

Por fin una auténtica bacteria halófila moderada

Spiribacter salinus

Antonio Ventosa

Universidad de Sevilla

Presidente del Grupo de Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad

Las salinas marinas constituyen excelentes modelos para el estudio de los microorganismos halófilos ya que están constituidas por una serie de estanques que presentan un gradiente de salinidad, desde la correspondiente a la del agua de mar hasta la saturación de sales. Teniendo en cuenta lo abundantes que son las salinas en nuestras costas, con una enorme importancia histórica y comercial para la producción de sal común, no es de extrañar que muchos microbiólogos españoles hayamos dedicado nuestra atención al estudio de la microbiota de las mismas y a diferentes aspectos tanto de investigación básica como aplicada de los microorganismos que las habitan, especialmente las bacterias y arqueas halófilas y más recientemente los virus.

Como en otros muchos campos científicos, tratamos de clasificar a los diferentes organismos en categorías. En éste caso la clasificación se basa en las diferentes relaciones de los microorganismos con respecto a la sal; tradicionalmente se han utilizado varios criterios, como es el rango salino, si bien uno muy ampliamente utilizado por la comunidad científica se basa en la respuesta de los microorganismos (cultivos puros) frente al NaCl con respecto al crecimiento óptimo de los mismos en condiciones determinadas experimentalmente en el laboratorio. Esta clasificación se debe a Donn J. Kushner, científico canadiense a quien podemos considerar como el padre de la microbiología de los ambientes hipersalinos, por sus estudios pioneros en este campo, que tuvo una gran influencia en muchos de nosotros cuando nos iniciamos como jóvenes investigadores en el estudio de los microorganismos halófilos. En gran medida, su criterio de clasificación ha perdurado en el tiempo gracias a nuestro empeño y difusión de sus ideas.

En concreto, en dos de sus ya clásicos artículos de revisión (Kushner, 1978; Kushner y Kamekura, 1988) clasificaba a los microorganismos como «halófilos débiles», si crecen mejor en medios conteniendo entre 0,2 y 0,5 M NaCl, «halófilos moderados» si crecen mejor en medios conteniendo de 0,5 a 2,5 M NaCl y «halófilos extremos», cuando crecen mejor en medios conteniendo entre 2,5 a 5,2 M (saturación) NaCl. Además indicaba otras dos categorías: los microorga-

nismos «no halófilos», que crecen mejor en medios conteniendo menos de 0,2 M NaCl y los «halotolerantes», que no requieren NaCl en una cantidad sustancial pero que pueden tolerar altas concentraciones salinas. Esta clasificación sigue siendo ampliamente utilizada por la mayoría de los microbiólogos que nos dedicamos a estos estudios y con frecuencia forma parte de la introducción de artículos científicos, Tesis Doctorales, conferencias, etc... No obstante, el conocimiento más detallado de los ambientes hipersalinos y de los microorganismos halófilos que los habitan hace cada vez más difícil encuadrar a algunos de los nuevos aislados que obtenemos de los ambientes salinos en alguna de las citadas categorías. Por otra parte, la clasificación indica que las diferentes categorías se basan en el crecimiento óptimo en medios (de laboratorio) de la especie u organismo en cuestión, pero no tiene en cuenta la posible respuesta del microorganismo en el propio ambiente natural en el que se encuentra o a partir del cual se aisló.

Por otro lado, esta clasificación encajaba muy bien en la idea de que los microorganismos presentes en los ambientes hipersalinos eran tanto bacterias como arqueas (haloarqueas) que se encuadraban en las categorías de halófilas moderadas y halófilas extremas, respectivamente. Sin embargo, en el transcurso de los años y con el avance de los conocimientos hemos visto cómo muchas de las haloarqueas crecen de forma óptima a concentraciones de NaCl inferiores a las descritas inicialmente para los halófilos extremos y podrían encajar en la categoría de microorganismos halófilos moderados y por otro lado, se han aislado y estudiado un número significativo de bacterias que crecen óptimamente en el rango descrito para los microorganismos halófilos extremos, entre ellas *Salinibacter ruber*, una bacteria perteneciente al phylum *Bacteroidetes* que junto con la haloarquea *Haloquadratum walsbyi* constituyen la mayor parte de la microbiota de los estanques cristalizadores de las salinas, a cuyas aguas les imparten un color rojo-rosa característico debido a su pigmentación y a la elevada densidad celular de las mismas.

Una de las salinas que ha sido objeto de numerosos estudios microbiológicos, posiblemente el ambiente

hipersalino mejor conocido de nuestro planeta, en el cual muchos de nosotros hemos realizado nuestros estudios de Tesis Doctoral y en algunos casos hemos venido investigando durante más de 30 años, son las salinas «Bras del Port» de Santa Pola, en la provincia de Alicante. Allí realizó sus estudios (pioneros) de Tesis Doctoral nuestro compañero el Prof. Francisco Rodríguez Valera, con quien comparto una gran amistad y a quien tanto admiro y reconozco, entre los años 1974-1978, que tuvieron una continuación en mis estudios de doctorado desde 1977 a 1981. Posteriormente son muchos investigadores los que han venido estudiando este ambiente, utilizando las diversas metodologías al uso en cada momento, basadas inicialmente en técnicas dependientes de cultivo y posteriormente en técnicas moleculares independientes de cultivo. Durante los últimos años nuestro grupo de investigación ha venido realizando, en colaboración con el del Dr. Rodríguez Valera (Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante), estudios basados en una aproximación metagenómica de diversos estanques de la citada salina de Santa Pola y más recientemente de una salina de Isla Cristina, en Huelva. Estos estudios nos han permitido conocer con detalle la diversidad tanto taxonómica como metabólica de la comunidad procariótica de una serie de estanques intermedios (con salinidades del 13, 19, 21 y 33 % de sales totales) denominados concentradores, así como de un cristalizador con una concentración de sales del 37 %.

A pesar de los extensos estudios realizados en estos ambientes salinos durante tantos años, los resultados obtenidos hasta la fecha mediante una aproximación metagenómica han proporcionado un gran número de sorpresas, si bien han permitido corroborar otras investigaciones realizadas anteriormente. La microbiota de los estanques cristalizadores está constituida de forma mayoritaria por haloarqueas, fundamentalmente la bien conocida y no hace mucho tiempo aislada en cultivo puro haloarquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* y la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber*. No obstante, hemos determinado la presencia de forma más o menos abundante de otros grupos microbianos no aislados hasta la fecha, como la nanohaloarquea «*Candidatus Haloredivivus*» (Ghai y col., 2011). Es necesario, por tanto ponerse de nuevo a la caza de estos microbios no detectados anteriormente y a su aislamiento y caracterización. A diferencia de los cristalizadores, en los que tanto representantes de *Euryarchaeota* como *Bacteroidetes* son los grupos predominantes, en los estanques de salinidad intermedia estudiados hemos observado una gran diversidad, constituida fundamentalmente por representantes de siete phyla o clases diferentes, con un predominio de *Euryarchaeota*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Verrucobacteria*, etc. y muy escasa representación de grupos que se aíslan muy frecuentemente de estos ambientes, como los pertenecientes al phylum *Firmicutes* (Fernández y col., 2014a, 2014b).

Los análisis detallados de las bases de datos metagenómicas nos han permitido realizar el ensamblaje de contigs y determinar con mayor detalle las característi-

cas de los microorganismos más abundantes en dichos ambientes salinos. Así, observamos entre otros, un grupo de gammaproteobacterias muy abundante en estanques con salinidades intermedias (que estimamos puede llegar a constituir hasta el 15 % del total de la microbiota de los mismos), relacionado filogenéticamente, aunque de forma remota, con especies de los géneros *Alkalilimnicola*, *Arhodomonas* y *Nitrococcus* y que no había sido aislado en cultivo puro anteriormente. Los estudios metagenómicos han sido fundamentales para poner de manifiesto su abundancia y diseñar medios y condiciones de cultivo que posibilitaran el aislamiento, no sin cierta dosis de paciencia y trabajo intenso, por parte de mi colaboradora María José León. A partir de agua de un estanque de la salina de Isla Cristina aisló una cepa, denominada M19-40, que constituye un nuevo género y especie de la familia *Ectothiorhodospiraceae*, a la que hemos denominado *Spiribacter salinus* (León y col., 2014), teniendo en cuenta su peculiar morfología celular en espiral y su crecimiento óptimo al 10-15 % NaCl. También sabemos que este nuevo «grupo» de bacterias halófilas no está supeditado a una única especie, pues el grupo de los Dres. Copa-Patiño y Soliveri (Universidad de Alcalá de Henares) han aislado a partir de la salina de Santa Pola otra cepa que constituye una segunda especie de éste género y actualmente estamos estudiando otra serie de aislados recientes relacionados con este nuevo grupo bacteriano.

Sin duda alguna la nueva bacteria halófila *Spiribacter salinus* constituye un excelente modelo para el estudio de los microorganismos halófilos, ya que se trata de una bacteria muy abundante en los ambientes naturales y posee una serie de características peculiares diferentes a las que presentan otras bacterias que de forma clásica se han venido utilizando como organismos modelo, como representantes de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter* o *Halobacillus*, entre otros. Recientemente hemos secuenciado el genoma de *Spiribacter salinus* (León y col., 2013) y el análisis del mismo (López-Pérez y col., 2013) nos ha permitido determinar que se trata de un microorganismo muy bien adaptado a los ambientes salinos, con una estrategia «salt-out» y una osmorregulación basada en el transporte y/o acumulación de solutos compatibles. El genoma consiste en un único replicón, con un tamaño de 1,7 Mbp, siendo el genoma más pequeño de los descritos para especies de la familia *Ectothiorhodospiraceae* y entre las bacterias halófilas. Posee un único operón rRNA, siendo un genoma muy simplificado, con un valor promedio de espacio intergénico de 14-19 nucleótidos. *Spiribacter salinus* posee una versatilidad metabólica muy reducida, un metabolismo heterótrofo y otras características típicas de los microorganismos oligotrofos planctónicos que poseen genomas sencillos y que alcanzan elevadas densidades celulares en ambientes acuáticos, como es el caso de *Candidatus Pelagibacter* en aguas de origen oceánico (López-Pérez y col., 2013). La morfología de esta nueva bacteria es asimismo un tanto peculiar, observándose en cultivos puros jóvenes células curvadas pequeñas, con una tendencia a la formación de largas células con morfología

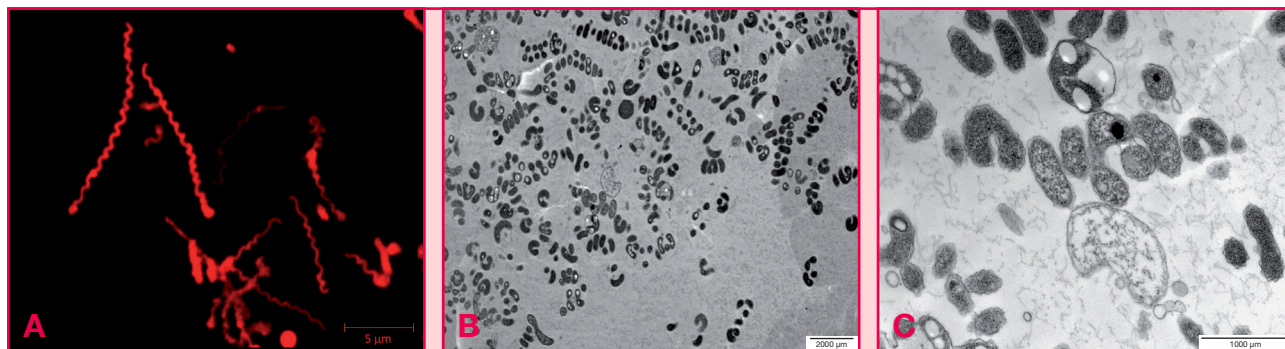


Figura 1. Microfotografías mostrando la morfología celular de *Spiribacter salinus*. A. Microscopía confocal. B y C. Microscopía electrónica de transmisión (María José León, Cristina Sánchez-Porro y Antonio Ventosa).

espiral en cultivos en fase estacionaria (Figura 1). Algunas espirales están rodeadas de una envoltura externa que recuerda los «rotund bodies» descritos para *Thermus* y algunas bacterias marinas (si bien en estos casos se observan varias células rodeadas de dichas envolturas y en el caso de *Spiribacter* se trata de una única célula) (León y col., 2014). Por ahora desconocemos la función de dichas estructuras, que hemos observado en condiciones de laboratorio, si se producen también en condiciones medioambientales y si tienen alguna relación con el carácter oligotrofo de este microorganismo.

Comenzaba este breve artículo indicando que la clasificación de los microorganismos halófilos en las diferentes categorías se ha venido realizando en base al crecimiento óptimo de los mismos en condiciones de laboratorio. Sin embargo, no existen estudios concluyentes que indiquen que las denominadas «bacterias halófilas moderadas» en realidad crezcan y se encuentren adaptadas a los ambientes naturales en el rango salino que se ha determinado en las condiciones de laboratorio y de hecho, muchas de las bacterias que se aíslan más frecuentemente en los medios de laboratorio no constituyen una proporción significativa de dichos ambientes acuáticos salinos; de hecho, posiblemente su hábitat natural sea el medio marino (en el cual también existen zonas de elevadas salinidades), de donde proviene el agua que alimenta a los estanques de las salinas. Pues bien, los estudios de reclutamiento, es decir de comparación del genoma de *Spiribacter salinus* con las secuencias de los metagenomas obtenidos a partir del agua de los estanques estudiados han permitido determinar que dicha bacteria es muy abundante en estanques con salinidades comprendidas entre el 13 y 21 % de sales totales. Sin embargo, se encuentra prácticamente ausente en estanques con elevadas salinidades (33-37 % de sales), así como en ambientes de baja salinidad y en aguas marinas (León y col., 2014). Algunos colegas han venido manifestando a lo largo de los años su desconfianza acerca de la existencia de las denominadas «bacterias halófilas moderadas» y consideraban que se podría tratar de un artefacto, que en realidad eran bacterias posiblemente de origen marino que se aislaban con facilidad en medios de laboratorio cuando se muestreaban ambientes hipersalinos. Estos estudios recientes demuestran que al menos en el caso de *Spiribacter salinus* podemos

hablar de una auténtica bacteria halófila moderada definida «ecológicamente», que se encuentra de forma abundante y posiblemente muy bien adaptada a las condiciones de salinidad intermedia de los estanques de las salinas. Tal vez sea el momento de reconsiderar la clásica clasificación basada en el crecimiento óptimo en el laboratorio y reemplazarla por una clasificación basada en la distribución ecológica, en los diferentes ambientes en los que habitan. Está claro que a pesar de los numerosos estudios realizados durante los pasados 35 años, son todavía muchos los misterios que quedan por descifrar y las sorpresas que nos depararán las salinas de Santa Pola y otros ambientes hipersalinos.

REFERENCIAS

- Fernández AB, Ghai R, Martín-Cuadrado A-B, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, Ventosa A. (2014a). 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. (2014b). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front Microbiol* 5: 196.
- Ghai R, Pašić L, Fernández AB, Martín-Cuadrado AB, 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. *Sci Rep* 1: 135.
- Kushner DJ. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In: *Microbial Life in Extreme Environments*, D. J. Kushner (Ed.), p. 318. Academic Press, London.
- Kushner DJ, Kamekura M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In: *Halophilic Bacteria*, vol. 1, F. Rodríguez-Valera (Ed.), pp. 109-138. CRC Press, Boca Raton.
- León MJ, Fernández AB, Ghai R, Sánchez-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* (in press).
- 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.