ley, J., y De Smedt, J. 1975. Improvements of the membrane filter method for DNA:rRNA hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* **41**: 287-307.

De Medicis, E. 1986. Magnesium, manganese and mutual depletion systems in halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 137-143.

De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Ross, H. N. M., Grant, W. D., y Bu'lock, J. D. 1982. An asymmetric archaeobacterial ether lipid for alkaliphilic halophiles. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 343-348.

De Rosa, M., Gambacorta, A., Grant, W. ., Lanzoth, V., y Nicolaus, B. 1988. Polar lipids and glycine betaine from haloalkaliphilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 205-211.

De Smedt, J., y De Ley, J. 1977. Intra and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bact.* **27**: 222-240.

Del Moral, A., Quesada, E., y Ramos-Cormenzana, A. 1987. Distribution and types of bacteria isolated from an inland saltern. *Ann. Inst. Psteur/Microbiol.* **138**: 59-66.

Ebert, K., Goebel, W., y Pfeifer, F. 1984. Homologies between heterogeneous extrachromosomal DNA populations of *Halobacterium halobium* and four new halobacterial isolates. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 91-97.

Ebert, K., y Goebel, W. 1985. Conserved and variable regions in the chromosomal and extrachromosomal DNA of halobacteria. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 96-102.

Edgerton, M. E., y Brimblecombe, P. 1981. Thermodynamics of halobacterial environments. *Can. J. Microbiol.* **27**: 899-981.

Elazari-Volcani, B. 1940. Studies on the microflora of the Dead Sea. Doctoral thesis, Hebrew University, Jerusalem.

Elazari-Volcani, B. 1957. Genus XII. Halobacterium. En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7^a ed. Breed, R. S., Murray, E. G. D., y Smith, N. R. (Eds.). pp. 207-212. Williams y Wilkins, Baltimore.

Ewersmeyer-Wenk, B., Zähler, H., Krone, B., y Zeeck, A. 1981. Metabolic products of microorganisms. 207. Haloquinone, a new antibiotic active against halobacteria. I. Isolation, characterization and biological properties. J. Antibiot. 34: 1531-1537.

Farlow, W. G. 1880. On the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season. Report of the Commissioners for 1878. U.S. Commission of Fish and Fisheries. pp. 969-974.

Farlow, W. G. 1886. Vegetable parasites of codfish. Bull. U.S. Fish. Comm. 6: 1-4.

Feinberg, A. P., y Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.

Fernández-Castillo, R., Rodríguez-Valera, F., González-Ramos, J., y Ruíz-Berraquero, F. 1986. Accumulation of Poly (β -hydroxybutyrate) by halobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 51: 214-216.

Ferragut, C., y Leclerc, H. 1976. Etude comparative des methodes de determination du Tm de l'ADN bacterien. Ann. Microbiol. 127: 223-235.

Fitch, W. M., y Margoliash, E. 1967. Construction of phylogenetic trees. Science 155: 279-284.

Forterre, P., Elie, C., y Kohiyama, M. 1984. Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **159**: 800-802.

Fox, G. E., Peehmann, K. J., y Woese, C. R. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal RNA: molecular approach to procaryotic systematic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**: 44-57.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. M., y Woese, C. R. 1980. The phylogeny of procaryotes. *Science* **209**: 457-463.

Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., McMeedin, T. A., y Burton, H. R. 1989. Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**: 20-27.

Gadd, G. M., y Griffiths, A. J. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* **4**: 303-317.

Galinsky, E. A., y Trüper, H. G. 1982. Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium Ectothiorhodospira halochloris. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 357-360.

Galinsky, E. A. 1989. The potential use of halophilic eubacteria for the production of organic chemicals and enzyme protective agents. En: *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*. Da Costa, M. S., Duarte, J. C., y Williams, R. A. D. (Eds.). pp. 375-379. Elsevier, London.

García, M. T., Nieto, J. J., Ventosa, A., y Ruíz-Berraquero, F. 1987. The susceptibility of the moderate halophile Vibrio costicola to heavy metals. J. Appl. Bact. 63: 63-66.

Gibbons, N. E. 1957. The effect of salt concentration on the biochemical reactions of some halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 3: 249-255.

Gibbons, N. E. 1970. Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria. En: Methods in microbiology. Vol. 3B. Norris, J. E., y Ribbons, D. W. (Eds.). pp. 169-182. Academic Press, New York.

Gibbons, N. E. 1974. Family V. Halobacteriaceae. En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8ª ed. Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. (Eds.). pp. 269-273. Williams y Wilkins, Baltimore.

Giles, K. W., y Myers, A. 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature 206: 4979.

Gillespie, S., y Gillespie, D. 1971. Ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in aqueous solutions containing formamide. Biochem. J. 125: 481-487.

Ginzburg, M., Sachs, L., y Ginzburg, B. A. 1970. Ion metabolism in a Halobacterium. I. Influence of age of culture on intracellular concentrations. J. Gen. Physiol. 55: 187-207.

González, C., Gutiérrez, C., y Ramírez, C. 1978. Halobacterium vallismortis sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolising extremely halophilic bacterium. Can. J. Microbiol. 24: 710-715.

Good, W. A., y Hartman, P. A. 1970. Properties of the amylase from Halobacterium halobium. J. Bacteriol. 104: 601-603.

Grant, W. D. 1989. Genus VI. Natronococcus. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2232-2233. Williams y Wilkins, Baltimore.

Grant, W. D., y Larsen, H. 1989a. Group III. Extremely halophilic archaeobacteria. Order Halobacteriales ord. nov. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2216-2219. Williams y Wilkins, Baltimore.

Grant, W. D., y Larsen, H. 1989b. Genus II. Haloarcula. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2224-2226. Williams y Wilkins, Baltimore.

Grant, W. D., y Larsen, H. 1989c. Genus III. Haloferax. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2226-2228. Williams y Wilkins, Baltimore.

Grunstein, M., y Wallis, J. 1979. Colony hybridization. Methods in Enzymology. 68: 379-389.

Gupta, R. 1985. Transfer ribonucleic acids of archaeobacteria. En: The bacteria. Vol. VIII: Archaeobacteria. Woese, C. R., y Wolfe, R. S. (Eds.). Academic Press, Orlando.

Gutiérrez, M. C., García, M. T., Ventosa, A., Nieto, J. J., y Ruíz-Berraquero, F. 1986. Occurrence of megaplasms in halobacteria. J. Appl. Bacteriol. 61: 67-71.

Gutiérrez, M. C., Ventosa, A., y Ruíz-Berraquero, F. 1989. DNA-DNA homology studies among strains of Haloferax and other halobacteria. *Curr. Microbiol.* 18: 253-256.

Hackett, N. R., y DasSarma, S. 1989. Characterization of the small endogenous plasmid of Halobacterium SB3 and its use in transformation of Halobacterium halobium. *Can. J. Microbiol.* 35: 86-91.

Hanamoto, T., Takashina, T., Grant, W. D., y Horikoshi, K. 1988. Asymmetric cell division of a triangular halophilic archaeobacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 221-224.

Hartmann, R., Sickinger, H. D., y Oesterhelt, D. 1980. Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3821-3825.

Hasselbacher, C. A., Spudich, J. L., y Dewey, T. G. 1988. Circular dichroism of halorhodopsin: comparison with bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin I. *Biochemistry* 27: 2540-2546.

Hayashi, K. 1968. New concept of center species and a new genus Halococcus induced theoretically. *Proc. of XI. A. A. Sympo 1968. Taxonomy of microorganisms.* University of Tokyo Press, Tokyo.

Hescox, M. A., y Carlberg, D. M. 1972. Photoreactivation in Halobacterium cutirubrum. *Can. J. Microbiol.* 18: 981-985.

Hildebrand, E., y Dencher, N. A. 1975. Two photosystems controlling behavioural responses of Halobacterium halobium. *Nature* 257: 46-48.

Hilpert, R., Winter, J., Hammes, W., y Kandler, O. 1981. The sensitivity of archaeobacteria to antibiotics. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I, Orig. C* 2: 11-20.

Hochstein, L. I., y Tomlinson, G. A. 1985. Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 27: 329-331.

Hong, F. T. 1986. The bacteriorhodopsin model membrane system as a prototype molecular computing element. *BioSystems* 19: 223-236.

Horne, M., Englert, C., y Pfeifer, F. 1988. Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Mol. Gen. Genet.* 213: 459-464.

Houwink, A. L. 1956. Flagella, gas vacuoles and cell wall structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscopic study. *J. Gen. Microbiol.* 15: 146-150.

Hummel, H., y Böck, A. 1987. Thiostrepton resistance mutations in the gene for 23S ribosomal RNA of halobacteria. *Biochimie* 69: 857-861.

Imhoff, J. F., Sahl, H. G., Soliman, G. S. H., y Trüper, H. G. 1979. The Wadi Natrum: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiol. J.* 1: 219-234.

Imhoff, J. F., Kushner, D. J., y Anderson, P. J. (1983). Amino acid composition of proteins in halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1675-1679.

Imhoff, J. F., y Rodríguez-Valera, F. 1984. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* 160: 478-479.

Izotova, L. S., Strongin, A. Y., Chekulaeva, L. N., Sterkin, V. E., Lyunblinstaya, V. I., Timokhina, E. A., y Stepanov, V. M. 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 155: 826-830.

Javor, B., Requandt, C., y Stoeckenius, W. 1982. Box-shaped halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 151: 1532-1542.

Javor, B. 1983. Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 28: 153-159.

Javor, B. 1984. Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 352-360.

Javor, 1989. Halophilic archaeobacteria. En: *Hypersaline environments. Microbiology and biogeochemistry.* Brock, T. D. (Ed.). pp. 101-124. Springer-Verlag, New York.

Johnson, J. L. 1981. Genetic characterization. En: *Manual of methods for general bacteriology.* Gerhardt, P. (Ed.). pp. 450-472. A.S.M., Washington, D.C.

Jones, A. G., Ewing, C. M., y Melvin, M. V. 1981. Biotechnology of solar salt fields. *Hydrobiologia* 82: 391-406.

Joshi, J. G., Guild, W. R., y Handler, P. 1963. The presence of two species of DNA in some halobacteria. *J. Mol. Biol.* 6: 34-38.

Juez, G., Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., y Kushner, D. J. 1986. *Haloarcula hispanica* sp. nov. and *Haloferax gibbonsii* sp. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 75-79.

Juez, G. 1988. Taxonomy of extremely halophilic archaeobacteria. En: *Halophilic bacteria. Vol. II.* Rodríguez-Valera, F. (Ed.). pp. 3-24. CRC Press, Boca Ratón.

Kamekura, M., y Kates, M. 1988. Lipids of halophilic archaeobacteria. En: *Halophilic bacteria. Vol. II.* Rodríguez-Valera, F. (Ed.). pp. 25-54. CRC Press, Boca Ratón.

Kandler, O. 1982. Cell wall structures and their phylogenetic implications. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I, Orig C* 3: 149-160.

Kandler, O. 1984. Archaeobacterial-biotechnological implications. Biotechnology. Symposium: Futuristic aspects of biotechnology. München, 1984.

Kandler, O., y König, H. 1985. Cell envelopes of archaeobacteria. En: The bacteria. Vol. VIII. Woese, C. R., y Wolfe, R. S. (Eds.). pp. 171-214. Academic Press, Orlando.

Kates, M. 1972. Ether-linked lipids in extremely halophilic bacteria. En: Ether lipids: chemistry and biology. Snyder, F. (Ed.). pp. 351-398. Academic Press, New York.

Kates, M., y Kushwaha, S. L. 1976. The diphitanyl glycerol ether analogues of phospholipids and glycolipids in membranes of Halobacterium cutirubrum. En: Lipids. Vol. 1. Biochemistry. Paoletti, R., Procellati, G., y Jacini, G. (Eds.). pp. 267-275. Raven, New York.

Kates, M. 1978. The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. Prog. Chem. Fats Other Lipids 15: 301-342.

Kates, M., y Kushwaha, S. L. 1978. Biochemistry of lipids of extremely halophilic bacteria. En: Energetics and structure of halophilic microorganisms. Caplan, S. R., y Ginzburg, M. (Eds.). pp. 461-480. Elsevier, Amsterdam.

Kates, M. 1986. Techniques of lipidology, 2ª Edición. Elsevier, Amsterdam.

Kessel, M., Wildhaber, I., Cohen, S., y Baumeister, W. 1988. Three dimensional structure of the regular surface glycoprotein of Halobacterium volcanii from the Dead Sea. EMBO J. 7: 1549-1554.

Kirk, R. G., y Ginzburg, M. 1972. Ultrastructure of two specie of Halobacterium. J. Ultrastruct. Res. 41: 80-94.

Klausner, A. 1986. Algaculture: Food for thought. *Biotechnol.* 4: 947-953.

Klebahn, H. 1919. Die Schädlinge des Klippfisches. Ein Betrag zur Kenntnis des salzliebenden Organismen. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamb.* 4: 11-69.

Klenk, H. P., Haas, B., Schwass, V., y Zillig, W. 1986. Hybridization homology: a new parameter for the analysis of phylogenetic relations, demonstrated with the urkingdom of the archaeobacteria. *J. Mol. Evol.* 24: 167-173.

Kocur, M., y Boháček, J. 1972. DNA base composition of extreme halophilic cocci. *Arch. Mikrobiol.* 82: 280-282.

Kocur, M., Smid, B., y Martinec, T. 1972. The fine structure of extreme halophilic cocci. *Microbios* 5: 101-107.

Kocur, M., y Hodgkiss, W. 1973. Taxonomic status of the genus Halococcus Schoop. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21: 151-156.

Koneman, E. W., Allen, D. S., Dowell, V. R., y Sommers, H. M. (Eds.). 1983. *Diagnóstico microbiológico*. Panamericana, Buenos Aires.

König, H., Nusser, E., y Stetter, K.O. 1985. Glycogen in Methanobolus and Methanococcus. *FEMS Microbiol. Lett.* 28: 265-269.

König, H. 1988. Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.* 34: 395-406.

König, H., y Stetter, K.O. 1989a. Archaeobacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2171-2173. Williams y Wilkins, Baltimore.

König, H., y Stetter, K. O. 1989b. Group V. Extremely thermophilic S^o-metabolizers. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2236. Williams y Wilkins, Baltimore.

Krantz, M. J., y Ballou, C. E. 1973. Analysis of *Halobacterium halobium* gas vesicles. *J. Bacteriol.* 114: 1058-1067.

Kreisl, P., y Kandler, O. 1986. Chemical structure of the cell wall polymer of *Methanosarcina*. *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 293-299.

Krinsky, N. I. 1979. Carotenoid pigments: multiple mechanisms for coping with the stress of photosensitized oxidations. En: *Strategies of microbial life in extreme environments*. Shilo, M. (Ed.). pp. 163-177. Springer-Verlag, New York.

Kushner, D. J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En: *Microbial life in extreme environments*. Kushner, D. J. (Ed.). pp. 317-368. Academic Press, New York.

Kushner, D. J. 1985. The Halobacteriaceae. En: *The bacteria*. Vol. VIII. Archaeobacteria. Woese, C. R., y Wolfe, R. S. (Eds.). pp. 171-214. Academic Press, Orlando.

Kushner, D. J., y Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. En: *Halophilic bacteria*. Vol. I. Rodríguez-Valera, F. (Ed.). pp. 109-138. CRC Press, Boca Ratón.

Kushwaha, S. L., Gochnauer, M. B., Kushner, D. J., y Kates, M. 1974. Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 20: 241-245.

Kushwaha, S. C., y Kates, M. 1979. Studies of the biosynthesis of C₅₀ carotenoids in *halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* 25: 1292-1297.

Kuhn, I., Stephenson, F. H., Boyer, H. W., y Greene, P. J. 1986. Positive-selection vectors using lethality of the *EcoRI* endonuclease. *Gene* **44**: 253-263.

Lake, J. A., Hendersen, E., Oakes, M., y Clark, M. W. 1984. Eocytes: a new ribosome structure indicates a kingdom with close relationship to eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3786-3790.

Lake, J. A. 1986. An alternative to archaebacterial dogma. *Nature* **319**: 626.

Lake, J. A. 1988. Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences. *Nature* **331**: 184-186.

Lake, J. A., 1989. Origin of the eukaryotic nucleus: eukaryotes and eocytes are genotypically related. *Can. J. Microbiol.* **35**: 109-118.

Langworthy, T. A. 1985. Lipids of archaebacteria. En: *The bacteria*. Vol. VIII. Wolfe, R. S., y Woese, C. R. (Eds.). Academic Press, Orlando.

Langworthy, T. A., y Pond, J. L. 1986. Archaebacterial ether lipids and chemotaxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **7**: 253-257.

Langworthy, T. A., y Smith, P. F. 1989. Group IV. Cell wall-less archaebacteria. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2233-2236. Williams y Wilkins, Baltimore.

Lapage, S. P., y Bascomb, S. 1968. Use of selenite reduction in bacterial classification. *J. Appl. Bact.* **31**: 568-580.

Lanyi, J. K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**: 272-290.

Lanyi, J. K. 1981. Halorhodopsin-a second retinal pigment in *Halobacterium halobium*. *Trends Biochem. Sci.* February, pp. 1-3.

Larsen, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilism. *Adv. Microb. Physiol.* 1: 97-132.

Larsen, H., Omang, S., y Steensland, H. 1967. On the gas vacuoles of the halobacteria. *Arch. Mikrobiol.* 59: 197-203.

Larsen, H. 1984. Family Halobacteriaceae. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol I. Krieg, N. R. (Ed.). pp. 261-267. Williams y Wilkins, Baltimore.

Larsen, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms—an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 1-4.

Larsen, H., Leffers, H., Kjems, J., y Garrett, R. A. 1986. Evolutionary divergence between the ribosomal RNA operons of *Halococcus morrhuae* and *Desulfurococcus mobilis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 49-57.

Larsen, H. Genus IV. *Halococcus*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2228-2230. Williams y Wilkins, Baltimore.

Larsen, H., y Grant, W. D. 1989. Genus I. *Halobacterium*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2219-2224. Williams y Wilkins, Baltimore.

Laskey, R. A., y Mills, A. D., 1977. Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett.* 82: 314-316.

Lechner, J., y Sumper, M. 1987. The primary structure of a procaryotic glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 262: 9724-9729.

Leffers, H., y Garrett, R. 1984. The nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of the archaeobacterium Halococcus morrhuae. EMBO J. 3: 1613-1619.

Leffers, H., Kjems, J., Ostergaard, L., Larsen, M., y Garrett, R. A. 1987. A comparative study based on the inferred primary and secondary structure of 23S rRNAs from an extreme halophile, a methanogen and a thermoproteale. J. Mol. Biol. 195: 43-61.

Leong, D., Boyer, H. W., y Betlach, M. 1988a. Transcription of genes involved in bacterio-opsin genes in mutants of a halophilic archaeobacterium. J. Bacteriol. 170: 4910-4915.

Leong, D., Pfeifer, F., Boyer, H. W., y Betlach, M. 1988b. Characterization of a second gene involved in bacterio-opsin gene expression in a halophilic archaeobacterium. J. Bacteriol. 170: 4903-4909.

Luehrsen, K. R., Nicholson, D. E., Eubanks, D. L., y Fox, G. E. 1981. An archaeobacterial 5S rRNA contains a long insertion sequence. Nature 293: 755-756.

Madon, J., Leser, V., y Zillig, W. 1983. DNA-dependent RNA polimerase from the extremely halophilic archaeobacterium Halococcus morrhuae. Eur. J. Biochem. 135: 279-283.

Magrum, L. J., Luehrsen, K. R., y Woese, C. R. 1978. Are extreme halophiles actually "bacteria"? J. Mol. Evol. 11: 1-8.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3: 208-218.

Mathrani, I. M., Boone, D. R., Mah, R. A., Fox, G. E., y Lau, P. P. 1988. Methanohalophilus zhilinae sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 139-142.

Márquez, M. C., Ventosa, A., y Ruíz-Berraquero, F. 1987. A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a solar saltern. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 45-56.

May, B. P., y Dennis, P. P. 1987. Superoxide dismutase from the extremely halophilic archaeobacterium Halobacterium cutirubrum. *J. Bacteriol.* **169**: 1417-1422.

Meijls, W. H., y Schilperoort, R. A. 1971. Determination of the amount of DNA on nitrocellulose membrane filters. *FEBS Letters* **12**: 166-168.

Mescher, M. F., y Strominger, J. L. 1975. Bacitracin induces sphere formation in Halobacterium species which lack a wall peptidoglycan. *J. Gen. Microbiol.* **89**: 375-378.

Mescher, M. F., y Strominger, J. L. 1976a. Structural (shape-maintaining) role of the cell surface glycoprotein of Halobacterium salinarium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2687-2691.

Mescher, M. F., y Strominger, J. L. 1976b. Purification and characterization of a procaryotic glycoprotein from the cell envelope of Halobacterium salinarium. *J. Biol. Chem.* **251**: 2005-2014.

Meseguer, I., y Rodríguez-Valera, F. 1985. Production and purification of halocin H4. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**: 177-182.

Meseguer, I., y Rodríguez-Valera, F. 1986. Effects of halocin H4 on cells of Halobacterium halobium. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3061-3068.

Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F., y Ventosa, A. 1986. Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 177-182.

Mevarech, M., y Verczberger, R. 1985. Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*. *J. Bacteriol.* **162**: 461-462.

Moldoveanu, M., y Kates, M. 1989. Effect of bacitracin on growth and phospholipid, glycolipid and bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium cutirubrum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2503-2508.

Montero, C.G., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., y Ruiz-Berraquero, F. 1988. Taxonomic study of non-alkaliphilic halococci. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 725-732.

Moore, R. L., y McCarthy, B. J. 1969. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. *J. Bacteriol.* **99**: 248-254.

Moritz, A. 1985. Die gene für 5S und 7S RNA von Halobacterien. Eine Studie über strukturphylogenetische Beziehungen. Ph. D. thesis, University of Würzburg, Würzburg.

Mullakhanbhai, M. F., y Larsen, H. 1975. *Halobacterium volcanii* sp. nov.: a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.* **104**: 207-214.

Neumann, H., Gierl, J., Tu, J., Leibrock, J., Staiger, D., y Zillig, W. 1983. Organization of the genes for ribosomal RNA in archaeobacteria. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 66-72.

Nieto, J. J., Ventosa, A., y Ruiz-Berraquero, F. 1987. Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1199-1202.

Nieto, J. J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M. C., Ventosa, A., Quesada, E., y Ruíz-Berraquero, F. 1989a. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2385-2390.

Nieto, J. J., Ventosa, A., Montero, C. G., y Ruíz-Berraquero, F. 1989b. Toxicity of heavy metals to archaeobacterial halococci. *Syst. Appl. Microbiol.* **11**: 116-120.

Milsson, B., Uhlen, M., Josephson, S., Gotenbeck, S., y Philipson, L. 1983. An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Research* **11**: 8019-8030.

Moller, H. F., y Woese, C. R. 1981. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* **212**: 403-411.

Norberg, P., y Hofsten, B. V. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. microbiol.* **55**: 251-256.

Oesterhelt, D., y Stoeckenius, W. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature* **233**: 149-152.

Oesterhelt, D., y Krippahl, G. 1973. Light inhibition of respiration in *Halobacterium halobium*. *FEBS Lett.* **36**: 72-76.

Oesterhelt, D., y Stoeckenius, W. 1973. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 2853-2857.

Oliver, J. L., Sanz, J. L., Amils, R., y Marín, A. 1987. Inferring the phylogeny of archaeobacteria: the use of ribosomal sensitivity to protein synthesis inhibitors. *J. Mol. Evol.* **24**: 281-288.

Olsen, G. J., y Woese, C. R. 1989. A brief note concerning archaeobacterial phylogeny. *Can. J. Microbiol.* **35**: 119-123.

Oren, A. 1983a. Halobacterium sodomense sp. nov., a Dead Sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 381-386.

Oren, A. 1983b. A thermophilic amyloglucosidase from Halobacterium sodomense, a halophilic bacterium from the Dead Sea. Curr. Microbiol. 8: 225-230.

Oren, A., Lau, P. P., y Fox, G. E. 1988. The taxonomic status of "Halobacterium marismortui" from the Dead Sea: a comparison with Halobacterium vallismortis. Syst. Appl. Microbiol. 10: 251-258.

Owen, R. J., y Hill, L. R. 1979. The estimation of base compositions, base pairing and genome sizes of bacterial deoxyribonucleic acids. En: Identification methods for microbiologists. 2^a ed. Skinner, F. A. y Lovelock, D. W. (Eds.). pp. 277-296. Academic Press, London.

Owen, R. J., y Pitcher, D. 1985. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En: Chemical methods in bacterial systematics. Goodfellow, M. y Minnikin, D. E. (Eds.). pp. 67-93. Academic Press, London.

Paterek, J. R., y Smith, P. H. 1988. Methanohalophilus mahii gen. nov., sp. nov., a methylotrophic methanogen. Int. J. syst. Bacteriol. 38: 122-123.

Paul, G., Lottspeich, F., y Wieland, F. 1986. Asparaginyln-N-acetylgalactosamine: linkage unit of halobacterial glycosamino-glican. J. Biol. Chem. 261: 1020-1024.

Pauling, C. 1982. Bacteriophages of Halobacterium halobium: isolation from fermented fish sauce and primary characterization. Can. J. Microbiol. 28: 916-921.

Pecher, T., y Böck, A. 1981. In vivo susceptibility of halophilic and methanogenic organisms to protein synthesis inhibitors. FEMS Microbiol. Lett. 10: 295-297.

Petter, H. F. M. 1932. Over roode en andere bacterien von gezouten visch. Doctoral thesis, Rijks-Universitat de Utrecht, Utrecht.

Pfeifer, F., Weidinger, G., y Goebel, W. 1981a. Characterization of plasmids in halobacteria. J. Bacteriol. 145: 369-374.

Pfeifer, F., Weidinger, G., y Goebel, W. 1981b. Genetic variability in Halobacterium halobium. J. Bacteriol. 145: 375-381.

Pfeifer, F., Ebert, K., Weidinger, G., y Goebel, W. 1982. Structure and functions of chromosomal and extrachromosomal DNA in halobacteria. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I, Orig. C 3: 110-119.

Pfeifer, F., Betlach, M., Martiensen, R., Friedman, J., y Boyer, H. W. 1983. Transposable elements of Halobacterium halobium. Mol. Gen. Genet. 191: 182-188.

Pfeifer, F., Friedman, J., Boyer, H. W., y Betlach, M. 1984. Characterization of insertions affecting the expression of the bacterio-opsin gene in Halobacterium halobium. Nucleic Acids Res. 12: 2489-2497.

Pfeifer, F., y Betlach, M. 1985. Genome organization in Halobacterium halobium: A 79 kb island of more (A+T) rich DNA in the chromosome. Mol. Gen. Genet. 198: 449-455.

Pfeifer, F., Boyer, H. W., y Betlach, M. 1985. Restoration of bacterio-opsin gene expression in a revertant of Halobacterium halobium. J. Bacteriol. 164: 414-420.

Pfeifer, F. 1986. insertion elements and genome organization of Halobacterium halobium. Syst. Appl. Microbiol. 7: 36-40.

Pfeifer, F. 1988. Genetics of halobacteria. En: Halophilic bacteria. Rodríguez-Valera, F. (Ed.). pp. 105-133. CRC Press, Boca Raton.

Possot, O., Henry, M., y Sibold, L. 1986. Distribution of DNA sequences homologous to nifH among archaeobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 34: 173-177.

Post, F. J. 1977. The microbial ecology of the Great Salt Lake. Microb. Ecol. 3: 143-165.

Poulsen, V. A. 1879. Om nogle mikroskopiske Planteorganismer. Vidensk. Medd. Naturhist. Foren. Kjobenhaum 1879-1880. pp. 231-154.

Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., y Ramos-Cormenzana, A. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. J. Appl. Bacteriol. 53: 155-161.

Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-valera, F., Megías, L., y Ramos-Cormenzana, A. 1983. Numerical taxonomy of moderate halophiles from hypersalines soils. J. Gen. Microbiol. 129: 2649-2657.

Ramamoorthy, S., y Kushner, D. J. 1975. Binding of mercury and other heavy metals ions by microbial growth media. Microb. Ecol. 2: 162-176.

Ramón, F., Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., y Ramos-Cormenzana, A. 1977. Estudio taxonómico de 28 cepas del género Halococcus procedentes de una salina solar. Ars Pharm. 18: 363-371.

Ramos-Cormenzana, A. 1989. Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. En: Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology. Da Costa, M. S., Duarte, J. C., y Williams, R. A. D. (Eds.). pp. 289-309. Elsevier, London.

Rdest, V., y Sturm, M. 1987. Bacteriocins from halobacteria. En: Protein purification: micro to macro. pp. 271-278. Alan R. Liss, New York.

Reistadt, R. 1972. Cell wall of an extremely halophilic coccus. Investigation of ninhydrine-positive compounds. Arch. Microbiol. 32: 24-30.

Reistadt, R. 1974. 2-Amino-2-deoxyguluronic acid: a constituent of the cell wall of Halococcus sp., strain 24. Carbohydr. Res. 36: 420-423.

Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., y Ramos-Cormenzana, A. 1979. Isolation of extreme halophiles from sea water. Appl. Environ. Microbiol. 38: 164-165.

Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., y Ramos-Cormenzana, A. 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. J. Gen. Microbiol. 119: 535-538.

Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., y Ramos-Cormenzana, A. 1981. Characteristics of the heterotrophic populations in hypersaline environments of different salt concentrations. Microb. Ecol. 7: 235-243.

Rodríguez-Valera, F., Juez, G., y Kushner, D. J. 1982a. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. Can. J. Microbiol. 28: 151-154.

Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Quesada, E., y Ruíz-Berraquero, F. 1982b. Some physiological features of a Halococcus sp. at low salt concentrations. FEMS Microbiol. Lett. 15: 249-252.

Rodríguez-Valera, F., Juez, G., y Kushner, D. J. 1983. Halobacterium mediterranei sp. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. Syst. Appl. Microbiol. 4: 369-381.

Rodríguez-Valera, F., y Ruíz-Berraquero, F. 1983. Halobacterias. Investigación y Ciencia (Edición en español) 80: 94-102.

Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G., e Imhoff, J. F. 1985. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. Microb. Ecol. 11: 107-115.

Rodríguez-Valera, F. 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En: Halophilic bacteria. Vol. I. Rodríguez-Valera, F. (Ed.). pp. 3-30. CRC Press, Boca Ratón.

Rose, C. S., y Pirt, S. J. 1981. Conversion of glucose to fatty acids and methane: roles of two mycoplasmal agents. J. Bacteriol. 147: 248-254.

Rosenshine, I., y Mevarech, M. 1989. Isolation and partial characterization of plasmids found in three Halobacterium volcanii isolates. Can. J. Microbiol. 35: 92-95.

Ross, H. N. M., y Grant, W. D. 1985. Nucleic acid studies on halophilic archaeobacteria. J. Gen. Microbiol. 131: 165-173.

Ross, H. N. M., Grant, W. D., y Harris, J. E. 1985. Lipids in archaeobacterial taxonomy. En: Chemical methods in bacterial systematics. Goodfellow, M., y Minnikin, D. E. (Eds.). pp. 289-299. Academic Press, New York.

Rubinovitz, C., y Shiloach, J. 1985. Insulin-related material in prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. 29: 53-58.

Ruiz, C., Monteoliva-Sánchez, M., y Ramos-Cormenzana, A. 1989. Modification of immune response by extreme halophilic bacteria. En: Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology. Da Costa, M. S., Duarte, J. C., y Williams, R. A. D. (Eds.). pp. 367-370. Elsevier, London.

Russel, A. D., y Quesel, L. B. (Eds.). 1983. Antibiotics: assesment of antimicrobial activity and resistance. Academic Press, London.

Russell, N. J. 1989. Adaptive modifications in membrane of halotolerant and halophilic microorganisms. J. Bioenerg. Biomembranes 21: 93-113.

Salin, M. L., Duke, M. V., Oesterhelt, D., y Ma, D-P. 1988. Cloning and determination of the nucleotide sequence of the Mn-containing superoxide dismutase gene from Halobacterium halobium. Gene 70: 153-159.

Sanz, J. L., y Amils, R. 1988. Archaeobacteria: their phylogenetic relationship with eubacterial and eukaryotic kingdoms. Microbiología SEM 4: 5-27.

Sanz, J. L., Marín, I., Ramírez, L., Abad, J. P., Smith, C. L., y Amils, R. 1988. Variable rRNA gene copies in extreme halobacteria. Nucleic Acids Res. 16: 7827-7832.

Sapienza, C., y Doolittle, W. F. 1982. Unusual physical organization of the Halobacterium genome. Nature 295: 384-389.

Sapienza, C., Rose, M.R., y Doolittle, W. F. 1982. High-frequency genomic rearrangements involving archaeobacterial repeat sequence elements. Nature 229: 182-185.

Schinzel, R., y Burger, K. J. 1986. A site-specific endonuclease activity in Halobacterium halobium. FEMS Microbiol. Lett. 37: 325-329.

Schleifer, K.H., Steber, J., y Mayer, H. 1982. Chemical composition and structure of the cell wall of Halococcus morrhuae. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I, Orig. C 3: 171-178.

Schlotterbeck, E. 1984. DNS:rRNS Hybridisierung mit hilfe in vitro markierter rRNS. Diploma Thesis, Technische Universität München, München.

Schnabel, H., Zillig, W., Pfaffle, M., Schnabel, R., Michael, H., y Delius, H. 1982a. Halobacterium halobium phage ϕ H. EMBO J. 1: 87-92.

Schnabel, H., Schramm, E., Schnabel, R., y Zillig, W. 1982b. Structural variability in the genoma of phage ϕ H of Halobacterium halobium. Mol. Gen. Genet. 188: 370-377.

Schnabel, H., Palm, P., Dick, K., y Gramp, B. 1984. Sequence analysis of the insertion element ISH1.8 and of associated structural changes in the genome of phage ϕ H of the archaebacterium Halobacterium halobium. EMBO J. 3: 1717-1722.

Schnabel, H., y Zillig, W. 1984. Circular structure of the genome of phage ϕ H in a lysogenic Halobacterium halobium. Mol. Gen. Genet. 193: 422-426.

Schobert, B., y Lanyi, J. K. 1982. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. J. Biol. Chem. 257: 10306-10313.

Schoop, G. 1935. Halococcus litoralis, ein obligat halophiles Farbstoffbildner. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 43: 817-820.

Sehgal, S. N., Kates, M., y Gibbons, N. E. 1962. Lipids of Halobacterium cutirubrum. Can. J. Biochem. Physiol. 40: 69-81.

Silberklang, H., Gillum, A. M., y Rajbhandary, U. L. 1979. Use of *in vitro* ^{32}P labelling in the sequence analysis of nonradioactive tRNAs. *Methods in Enzymology* **59G**: 58-109.

Simon, R. D. 1978. *Halobacterium* strain 5 contains a plasmid which is correlated with the presence of gas vacuoles. *Nature* **273**: 314-317.

Simsek, M., DasSarma, S., Rajbhandary, U. L., y Khorna, H. G. 1982. A transposable element from *Halobacterium halobium* which inactivates the bacteriorhodopsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7268-7272.

Simsek, M. 1985. A transposable element from *Halobacterium halobium* which inactivates the bacteriorhodopsin gene. En: *Industrial aspects of biochemistry and genetics*. Alaeddinoglu, N. R., Demain, A. L., y Lancini, G. (Eds.). Plenum Press, New York.

Sioud, M., Baldacci, G., Forterre, P., y De Recondo, A-M. 1988. Novobiocin induces accumulation of a single strand of plasmid pGRB-1 in the archaeobacterium *Halobacterium* GRB. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7833-7842.

Sleytr, U. B., y Messner, P. 1983. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 11-39.

Sneath, P. H. A., y Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Freeman, W. H. Co. San Francisco.

Sokal, R. R., y Michener, C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. of Kansas Sci. Bull.* **38**: 1409-1438.

Soliman, G. S. H., y Trüper, H. G. 1982. Halobacterium pharaonis sp. nov., a new extremely haloalkaliphilic archaeobacterium. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I, Orig C 3: 318-329.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Spurr, A. R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 36: 31.

Steensland, H., y Larsen, H. 1969. A study of the cell envelope of the halobacteria. J. Gen. Microbiol. 55: 325-336.

Steensland, H., y Larsen, H. 1971. The fine structure of the extremely halophilic cocci. K. Norske Vidensk. Selsk. Skr. 8: 1-5.

Steber, J., y Schleifer, K. H. 1975. Halococcus morrhuae: a sulphated heteropolysaccharide as the structural component of the cell wall. Arch. Microbiol. 105: 173-177.

Stetter, K.O. 1989. Group II. Archaeobacterial sulfate reducers. Order "Archaeoglobales". En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., y Holt, J. G. (Eds.). pp. 2216. Williams y Wilkins, Baltimore.

Stoeckenius, W., y Rowen, R. 1967. A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration. J. Cell. Biol. 34: 365-393.

Stuart, L. S., Frey, R. W., y James, L. H. 1933. Microbiological studies of salt in relation to the reddening of salted hides. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. pp. 383.

Sundberg, S. A., Bogomolni, R. A., y Spudich, J. L. 1985. Selection and properties of phototaxis-deficient mutants of Halobacterium halobium. J. Bacteriol. 164: 282-287.

Takao, M., Kobayashi, T., Oikawa, A., y Yasui, A. 1989. Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in Halobacterium halobium. J. Bacteriol. 171: 6323-6329.

Tindall, B. J., Ross, H. N. M., y Grant, W. D. 1984. Natronobacterium gen. nov. and Natronococcus gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. Syst. Appl. Microbiol. 5: 41-57.

Tindall, B. J., Tomlinson, G. A., y Hochstein, L. I. 1989. Transfer of Halobacterium denitrificans (Tomlinson, Jahnke, and Hochstein) to the genus Haloferax as Haloferax denitrificans. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 359-360.

Tomlinson, G. A., y Hochstein, L. I. 1976. Halobacterium saccharovorum sp. nov. a carbohydrate-metabolising extremely halophilic bacterium. Can. J. Microbiol. 22: 587-591.

Tomlinson, G. A., Jahnke, L. L., y Hochstein, L. I. 1986. Halobacterium denitrificans sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36: 66-70.

Tornabene, T. G., y Edwards, H. W. 1972. Microbial uptake of lead. Science 196: 1334-1335.

Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., y Kates, M. 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of Haloarcula gen. nov. and Haloferax gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 8: 89-99.

Torreblanca, M. 1989. Estudio de la halocina H6 producida por Haloferax gibbonsii. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Alicante.

Torsvik, T., y Dundas, I. D. 1974. Bacteriophage of Halobacterium salinarium. *Nature* 248: 680-681.

Torsvik, T., y Dundas, I. D. 1975. Halophilic phage specific for Halobacterium salinarium. En: Energetics and structure of halophilic microorganisms. Caplan, S. R., y Ginzburg, M. (Eds.). pp. 609-614. Elsevier, Amsterdam.

Torsvik, T., y Dundas, I. D. 1980. Persisting phage infection in Halobacterium salinarium str. 1. *J. Gen. Virol.* 47: 29-36.

Trevors, J. T., Oddie, K. M., y Belliveau, B. H. 1985. Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 39-54.

Venkataraman, R., y Sreenivasan, A. 1956. Red halophilic bacteria—the identity of some well-known species. *Proc. Ind. Acad. Sci.* 43: 264-270.

Ventosa, A. 1981. Taxonomía numérica de bacilos Gram negativos halófilos moderados. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada.

Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F., y Ramos-Cormenzana, A. 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1959-1968.

Ventosa, A., Ramos-Cormenzana, A., y Kocur, M. 1983. Moderately halophilic Gram-positive cocci from hypersaline environments. *Syst. Appl. Microbiol.* 4: 564-570.

Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Poindexter, J. S., y Reznikoff, W. S. I. 1984. Selection of moderately halophilic bacteria by gradual salinity increases. *Can. J. Microbiol.* 30: 1279-1283.

Vogelsang-Wenke, H., Straub, J., Blanck, A., y Oesterhelt, D. 1986. Experiments on the isolation of the haloopsin gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 41-48.

- Walsby, A. E. 1980. A square bacterium. *Nature* 283: 69-71.
- Wais, A. C., Kon, M., McDonald, K. E., y Stollar, B. D. 1975. Salt-dependent bacteriophage infecting *Halobacterium cutirubrum* and *H. halobium*. *Nature* 256: 314-315.
- Washington, J. A., II, y Sutter, V. L. 1980. Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. En: *Manual of clinical microbiology*, 3ª ed. Lennette, E. H., Ballows, A., Hausler, W. J. Jr., y Truant, J. P. (Eds.). pp. 453-458. A.S.M., Washington.
- Weidinger, G., Klotz, G., y Goebel, W. 1979. A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuoles formation. *Plasmid* 2: 377-386.
- Weidinger, G., Pfeifer, F., y Goebel, W. 1982. Plasmids in halobacteria: restriction maps. *Methods in Enzymology* 88: 374-379.
- Verber, M. M., Sussman, J. L., y Eisenberg, H. 1986. Molecular basis for the special properties and enzymes from *Halobacterium marismortui*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 129-135.
- Whitman, W. B. 1985. Methanogenic bacteria. En: *The bacteria*. Vol. VIII: Archaeobacteria. Woese, C. R., y Wolfe, R. S. (Eds.). Academic Press, Orlando.
- Wieland, R., Dompert, W., Bernhardt, G., y Sumper, M. 1980. Halobacterial glycoprotein saccharides contain covalentlylinked-sulfate. *FEBS Lett.* 120: 110-114.
- Woese, C. R., y Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryote domain: the primary kingdom. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5088-5090.

Woese, C. R., Magrum, L. J., y Fox, G. E. 1978. Archaeobacteria. J. Mol. Evol. 11: 245-252.

Woese, C. R., y Olsen, J. 1986. Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdom. Syst. Appl. Microbiol. 7: 161-177.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.

Wohlfarth, A., Severin, J., y Galinski, E. A. 1989. Screening for compatible solutes of halophilic eubacteria. En: Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology. Da Costa, M. S., Duarte, J. L., y Williams, R. A. D. pp. 421. Elsevier, London.

Wolfe, R. S. 1971. Microbial formation of methane. Adv. Microbiol. Physiol. 6: 107-146.

Wolfe, R. S. 1979. Methanogens: A surprising microbial group. Antonie van Leeuwenhoek 45: 353-364.

Xu, W. L., y Doolittle, W. F. 1983. Structure of the archaeobacterial transposable element ISH50. Nucleic Acids Res. 11: 4195-4199.

Yankofsky, S. A., y Spiegelman, S. 1962. The identification of ribosomal RNA cistrons by sequence complementarity. I. Specificity of complex formation. proc. Nat. Acad. Sci. 48: 1069-1078.

Yu, I. K., y Kawamura, F. 1987. Halomethanococcus doii gen. nov. sp. nov. an obligately halophilic methanogenic bacterium from solar salt ponds. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 303-310.

Zhilina, T. N., y Zavarzin, G. A. 1987. Methanohalobium evestigatus, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic Archaeobacterium. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 293: 464-468.

Zillig, W., Stetter, K. O., y Tobien, M. 1978. DNA-dependent RNA polymerase from Halobacterium halobium. Eur. J. Biochem. 91: 193-199.

Zillig, W., y Stetter, K. O. 1980. Distinction between the transcription systems of archaeobacteria and eubacteria. En: Genetics and evolution of ARN polymerases, tRNA and ribosomes. Osawa, S. (Ed.). pp. 525-537. University of Tokyo Press, Tokyo.

Zillig, W., Stetter, K. O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H., y Scholz, I. 1980. The Sulfolobus-"Caldariella" group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. Arch. Microbiol. 125: 259-269.

Zillig, W., Stetter, K. O., Schäfer, W., Janekovic, D., Wunderl, S., Holz, I., y Palm, P. 1981. Thermoproteales: A novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from Iceland solfataras. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I, Orig C 2: 205-227.

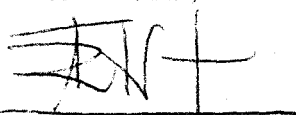
Zillig, W., Klenk, H. P., Palm, P., Pühler, G., y Gropp, F. 1989. The phylogenetic relations of DNA-dependent RNA polymerases of archaeobacteria, eukaryotes and eubacteria. Can. J. Microbiol. 35: 73-80.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. CARLOS GABRIEL MONTERO HERRERO
sobre Estudio Taxonómico y Genético de
Halococcus Saccharolyticus SP. NOV.
concedió orgánicamente la calificación de APTO CUM LAUDE.

Sevilla, 2 de Febrero 1990

El Vocal,



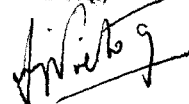
El Presidente

El Vocal,

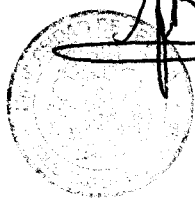


El Secretario,

El Vocal,



El Doctorado,



INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA
Y
PARASITOLOGIA