

Microbiología de los ambientes acuáticos hipersalinos

Antonio Ventosa

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla

El Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla tiene una larga trayectoria en el estudio de la biodiversidad de los ambientes hipersalinos. Aunque sea una definición un tanto simplista, se consideran ambientes hipersalinos aquellos que poseen una concentración salina elevada, generalmente muy superior a la de los hábitats acuáticos marinos y oceánicos. En estos ambientes no sólo la elevada concentración salina limita la microbiota de los mismos, si no que otros factores tales como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto o las radiaciones solares pueden influir seleccionando los tipos de seres vivos que los habitan, que son microorganismos extremófilos que no solo toleran estas condiciones adversas, sino que en muchos casos se encuentran perfectamente adaptados a las mismas y de hecho, requieren para su desarrollo determinadas concentraciones de sal, siendo incapaces de crecer en condiciones de baja salinidad o en ausencia de la misma.

Entre los ambientes hipersalinos que hemos estudiado con más detalle se encuentran las salinas solares de estanque múltiple tan abundantes en nuestras costas españolas y los lagos hipersalinos. Entre las primeras se encuentran las salinas de Santa Pola (Alicante), Huelva, Cádiz, Mallorca o Gran Canaria; en diversos estudios también hemos realizado importantes aportaciones en lagos como el Mar Muerto, lagos hipersalinos localizados en Mongolia Interior (China) y más recientemente en zonas áridas de Irán.

Las salinas solares constituyen sistemas muy interesantes para estudios de biodiversidad y ecología de los ambientes hipersalinos, teniendo en cuenta que las mismas consisten en una serie de estanques con diferentes salinidades, que permiten concentrar el agua salina desde concentraciones bajas como la del agua de mar hasta la saturación de sales, disponiendo por tanto de toda una gama de salinidades que permite la realización de estudios en cada una de las etapas crecientes de salinidad, a diferencia de los lagos hipersalinos, cuya concentración salina es generalmente mucho más estable y por tanto los estudios de biodiversidad son más limitados en cuanto al parámetro salinidad. La abundancia de las salinas tanto costeras como de interior en nuestro país ha permitido que numerosos grupos de investigación en

Sevilla, Granada, Alicante, Mallorca, Barcelona, Madrid, etc. hayan realizado numerosos estudios microbiológicos en las mismas y que en conjunto hayan realizado importantes aportaciones al conocimiento de la microbiota, su actividad metabólica y a las numerosas aplicaciones de los microorganismos halófilos, tanto como modelos biológicos para el estudio de los mecanismos de estrés y supervivencia en condiciones extremas, así como para su utilización en procesos biotecnológicos (producción de solutos compatibles, polímeros y enzimas, utilización en la producción de alimentos, en procesos de biodegradación, etc.).

En los ambientes hipersalinos con más de un 10 % de sales son pocos los organismos eucariotas que forman parte de la microbiota normal de los mismos y fundamentalmente se trata de organismos procariotas, tanto pertenecientes a las arqueas como a las bacterias. Entre los eucariotas que podemos observar en hábitats con salinidades intermedias se encuentran el crustáceo *Artemia salina* o el alga unicelular *Dunaliella*, que puede crecer óptimamente en sistemas con concentraciones de sales de hasta el 20-25 %. Sin embargo, en los hábitats más hipersalinos solamente se encuentran procariotas, pertenecientes tanto al grupo de las arqueas como de las bacterias. Entre las arqueas se encuentran alguna especie metanógenas y fundamentalmente un grupo muy especializado de arqueas aerobias halófilas extremas denominadas haloarqueas. Estas haloarqueas se encuadran actualmente en el orden *Halobacteriales*, con una única familia *Halobacteriaceae* que incluye 29 géneros y más de 100 especies. A modo de ejemplo, cuando comenzamos a realizar estudios en estos ambientes hipersalinos las haloarqueas (entonces denominadas halobacterias, pues se incluían entre las bacterias si bien se consideraban bastante peculiares por sus características tales como la carencia de mureína en su pared celular o la presencia de lípidos polares muy diferentes a los de las otras bacterias) se agrupaban en tan solo dos géneros, *Halobacterium* (especies con morfología bacilar) y *Halococcus* (formas esféricas), desconociéndose que la mayoría de las haloarqueas poseen morfologías muy diversas que van desde células triangulares, poligonales o cuadradas (como la famosa especie *Haloquadratum walsbyi*). En este



Estanques (cristalizadores) de una salina en la que se observa la coloración rosa-roja debido al abundante desarrollo de microorganismos halófilos.

sentido, nuestro grupo (y otros grupos de investigadores de nuestro país) ha realizado importantes aportaciones, describiendo numerosas nuevas especies y géneros de procariontas, en muchos casos en colaboración con otros grupos de investigadores tanto españoles como de otros países. Por su trascendencia debemos citar la descripción de los géneros *Haloferax* y *Haloarcula* (en colaboración con investigadores de Alicante, Dres. Rodríguez Valera, Juez y Torreblanca y los Dres. Kates y Kamekura) y *Haloterrigena* (en colaboración con el Dr. Kamekura), que actualmente incluyen 11, 7 y 8 especies, respectivamente. Sin duda algunos de nuestros estudios más significativos se han basado en el conocimiento de las bacterias halófilas, que habitan junto con las haloarqueas en los ambientes hipersalinos. Estos estudios han sido pioneros y muchas de las bacterias aisladas y caracterizadas por nosotros son objeto de estudios más detallados por parte de otros muchos grupos de investigación, tal es el caso de las bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros *Halomonas* y *Chromohalobacter*. Recientemente hemos realizado un estudio basado en el análisis por secuenciación multilócica (MLSA-Multilocus Sequence Analysis) de las especies, actualmente agrupadas en 10 géneros, pertenecientes a la familia *Halomonadaceae*. El análisis de las secuencias individuales y concatenadas de seis genes (16S rRNA, 23S rRNA, *atpA*, *gyrB*, *rpoD* y *secA*) nos ha permitido determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de este grupo microbiano, poner de manifiesto la importancia de la transferencia horizontal de genes en la evolución de dichas especies y establecer un esquema de clasificación basado en sus relaciones evolutivas.

Particularmente interesantes fueron los estudios relacionados con la microbiota del Mar Muerto que dieron lugar a los estudios de Tesis Doctoral de David Ruiz Arahal (actualmente en la Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia). El estudio permitió realizar un análisis comparativo de la microbiota de dicho lago, utilizando los mismos enriquecimientos que entre 1936 y 1940 Benjamin Elazari-Volcani usó para sus estudios pioneros en el campo del halo-

filismo, en los que puso de manifiesto que no se trataba de un mar “muerto” y que 50 años después y utilizando tanto las técnicas tradicionales como moleculares de caracterización mostraron una enorme diversidad tanto de bacterias halófilas como de haloarqueas (curiosamente incluyendo la especie *Haloferax volcanii* que fue denominada en su honor hace algunos años).

Nos gustaría resaltar que siempre hemos considerado fundamental que la investigación debe basarse en grupos de investigación amplios y trabajando en estrecha colaboración con otros grupos de prestigio nacionales y extranjeros; este hecho se refleja en que un gran porcentaje de nuestras publicaciones han sido realizadas en colaboración con otros grupos. En este sentido, debemos destacar un amplio estudio basado en un proyecto internacional, financiado a través de la Comisión Europea (*MGATech-Multigenome Access Technology for Industrial Catalysts*) y los gobiernos chino y sudafricano, en siete lagos hipersalinos de Mongolia Interior (China) y en los que además de nuestro grupo participaron los de los Dres. Grant (Universidad de Leicester, UK), Cowan (Universidad de Western Cape, Ciudad del Cabo, Sudáfrica), Jones (Genencor International, Holanda) y Yanhe Ma (Instituto de Microbiología, CAS; Beijing, China). Además de estudios relacionados con metagenómica, caracterización de halovirus o de nanoarqueas de ambientes hipersalinos, la aportación al conocimiento de la microbiota de dichos lagos hipersalinos (y alcalinos en el caso de dos de dichos lagos) ha sido de gran importancia. Utilizando técnicas moleculares (secuenciación del gen 16S rRNA) pusimos de manifiesto que la microbiota tanto de arqueas como de bacterias era mucho mayor de la que se había descrito hasta la fecha en ambientes semejantes. Por otro lado, muchos de estos microorganismos poseían características muy diferentes a las de los descritos anteriormente; sirva como ejemplo que en este estudio se aislaron y caracterizaron un número muy elevado de nuevos grupos de procariontas, algunos de los cuales todavía están en estudio, que nos ha permitido la descripción de 3 nuevos géneros y 12 nuevas especies de halo-

arqueas y 4 nuevos géneros y 9 nuevas especies de bacterias halófilas. Es indudable que algunos de estos nuevos microorganismos pueden ser utilizados en el futuro como modelos de estudio por otros grupos de investigadores en campos diversos como genómica o biotecnología.

A lo largo de los años nuestros estudios se han ido adaptando a las tecnología al uso, inicialmente basados en el aislamiento y caracterización siguiendo las técnicas microbiológicas tradicionales, posteriormente quimiotaxonómicas y genéticas y más recientemente moleculares. Actualmente estamos realizando estudios en colaboración con las Dras. Emilia Quesada y Victoria Béjar, de la Universidad de Granada, financiados a través de un proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía, encaminados a la caracterización de nuevos grupos de microorganismos halófilos y a su posible aplicación en la producción de compuestos de interés biotecnológico. Por otro lado, estamos iniciando estudios de metagenómica en ambientes hipersalinos, precisamente en las mismas salinas que sirvieron para nuestras primeras investigaciones, localizadas en Santa Pola (Alicante) y en salinas de la provincia de Huelva, en estrecha colaboración con el grupo del Dr. Francisco Rodríguez Valera, de la Universidad Miguel Hernández de Alicante. Los resultados iniciales en dos estanques seleccionados, uno con salinidad intermedia y un cristalizador, son muy prometedores, confirmando muchas de las conclusiones de estudios de biodiversidad realizados anteriormente utilizando técnicas tradicionales, si bien observamos una mayor diversidad y sobre todo la presencia de grupos de microorganismos no relacionados con los aislados y descritos hasta la actualidad; el reto será diseñar nuevas estrategias que nos permitan proceder a su aislamiento y al estudio del papel que dichos microorganismos puedan jugar en estos sistemas salinos.

PUBLICACIONES RECIENTES SELECCIONADAS

- A.M. Castillo, M.C. Gutiérrez, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2006). *Halostagnicola larsenii* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1519-1524.
- M.C. Gutiérrez, A.M. Castillo, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2007). *Halopiger xanaduensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline lake Shangmatala in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1402-1407.
- I.J. Carrasco, M.C. Márquez, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2008). *Sediminibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1961-1967.
- M.C. Márquez, I.J. Carrasco, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2008). *Aquisalibacillus elongatus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium of the family *Bacillaceae* isolated from a saline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1922-1926.
- C. Sánchez-Porro, E. Mellado, A. P. Pugsley, O. Francetic and A. Ventosa (2009). The haloprotease CPI produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* is secreted by the type II secretion pathway. *Appl. Environm. Microbiol.* **75**: 4197-4201.
- E. Pagalin, H. Wang, M. Venables, A. Wallace, W. D. Grant, D. A. Cowan, B. E. Jones, Y. Ma, A. Ventosa and S. Heaphy (2009). Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5750-5760.
- C. Sanchez-Porro, M. A. Amoozegar, R. Robban, M. Hajighasemi and A. Ventosa (2009). *Thalassobacillus cyri* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2565-2570.
- R. R. de la Haba, D. R. Arahal, M. C. Márquez and A. Ventosa (2010). Phylogenetic relationships within the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 737-748.