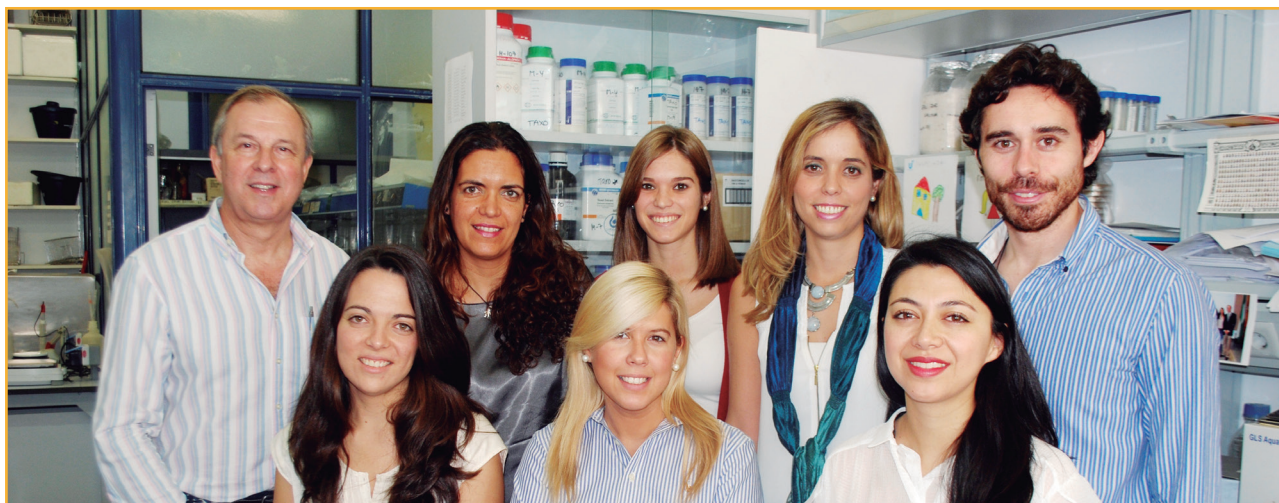


# Metagenómica y sistemática molecular de microorganismos halófilos

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

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

ventosa@us.es



**Foto de grupo.** De izquierda a derecha: Antonio Ventosa, Cristina Sánchez-Porro, Ana Durán, Carmen infante y Rafael R. de la Haba. Sentadas (de izquierda a derecha): Blanca Vera, Clara López Hermoso y Paulina Corral.

Los ambientes hipersalinos, tales como las salinas o los lagos y suelos hipersalinos, son ambientes extremos en los que los microorganismos deben adaptarse a condiciones de elevada salinidad y en muchos casos a valores extremos de temperatura, pH, concentración de nutrientes, etc. Los microorganismos halófilos que habitan estos ambientes están representados por algunos eucariotas, si bien los mejor adaptados a dichas condiciones extremas son arqueas y bacterias. Las salinas de estanque múltiple, tan abundantes en nuestra geografía, constituyen excelentes modelos para el estudio de la diversidad microbiana y la ecología molecular de los ambientes hipersalinos, pudiéndose estudiar estanques con concentraciones salinas comprendidas entre la del agua de mar y la saturación de sales.

Nuestro grupo viene trabajando en estudios relacionados con diferentes aspectos de los microorganismos halófilos y los ambientes hipersalinos en los que se encuentran, desde su biodiversidad, relaciones evolutivas, filogenómica y taxonomía, etc. En los últimos años hemos realizado una serie de estudios metagenómicos en estanques de salinas localizadas en la costa mediterránea (salinas de Santa Pola, Alicante) así como atlántica (salinas de Isla Cristina, Huelva). Estos estudios han permitido conocer

más detalladamente la diversidad taxonómica y metabólica de los estanques con salinidades intermedias, del 13 al 33% de sales totales, en comparación con los estanques cristalizadores que ya habían sido objeto de estudios más detallados utilizando tanto técnicas tradicionales de cultivo como moleculares independientes de cultivo. Uno de los ambientes hipersalinos mejor estudiados desde el punto de vista microbiológico son las salinas «Bras del Port» de Santa Pola, de las que recientemente se ha publicado un artículo de revisión (Ventosa *et al*, 2014). A diferencia de los estanques cristalizadores, en los que existe un predominio de la arquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* y de la bacteria halófila *Salinibacter ruber*, en los estanques concentradores con salinidades intermedias existe una mayor diversidad de especies pertenecientes a nueve taxones superiores. El ensamblaje de contigs a partir de las secuencias metagenómicas nos ha permitido detectar la abundante presencia de nuevos representantes de los dominios Archaea y Bacteria en estanques concentradores intermedios, como la nanohaloarquea «*Candidatus Haloredivivus*», nuevas haloarqueas relacionadas con el género *Halorubrum* y una nueva *Gammaproteobacteria*, relacionada filogenéticamente con el género *Alkalilimnicola*.

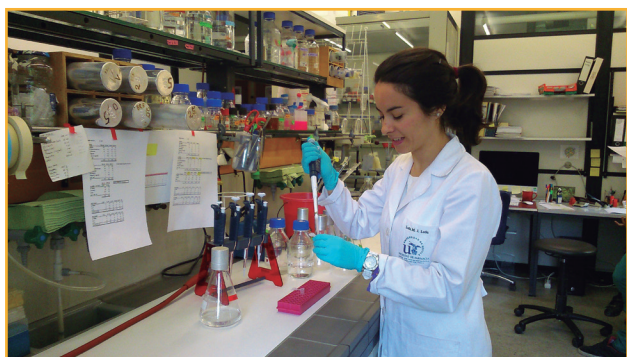


Figura 1. M<sup>a</sup> José León en el laboratorio.

Los estudios metagenómicos realizados en las salinas nos han permitido desarrollar distintas estrategias enfocadas al aislamiento y caracterización de nuevos representantes abundantes en las salinas, entre ellas la bacteria perteneciente a la clase *Gammaproteobacteria*, a la que hemos designado como *Spiribacter salinus* (León *et al.*, 2014). El análisis del genoma completo de dicha bacteria ha permitido determinar que se trata de un microorganismo que posee un genoma muy sencillo, con un tamaño de 1,74 MB (el más pequeño descrito para un representante de la familia *Ectothiorhodospiraceae* a la que pertenece), un contenido en G+C de 62,7% y un único operón rRNA. *Spiribacter salinus* posee una versatilidad metabólica muy simplificada, mostrando características típicas de otros microorganismos oligotrofos que alcanzan altas densidades en ambientes acuáticos (López-Pérez *et al.*, 2013). Una de las peculiaridades de esta bacteria es su morfología celular: se trata de un bacilo Gram-negativo curvado en cultivos jóvenes que posteriormente forma espirales; en fase estacionaria tienden a condensarse formando una espiral compacta. Algunas de estas células se rodean de una envoltura externa semejante a la descrita en *Thermus* u *Oceanothermus*. Algunos aspectos que hemos estudiado en detalle de esta nueva bacteria son la composición de los lípidos polares de sus membranas, la estructura de la mureína de la pared celular o su mecanismo de osmorregulación (posee una estrategia «salt-out»). Sin duda alguna los estudios metagenómicos recientes permitirán avanzar en el conocimiento de la biodiversidad de los ambientes hipersalinos y de los mecanismos de adaptación de los microorganismos a dichos ambientes extremos, así como al aislamiento y caracterización de los microorganismos más abundantes en dichos hábitats.

Otro aspecto que nuestro grupo está estudiando en la actualidad es la aplicación de técnicas genómicas en sistemática microbiana. En la actualidad el principal marcador filogenético utilizado en la taxonomía de procariotas es el gen ARNr 16S, si bien presenta ciertas limitaciones como su alto grado de conservación que no permite distinguir en muchos casos entre especies estrechamente relacionadas, su elevada frecuencia de recombinación entre cepas cercanas o la presencia de múltiples copias divergentes. Por ello, hemos

realizado diversos estudios basados en marcadores filogenéticos alternativos, para llevar a cabo un análisis por secuenciación multilocus (MLSA), estudiando tanto las secuencias individuales de genes *housekeeping* como las secuencias concatenadas. Entre los grupos estudiados se encuentran bacterias pertenecientes a la familia *Halomonadaceae* o arqueas del género *Halorubrum*. En éste último grupo hemos realizado un análisis comparativo del esquema MLSA con respecto a la hibridación ADN-ADN (que nos ha permitido validar dicho esquema), así como con respecto a la composición de los lípidos polares mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (ampliamente utilizada en este grupo de arqueas como marcador quimiotaxonomico) y la secuenciación y análisis comparativo de algunos genomas completos.

## PUBLICACIONES RECIENTES

- 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.
- 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.
- Leon MJ, Ghai R, Fernandez AB, Sanchez-Porro C, Rodriguez-Valera F, Ventosa A. (2013). Draft genome of *Spiribacter salinus* M19-40, an abundant Gammaproteobacterium in aquatic hypersaline environments. *Genome Announc.* 1:e00179-12.
- López-Pérez M, Ghai R, Leon MJ, Rodríguez-Olmos A, Copa-Patiño JL, Soliveri J, Sanchez-Porro C, Ventosa A, Rodríguez-Valera F. (2013). Genomes of «*Spiribacter*», a streamlined, successful halophilic bacterium. *BMC Genomics* 14:787.
- Fernandez AB, Ghai R, Martin-Cuadrado A-B, Sanchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2013). Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline ponds of a marine saltern in Santa Pola, Spain. *Genome Announc.* 1:e00933-13.
- Fullmer MS, Soucy SM, Swithers KS, Makkay AM, Wheeler R, Ventosa A, Gogarten JP, Papke RT. (2014). Population and genomic analysis of the genus *Halorubrum*. *Front. Microbiol.* 5:140.
- Mohan NR, Fullmer MS, Makkay AM, Wheeler R, Ventosa A, Naor A, Gogarten JP, Papke RT. (2014). Evidence from phylogenetic and genome fingerprinting analysis suggests rapidly changing variation in *Halorubrum* and *Haloarcula* populations. *Front. Microbiol.* 5:143.
- Fernandez AB, Ghai R, Martin-Cuadrado A-B, Sanchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014). Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88:623-635.
- Fernández AB, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C, Ghai R, Papke RT, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front. Microbiol.* 5:196.
- León MJ, Fernández AB, Ghai R, Sanchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014). From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:3850-3857.
- Ventosa A, Fernández AB, León MJ, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F. (2014). The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* 18:811-824.
- León MJ, Sanchez-Porro C, de la Haba RR, Llamas I, Ventosa A. (2014). *Larsenia salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halomonadaceae* based on multilocus sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 37:480-487.