

Metagenómica y biodiversidad de ambientes extremos

Antonio Ventosa, Cristina Sánchez-Porro y Rafael R. de la Haba.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Sevilla



Integrantes del grupo de investigación en la actualidad (de izquierda a derecha): Antonio Ventosa, Ana B. Fernández, Paulina Corral, Carmen Infante, Clara López Hermoso, M.ª José León, Cristina Sánchez-Porro y Rafael R. de la Haba.

Nuestro grupo inició sus estudios, hace tres décadas, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla, relacionados con la diversidad y taxonomía de bacterias y arqueas halófilas, que posteriormente se extendieron a otros aspectos, como la fisiología, la genética o las aplicaciones biotecnológicas de éstos y otros microorganismos extremófilos. Durante estos años son muchos los investigadores que han participado o se han formado en este campo en nuestro Departamento. En la actualidad nuestro grupo posee financiación a través de programas nacionales (proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación «Biodiversidad microbiana de ambientes hipersalinos basada en estudios metagenómicos»), internacionales (proyecto financiado por la NSF-National Science Foundation «Toward comprehending prokaryotic species using *Halorubrum* sp. as a model», en colaboración con el Dr. Thane Papke, de la Universidad de Connecticut en Storrs, USA) y autonómicos (proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía «Biodiversidad microbiana de suelos salinos: una aproximación molecular y metagenómica», en

colaboración con el grupo de la Dra. Emilia Quesada, de la Universidad de Granada). Nuestras investigaciones actuales se centran en tres aspectos fundamentales que describimos a continuación.

METAGENÓMICA DE AMBIENTES HIPERSALINOS

Los ambientes hipersalinos son ejemplos típicos de medios ambientes extremos, caracterizados por su elevada concentración salina, si bien otros factores ambientales, tales como la temperatura, el pH o la irradiación solar también pueden contribuir a limitar la microbiota de los mismos. Entre ellos, los lagos hipersalinos y las salinas son ejemplos de hábitats que han sido objeto de numerosos estudios microbiológicos. Nuestro grupo ha realizado importantes aportaciones en el estudio de estos ambientes, fundamentalmente en salinas, tan abundantes en nuestro país, que constituyen excelentes modelos de estudio de

adaptación de las comunidades microbianas a diferentes salinidades, desde una concentración salina correspondiente a la del agua de mar hasta la saturación de sales, que ocurre en los estanques de las salinas denominados cristalizadores, en los cuales la microbiota presente está limitada a unos cuantos tipos de microorganismos (arqueas y bacterias) que se encuentran perfectamente adaptados a estas condiciones extremas.

Son muchos los estudios realizados en estos hábitats hipersalinos durante las últimas décadas, utilizando las metodologías disponibles en cada momento. La mayoría de estos estudios se han basado en el aislamiento y cultivo de los microorganismos presentes en estos ambientes mediante técnicas tradicionales, limitadas al cultivo de una proporción muy pequeña del total de la microbiota de estos hábitats y posiblemente no representativa de los mismos y más recientemente, mediante técnicas moleculares independientes de cultivo, que han permitido conocer en mayor detalle la microbiota de dichos ambientes hipersalinos.

La metagenómica permite la secuenciación directa de una muestra de ADN sin necesidad de aislar y cultivar los microorganismos, mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS). Recientemente hemos iniciado estudios metagenómicos de varios estanques de la salina de estanque múltiple «Bras del Port», localizada en Santa Pola, Alicante, que posiblemente constituye el ambiente hipersalino mejor conocido y que ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos 30 años por diversos grupos tanto españoles como de otros países. De hecho, a partir de esta salina se han descrito varios géneros (*Haloferox*, *Haloarcula* y *Haloquadratum*) y especies de haloarqueas (*Haloferox mediterranei*, *Haloferox gibbonsii*, *Haloferox lucentense* o *Haloarcula hispanica*), así como numerosas especies de bacterias halófilas (*Salinibacter ruber*, *Salinicoccus roseus*, *Chromohalobacter marismortui* o *Salinivibrio costicola*, entre otras).

Los estudios metagenómicos que estamos realizando en la actualidad, en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Rodríguez Valera, de la Universidad Miguel Hernández de Alicante, nos han permitido conocer en mayor profundidad tanto la diversidad filogenómica como metabólica de cuatro estanques de la salina «Bras del Port», con salinidades del 13%, 19%, 33% y 37%, respectivamente. El análisis de los metagenomas obtenidos a partir de muestras de agua de dichos estanques que cubren un amplio rango salino de estos sistemas de salinas ha permitido confirmar la presencia o abundancia de grupos microbianos ya conocidos y descritos previamente, como es el caso de la haloarquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* o la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber*. Asimismo, hemos determinado que los microorganismos que se aíslan habitualmente utilizando los medios de cultivo convencionales, tales como las haloarqueas del género *Halorubrum* o las bacterias pertenecientes a los géneros *Halomonas* o *Salinivibrio*, no constituyen la proporción mayoritaria de los estanques de dicha salina. Por otro lado, hemos observado la presencia de nuevos grupos, no detectados anteriormente, que constituyen una proporción importante de la microbiota de los mismos, entre ellos dos representantes del phylum *Euryarchaeota*,

uno de bajo y otro de alto contenido en G+C, así como una bacteria perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*.

Por otro lado, recientemente hemos iniciado estudios microbiológicos de suelos salinos, en colaboración con los grupos de la Dra. Emilia Quesada y del Dr. Francisco Rodríguez Valera, combinando técnicas metagenómicas con técnicas moleculares así como tradicionales de cultivo.

ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MULTILÓCICA (MLSA) DE ARQUEAS Y BACTERIAS HALÓFILAS

En colaboración con el Dr. Thane Papke estamos realizando un análisis por secuenciación multilócica (MLSA, «Multi-locus Sequence Analysis») de haloarqueas que contribuya a establecer una mejor clasificación de los géneros y especies de la familia *Halobacteriaceae*. Debemos tener en cuenta que en algunas especies de haloarqueas se ha observado la presencia de diferentes operones ribosómicos y en el caso del gen ARNr 16S pueden existir diferencias entre las distintas copias que pueden llegar a ser superiores al 5%. Por otro lado, la hibridación ADN-ADN (tradicionalmente utilizada para definir especies en procariotas) es una técnica muy laboriosa y que no permite almacenar la información en bases de datos, que puedan ser comparadas en estudios posteriores. Nuestro objetivo en este proyecto consiste en establecer un esquema de clasificación de las haloarqueas basado en un análisis MLSA, del que se pueda disponer mediante un acceso libre por parte de los investigadores. Pretendemos completar estos estudios mediante la comparación de estos datos con los de hibridación ADN-ADN, el análisis de los lípidos polares mediante técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF) y la caracterización fenotípica mediante las técnicas convencionales de caracterización.

Por otro lado, nuestro grupo está realizando estudios de MLSA en otros grupos de bacterias halófilas, que permitan establecer una correcta clasificación de las mismas basada en las relaciones filogenéticas de los diferentes taxones, tales como en las especies de la familia *Halomonadaceae* y más recientemente en el género *Salinivibrio*.

NUEVOS GRUPOS DE PROCARIOTAS DE AMBIENTES HIPERSALINOS

Los estudios metagenómicos descritos anteriormente indican que algunos microorganismos que son abundantes y constituyen una proporción significativa de los ambientes hipersalinos no han sido todavía aislados, ni se conoce su papel ecológico ni sus potencialidades metabólicas en estos hábitats. Por ello, hemos iniciado un proyecto encaminado al aislamiento y caracterización de estos microorganismos, utilizando la información obtenida mediante el análisis metagenómico (fundamentalmente de los genes relacionados con el metabolismo) que nos permita obtener en cultivo puro estos nuevos grupos de microorganismos extremófilos. Muy recién-

temente hemos aislado algunas cepas que están relacionadas con la bacteria perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria* anteriormente citada, y en la actualidad estamos procediendo a la secuenciación y análisis de su genoma, que nos permitirá comparar en detalle el mismo con las bases de datos metagenómicas y confirmar que se trata de uno de los microorganismos abundantes en estos sistema hipersalinos, fundamentalmente en estanques con salinidades intermedias y conocer sus habilidades metabólicas. Asimismo, hemos aislado otros grupos de bacterias y arqueas que están siendo caracterizados taxonómicamente y que posiblemente constituyan nuevos taxones no descritos previamente.

Por otro lado, desde hace algunos años venimos realizando estudios en colaboración con el Dr. Mohammad Ali Amoozegar, de la Universidad de Teherán, relacionados con la diversidad de lagos hipersalinos en Irán y las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos aislados de dichos ambientes y con el grupo de la Dra. Meral Birbir, de la Universidad Marmara, en Estambul (Turquía), estudiando los microorganismos halófilos relacionados con el proceso de tratamiento de las pieles y las alteraciones que originan, ya que la industria peletera es muy importante en ese país y el conocimiento de la microbiota presente en las mismas y sus alteraciones puede resultar de enorme interés para su tratamiento.

Por último, debemos reseñar que venimos manteniendo una estrecha colaboración con otros grupos de investigadores nacionales y extranjeros, muy especialmente con el grupo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense (Dres. A. Vela, J.F. Fernández-Garayzábal, L. Domínguez y la Lcda. L. Zamora), acerca de estudios de caracterización taxonómica de nuevas especies de los géneros *Chryseobacterium* y *Flavobacterium* relacionados con patologías de peces.

PUBLICACIONES RECIENTES SELECCIONADAS

Libro

Ventosa A, Oren A, Ma Y. (eds.) (2011). Halophiles and Hypersaline Environments. Current Research and Future Trends. Springer, Heidelberg.

Capítulos de libro

de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A. (2011). Taxonomy of Halophiles. En: Extremophiles Handbook. K. Horikoshi (ed.). pp. 255-308. Springer, Tokyo.

de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Ventosa A. (2011). Taxonomy, phylogeny, and biotechnological interest of the family *Halomonadaceae*. En: Halophiles and Hypersaline Environments. Current Research and Future Trends. A. Ventosa, A. Oren and Y. Ma (eds.). Springer, Heidelberg.

Artículos en revistas

de la Haba RR, Arahál DR, Márquez MC, Ventosa A. (2010). Phylogenetic relationships within the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. Int J Syst Evol Microbiol 60: 737-748.

de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A. (2010). Taxonomic study of the genus *Salinicola*: transfer of *Halomonas salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. Int J Syst Evol Microbiol 60: 963-971.

Sánchez-Porro C, Amoozegar MA, Fernandez AB, Babavalian Fard H, Ramezani M, Ventosa A. (2010). *Lentibacillus persicus* sp. nov., a moderately halophilic species isolated from a saline lake. Int J Syst Evol Microbiol 60: 1407-1412.

Sánchez-Porro C, Kaur B, Mann H, Ventosa A. (2010). *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS *Titanic*. Int J Syst Evol Microbiol 60: 2768-2774.

Sánchez-Porro C, Yilmaz P, de la Haba RR, Birbir M, Ventosa A. (2011). *Thalassobacillus pellis* sp. nov., a moderately halophilic, Gram-positive bacterium isolated from salted hides. Int J Syst Evol Microbiol 61: 1206-1210.

Márquez MC, Carrasco IJ, de la Haba RR, Jones BE, Grant WD, Ventosa A. (2011). *Bacillus locisalis* sp. nov., a new haloalkaliphilic species from hypersaline and alkaline lakes of China, Kenya and Tanzania. Syst Appl Microbiol 34: 424-428.

de la Haba RR, Yilmaz P, Sánchez-Porro C, Birbir M, Ventosa A. (2011). *Salimicrobium salexigens* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from salted hides. Syst Appl Microbiol 34: 435-439.

Ghai R, Pasic L, Fernández AB, Martín-Cuadrado A-B, Mizuno CM, McMahon KD, Papke RT, Stepanauskas R, Rodríguez-Brito B, Rohwer F, Sánchez-Porro C, Ventosa A, Rodríguez-Valera F. (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. Scientific Reports 1: 135.

Papke RT, White E, Reddy P, Weigel G, Kamekura M, Minegishi H, Usami R, Ventosa A. (2011). A multilocus sequence analysis (MLSA) approach to *Halobacteriales* phylogeny and taxonomy. Int J Syst Evol Microbiol 61: 2984-2995.

Zamora L, Fernández-Garayzábal JF, Palacios MA, Sánchez-Porro C, Svensson-Stadler LA, Domínguez L, Moore ERB, Ventosa A, Vela AI. (2012). *Chryseobacterium oncorhynchi* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Syst Appl Microbiol 35: 24-29.

de la Haba RR, Márquez MC, Papke RT, Ventosa A. (2012). Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae*. Int J Syst Evol Microbiol 62: 520-538.

Angelini R, Corral P, Lopalco P, Ventosa A, Corcelli A. (2012). Novel ether lipid cardiolipins in archaeal membranes of extreme haloalkaliphiles. Biochim Biophys Acta (BBA Biomembranes) 1818: 1365-1375.

Bagueri M, Didari M, Amoozegar MA, Schumann P, Sánchez-Porro C, Mehrsad M, Ventosa A. (2012). *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol 62: 811-816.

Makhdomi-Kakhki A, Amoozegar MA, Ventosa A. (2012). *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and *Salinibacter ruber*. Int J Syst Evol Microbiol 62: 1521-1527.

Pagalíng E, Grant WD, Cowan DA, Jones BE, Ma Y, Ventosa A, Heaphy S. (2012). Bacterial and archaeal diversity in two hot spring microbial mats from the geothermal region of Tengchong, China. Extremophiles 16: 607-618.

Zamora L, Vela AI, Palacios MA, Sánchez-Porro C, Moore ERB, Domínguez L, Ventosa A, Fernández-Garayzábal JF. (2012). *Chryseobacterium tractae* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Syst Appl Microbiol 35: 315-319.

Amoozegar MA, Makhdomi-Kakhki A, Shahzede Fazeli SA, Azarbaijani R, Ventosa A. (2012). *Halopenitus persicus* gen. nov., sp. nov., an archaeon from an inland salt lake. Int J Syst Evol Microbiol 62: 1932-1936.